

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

FERNANDA LINS BRANDÃO MÜGGE

**EFEITOS DO FÁRMACO SALICILATO DE SÓDIO SOBRE O RAMO
DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS MEDIADO
PELO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ATF6 α**

Belo Horizonte
2018

FERNANDA LINS BRANDÃO MÜGGE

Efeitos do fármaco salicilato de sódio sobre o ramo da via de resposta a proteínas mal dobradas mediado pelo fator de transcrição ATF6 α

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao povo brasileiro, que foi responsável pelo financiamento deste trabalho e que deve ser sempre o principal beneficiado de pesquisas realizadas com dinheiro público.

Em segundo lugar, agradeço às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG, por me garantir a oportunidade de trabalhar com pesquisa e obter o meu doutoramento.

Ao professor Aristóbolo Mendes da Silva, que abriu as portas do seu laboratório, confiou nas minhas ideias e contribuiu enormemente para a minha formação. Espero que a minha teimosia e determinação não tenham sido motivos de estresse e preocupação.

À minha mãe, que é o meu maior exemplo de mulher cientista e batalhadora. Sempre determinada e às vezes impetuosa, características que admiro e que sei que são fundamentais para alcançar sonhos e construir uma carreira de sucesso. Obrigada por me levar desde muito pequena ao seu laboratório e ter despertado em mim o sonho de também ser cientista.

Ao Rafa, quem eu escolhi como namorado, marido, parceiro e colaborador, e que é muito mais que apenas companheiro. Você sabe que fez e faz uma diferença incalculável na minha vida e que também é co-responsável por todas as minhas conquistas.

Aos amigos com os quais divido os momentos mais felizes e também as aflições de uma geração. Eliana, Sarah, Luciana, Clarisse, Marina, Bernardo, Juliana, Amanda, Bárbara, Victor – o apoio de vocês também foi e é fundamental.

Amigos do Laboratório de Genes Inflamatórios, Jôsy, Isadora, Felipe, Heliana e Brener, na alegria e na tristeza quando os experimentos não funcionam, ter vocês por perto foi o melhor remédio.

Aos outros amigos que a pós-graduação me deu, agradeço as oportunidades de colaboração e espero que elas continuem sendo frutíferas dentro e fora do laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, na figura de seus professores, coordenadores (professoras Cleida, Cristina e Luciana) e dos membros da secretaria (Rhuanna e Paula), agradeço todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço também às minhas filhas felinas, Arya, Elsa, Shiva e Panqueca, que tornam meus dias mais felizes.

A todos os animais que de forma indireta perderam suas vidas para a realização deste trabalho, ofereço meu agradecimento e sincera esperança de que seu uso em pesquisa possa ser cada vez mais consciente e gradualmente reduzido com as constantes inovações tecnológicas.

RESUMO

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela celular responsável pela síntese e modificações pós-traducionais de muitas proteínas, tanto aquelas que permanecem nas células como outras que são secretadas. Perturbações da homeostase do RE ocasionadas pelo acúmulo de proteínas mal dobradas dá início à resposta ao estresse do RE, que é mediada por três proteínas transmembrana do RE: PERK, ATF6 e IRE1. A ativação dessa resposta leva a célula a interromper a tradução de novas proteínas e a iniciar um programa de ativação transcricional de genes que irão aumentar a capacidade da célula de dobrar ou degradar as proteínas mal dobradas. PERK e IRE1 são ativadas por oligomerização e fosforilação, enquanto que a ativação de ATF6 ocorre após esta proteína ser transportada do RE para o complexo de Golgi, onde ela é clivada sequencialmente pelas proteases S1P e S2P, gerando um fator de transcrição ativo que é translocado para o núcleo da célula. Evidências indicam que fármacos da classe dos salicilatos, como aspirina e salicilato de sódio (NaSal), são capazes de ativar PERK mas não IRE1. Uma vez que o papel de ATF6 nas respostas celulares induzidas pelos salicilatos não havia sido investigado, nosso objetivo principal neste trabalho foi caracterizar a expressão e ativação de ATF6 em células tratadas com NaSal. A expressão de ATF6 foi avaliada por meio de PCR quantitativa em tempo real e *western blot* e sua ativação foi avaliada por meio de ensaios de gene repórter de luciferase, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Descobrimos que o tratamento das células com NaSal leva a um aumento dos níveis de RNA mensageiro e da proteína ATF6 α , mas esses eventos não são acompanhados da ativação de ATF6. Por outro lado, o tratamento com NaSal inibiu a ativação transcricional de ATF6 induzida por diferentes agentes indutores de estresse do RE em diferentes tipos celulares. Mecanicamente, nas células tratadas com NaSal, ATF6 α permanece localizado no complexo de Golgi, o que parece impedir a sua clivagem por S1P/S2P e consequente translocação da sua forma ativa para o núcleo, prejudicando assim a expressão de diversos genes alvos de ATF6 α . Neste estudo descrevemos ATF6 α como um novo alvo para as ações biológicas do salicilato de sódio, que é capaz de restringir a ativação de ATF6 α e inibir a expressão de um conjunto específico de genes responsivos ao estresse do RE.

ABSTRACT

The endoplasmic reticulum (ER) is a cellular organelle responsible for the synthesis and post-translational modifications of many cellular and secreted proteins. Perturbation of the homeostasis of the ER by the accumulation of unfolded proteins triggers the ER stress response, which is mediated by three ER transmembrane proteins: PERK, ATF6 e IRE1. The activation of this response leads the cell to shut down the global mRNA translation and start a gene transcriptional activation program that will increase the capacity of the cell to fold or degrade the unfolded proteins. PERK and IRE1 are activated by oligomerization and phosphorylation, while ATF6 activation occurs after being transported from ER to Golgi apparatus where it is cleaved by the proteases S1P and S2P to form an active transcription factor that will eventually be translocated to the cell nucleus. Accumulating evidence indicate that anti-inflammatory drugs salicylates, like aspirin and sodium salicylate (NaSal), can activate PERK, but not IRE1. Because the role of ATF6 in the cellular responses induced by salicylates remained elusive, we aimed to characterize the expression and activity of ATF6 after NaSal treatment of cells. Expression of ATF6 was determined through RT-qPCR and western blot and its activation was evaluated by luciferase gene reporter, fluorescence microscopy and flow cytometry studies. We found that NaSal treatment of cells leads to increases in ATF6 α mRNA and protein levels; however, these events are not accompanied by ATF6 activation. Conversely, NaSal inhibited ATF6 transactivating activity elicited by various ER stress-inducing agents in different cell types. Mechanistically, exposure of cells to NaSal results in ATF6 α trapping at the Golgi apparatus, thus preventing nuclear translocation. This resulted in the inhibition of the expression of a subset of ATF6 α target genes. This study describes ATF6 as a newly molecular target for the biological actions of sodium salicylate, by restraining its activity, and thereby preventing the activation of a specific subset of ER-stress responsive genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das vias do estresse do retículo endoplasmático	15
Figura 2 – Representação dos domínios dos fatores de transcrição do tipo bZIP relacionados a ATF6	21
Figura 3 – Representação esquemática da inibição da COX pelo ácido acetilsalicílico e geração do metabólito salicilato de sódio.....	26
Figura 4 – Quantificação dos níveis de mRNA de ATF6 α em MEFs tratados com NaSal	42
Figura 5 – Quantificação dos níveis de mRNA de ATF6 α e ATF6 β durante tratamento com NaSal.....	44
Figura 6 – Expressão de ATF6 α em MEFs WT e Perk KO tratados com NaSal e tunicamicina	45
Figura 7 – Acúmulo da proteína e processamento de ATF6 α em células tratadas com NaSal	46
Figura 8 – Avaliação da atividade transcricional de ATF6 por ensaio de gene repórter em MEFs tratados com NaSal.....	48
Figura 9 – Expressão de genes alvo da UPR em MEFs selvagens e deficientes de ATF6 tratados com salicilato de sódio.....	50
Figura 10 – Expressão de genes alvo da UPR em células co-tratadas com NaSal e tunicamicina	52
Figura 11 – Expressão de <i>HRD1</i> em células HepG2 co-tratadas com NaSal e agente indutor de estresse.....	53
Figura 12 – Avaliação da atividade transcricional de ATF6 em MEFs co-tratados com NaSal ou aspirina e agentes indutores de estresse do RE.	55
Figura 13 – Efeito da inibição do proteassomo pelo tratamento com bortezomib sobre bloqueio da atividade transcricional de ATF6 induzida pelo salicilato de sódio	57
Figura 14 – <i>Western blot</i> de extrato citossólico de células HEK293 transfectadas com EGFP-ATF6 e tratadas com NaSal e/ou tunicamicina.....	58
Figura 15 – Atividade transcricional e expressão de genes alvo da UPR dependentes de ATF6 α em células deficientes de Perk.....	59

Figura 16 – Microscopia de fluorescência de MEFs transfectados com EGFP-ATF6	61
Figura 17 – Detecção de EGFP-ATF6 em núcleos de células tratadas com NaSal e/ou DTT	62
Figura 18 – Níveis proteicos de EGFP-ATF6 em núcleos de células tratadas com NaSal e/ou DTT.....	64
Figura 19 – Microscopia de fluorescência de células HEK293 co-transfectadas com EGFP-ATF6 e mRuby2-MannII e tratadas com NaSal e/ou DTT	65
Figura 20 – Microscopia de fluorescência de células HEK293 co-transfectadas com EGFP-ATF6 500 ng e quantidades decrescentes de mRuby2-MannII e tratadas com DTT	66
Figura 21 – Ensaio de gene repórter da atividade transcricional de ATF6 em células transfectadas com mRuby2-MannII.....	67
Figura 22 – Ativação de OASIS e CREBH em células tratadas com salicilato de sódio e indutores de estresse do RE.....	69
Figura 23 – Atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com nigericina, salicilato de sódio e/ou tunicamicina	71
Figura 24 – Avaliação do efeito do co-tratamento com NaSal e tunicamicina sobre a atividade transcricional de ATF6 em linhagens de células tumorais	72
Figura 25 – Representação das propostas de mecanismos de ação do salicilato de sódio sobre componentes do estresse do RE	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

	Descrição em inglês	Tradução para o português
AAS	-	Ácido acetilsalicílico
AINE	-	Anti-inflamatório não esteroide
ATF4	<i>Activating transcription fator 4</i>	Fator ativador da transcrição 4
ATF6	<i>Activating transcription fator 6</i>	Fator ativador da transcrição 6
BFA	-	Brefeldina A
BiP/Grp78	<i>Binding immunoglobulin protein</i>	Proteína ligante de imunoglobulina
BMZ	-	Bortezomib
Chop/Gadd153	<i>C/EBP homologous protein</i>	Proteína homóloga de C/EBP
COX	<i>Cyclooxygenase</i>	Ciclo-oxigenase
DTT	-	Ditiotreitol
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
GCN2	<i>General control non-derepressible 2</i>	Proteína de controle geral não derrepressível 2
Herpud-1	<i>Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1</i>	Proteína de retículo endoplasmático induzida por homocisteína com domínio semelhante a ubiquitina
Hrd-1 (Synv1)	<i>HMG-CoA Reductase Degradation 1 Homolog (Synoviolin)</i>	Homólogo 1 da redutase de degradação de HMG-CoA
IRE1	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>	Enzima sequestradora de inositol 1
KO	<i>Knockout</i>	Tipo nocaute/deficiente para a proteína
M	-	Molar (mol/L)
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblastos</i>	Fibroblastos embrionários murinos
NaSal	-	Salicilato de sódio
Ng	-	Nigericina
p58^{ipk}	<i>Protein Kinase Inhibitor P58</i>	Inibidor de proteína cinase de 58 kDa
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i>	Tampão salina-fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
Pdia4	<i>Protein disulfide isomerase a 4</i>	Proteína dissulfeto isomerase a 4
PERK	<i>Protein kinase RNA-like ER</i>	Proteína cinase tipo PKR

	<i>kinase</i>	residente no retículo endoplasmático
RE	-	Retículo endoplasmático
mRNA	-	RNA mensageiro
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase quantitative PCR</i>	PCR quantitativa em tempo real de transcrição reversa
S1P/S2P	<i>Site 1/site 2 protease</i>	Protease de sítio 1/sítio 2
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecil sulfato de sódio
SFB	-	Soro fetal bovino
TBS	<i>Tris buffered saline</i>	Tampão tris salina
Tg	-	Tapsigargina
Tm	-	Tunicamicina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>	Resposta às proteínas mal dobradas
WT	<i>Wild type</i>	Tipo selvagem
Xbp-1	<i>X-box binding protein 1</i>	Proteína ligante do domínio X 1
x g	<i>Times gravity</i>	Unidade de centrifugação (vezes gravidade)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 O retículo endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular.....	13
1.2 Os sensores da resposta às proteínas mal dobradas	16
1.2.1 PERK	16
1.2.2 IRE-1	17
1.2.3 ATF6	18
1.2.3.1 Fatores de transcrição do tipo bZIP relacionados a ATF6.....	19
1.2.3.2 Papéis de ATF6 no desenvolvimento e homeostase do organismo	21
1.3 Fármacos moduladores do estresse do retículo endoplasmático	24
1.4 Salicilatos	25
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 Cultura de células.....	32
4.1.1 Detecção de contaminação por micoplasma.....	33
4.2 Tratamentos das células	33
4.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	34
4.4 Plasmídeos para expressão de EGFP-ATF6, V5-OASIS-HA, V5-CREBH-HA e manosidase II.....	36
4.5 Western Blot.....	37
4.6 Ensaio de atividade de luciferase	39
4.7 Microscopia de fluorescência.....	40

4.8	Análise por citometria de fluxo	40
4.9	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1	A expressão de ATF6 α , mas não ATF6 β , é induzida em células tratadas com salicilato de sódio	42
5.2	O tratamento com NaSal induz o acúmulo, mas não a clivagem de p90ATF6.....	45
5.3	A atividade transcricional de ATF6 α não é induzida pelo tratamento com salicilato de sódio	47
5.4	Os níveis basais de mRNA de genes alvo de ATF6 α não são alterados após tratamento com NaSal.....	48
5.5	NaSal inibe a expressão de genes alvo de ATF6 α induzida por agentes indutores de estresse do RE	50
5.6	A atividade transcricional de ATF6 α induzida por agentes indutores de estresse do RE é inibida pelo tratamento com NaSal e AAS.....	53
5.7	O bloqueio da atividade do proteassomo não afeta a inibição da ativação de ATF6 causada pelo NaSal.....	56
5.8	O co-tratamento com NaSal não inibe a redução de glicosilação de ATF6 causada pela tunicamicina	57
5.9	A inibição da atividade transcricional de ATF6 α pelo NaSal é independente de PERK	58
5.10	EGFP-ATF6 não é translocado para o núcleo de células tratadas com NaSal	60
5.11	EGFP-ATF6 parece ser retido no complexo de Golgi em células tratadas com NaSal	64
5.12	O tratamento com NaSal não afeta a ativação dos fatores de transcrição OASIS e CREBH induzida no estresse do RE.....	67
5.13	A atividade transcricional de ATF6 induzida por tunicamicina é inibida em células tratadas com indutor de estresse de complexo de Golgi	70

5.14 O efeito inibitório do NaSal sobre a atividade transcricional de ATF6 também ocorre em linhagens de células tumorais.....	71
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	83
8. PERSPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS	102
Anexo A – Curvas de dissociação de iniciadores utilizados no estudo.....	102
Anexo B – Publicações	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 O retículo endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular

O retículo endoplasmático (RE) é um local de processamento e enovelamento de mais que um terço das proteínas que as células produzem e que serão secretadas, transportadas para inserção ou associação às membranas celulares, ou ainda endereçadas a diferentes organelas. Uma vez no lúmen do RE, as proteínas sofrem dobramento em suas estruturas tridimensionais e passam por diversas modificações pós-traducionais, incluindo glicosilação e formação de pontes dissulfeto, que são realizadas por diferentes chaperonas, enzimas de glicosilação e oxirredutases (Oakes e Papa, 2015).

Esses processos enzimáticos garantem que as proteínas assumam sua forma correta, tenham as modificações necessárias e formem complexos que continuarão seu caminho na via secretória. Diversas proteínas, entretanto, não alcançam a forma necessária ao desempenho de suas funções, sendo então descartadas por mecanismos de controle de qualidade. Um destes mecanismos é a degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD), que marca essas proteínas com ubiquitina e promove seu transporte para o citossol e degradação pelo proteassomo. Esses mecanismos estão continuamente ativos nas células e são fundamentais para a manutenção da homeostase celular, mas diversas situações de estresse podem levar a um maior acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do RE, superando a sua capacidade de lidar com as proteínas mal dobradas (Oakes e Papa, 2015; Wang e Kaufman, 2016).

Esta situação é conhecida como estresse do RE e leva à ativação da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *Unfolded protein response*), que é ativada com o objetivo de restaurar a função normal do RE. Inicialmente, a UPR tenta promover a sobrevivência celular e o retorno da homeostase, pois torna possível que as células se adaptem a condições que influenciam no enovelamento de proteínas no RE. No entanto, a ativação da UPR também pode promover a morte celular

quando o estresse do RE é crônico ou muito severo (Wang e Kaufman, 2016; Lindholm et al., 2017).

Diversas são as condições que causam estresse celular, sendo que hipóxia, privação de nutrientes, infecções e alterações nas necessidades secretórias, por exemplo, podem promover sobrecarga da capacidade em dobrar corretamente suas proteínas e induzir estresse do RE nas células. Essa amplitude de situações causadoras de estresse do RE fazem com que essa resposta esteja implicada em inúmeras doenças de diferentes sistemas do organismo, como doenças neurodegenerativas, câncer, doenças metabólicas, inflamação e doenças genéticas (Iurlaro e Muñoz-Pinedo, 2016; Wang e Kaufman, 2016). No câncer, especificamente, as células localizadas no interior de tumores estão continuamente expostas a um ambiente com poucos nutrientes e oxigênio e possuem alta demanda metabólica, o que é altamente propício para a ocorrência de estresse do RE. Nesse contexto, o estresse do RE ocorre para promover a sobrevivência celular e, além disso, já foi demonstrado que a ativação prolongada da UPR torna as células cancerígenas mais tumorigênicas, metastáticas e resistentes a tratamentos (Cubillos-Ruiz et al., 2017).

Os mecanismos adaptativos empregados para retornar o RE ao seu estado fisiológico normal estão relacionados ao aumento da sua capacidade em enovelar proteínas, como aumento da síntese de chaperonas; à redução da carga de proteínas presente no RE, como aumento da síntese de componentes do ERAD; e à parada do ciclo celular em G1. Nas situações em que a UPR se torna citotóxica, vias de sinalização diferentes são ativadas e podem levar a célula a sofrer apoptose ou autofagia (Frakes e Dillin, 2017).

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, do inglês *activating transcription factor 6*), a enzima sequestradora de inositol 1 (IRE1, do inglês *inositol requiring enzyme 1*) e a proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático (PERK, do inglês *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/BiP (Hetz e Papa, 2018).

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. PERK e IRE1 são ativados ao se homo-oligomerizarem, o que resulta em seguida em sua autofosforilação (Bertolotti et al., 2000). ATF6 é translocada para o aparelho de Golgi, onde é processada pelas proteases de sítio 1 (S1P) e sítio 2 (S2P), para gerar um fator de transcrição ativo que é então translocado para o núcleo (Shen et al., 2002; Shen et al., 2005).

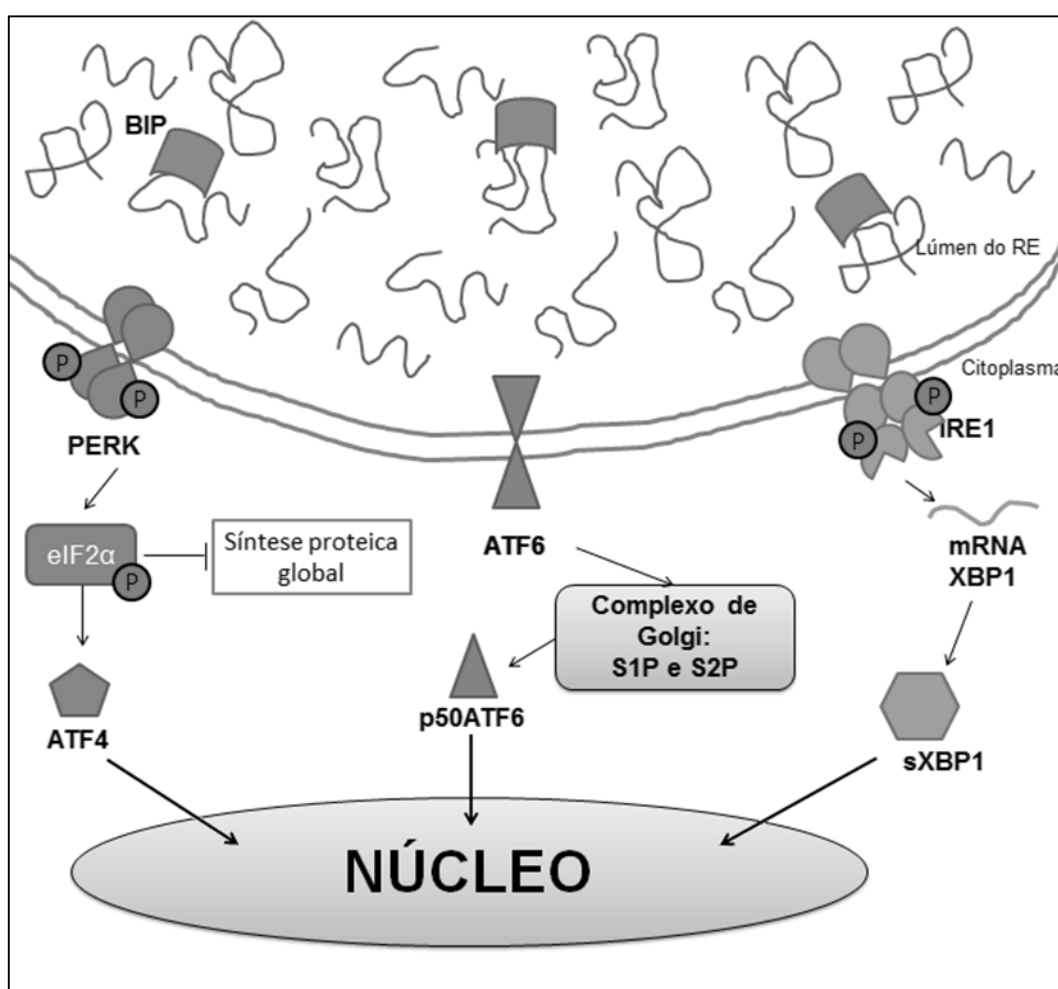


Figura 1 – Representação esquemática das vias do estresse do retículo endoplasmático. O acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE leva ao deslocamento de BiP dos domínios luminais de PERK, ATF6 e IRE1, o que causa a ativação dos três ramos da via de respostas a proteínas mal dobradas (do inglês, UPR). Essa ativação leva à síntese/acúmulo dos três fatores de transcrição ativos da UPR, ATF4, p50ATF6 e XBP1 processado (sXBP1), respectivamente, que são transportados para o núcleo da célula, onde promovem a transcrição de diversos genes alvo da UPR.

Além da dissociação de BiP dos domínios luminais de PERK e IRE1, também foi demonstrado que perturbações da composição das membranas celulares podem ser detectadas pelos domínios transmembrana dessas proteínas, o que leva à sua dimerização aumentada e conseqüentemente à sua ativação (Volmer et al., 2013; Volmer e Ron, 2015). Evidências também comprovam que ligação direta de proteínas mal dobradas ao domínio luminal de IRE1 tem papel na sua ativação, tendo sido demonstrado para a proteína de levedura e mais recentemente para IRE1 humano (Li et al., 2010; Gardner e Walter, 2011; Karagoz et al., 2017).

1.2 Os sensores da resposta às proteínas mal dobradas

1.2.1 PERK

PERK é uma serina/treonina cinase transmembrana do tipo I que, em mamíferos, está presente na maioria dos tipos celulares (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). A redução da quantidade de proteínas no interior do RE e o aumento da capacidade da célula em lidar com as proteínas mal dobradas são mecanismos que favorecem a sobrevivência celular (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 mRNA 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 códon de iniciação ATG (uORFs, *upstream open reading frames*) e que contribuem para a sua tradução diferencial (Harding et al., 2000; Harding et al., 2003; Vattem e Wek, 2004; Wek e 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. Por outro lado, pode também promover a expressão de fatores pró-apoptóticos, como a proteína homóloga de C/EBP, CHOP/GADD153, que está associada à morte celular por apoptose (Oakes e Papa, 2015; Lindholm et al., 2017).

1.2.2 IRE-1

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, possuindo 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 (sXBP-1, *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 sXBP-1 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, porém isso pode variar entre tipos celulares, uma vez que sXBP-1 pode interagir e formar heterodímeros com diversos fatores de transcrição (Hetz, 2012).

Adicionalmente, o domínio endonuclease de IRE1 também promove a degradação de mRNAs, em um mecanismo conhecido como decaimento regulado dependente de IRE1 (RIDD, do inglês *regulated IRE1-dependent decay*). Já foi demonstrado que o RIDD induz a degradação de inúmeros mRNA localizados no RE, citossol e ribossomos, além de microRNAs, e recentemente teve seu papel descrito no controle do metabolismo de glicose, inflamação e apoptose (Maurel et al., 2014).

1.2.3 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 (do inglês *ER stress responsive cis-acting elements*) e ERSE II; UPR (do inglês *UPR element*) e UPR II, e assim promovem a ativação transcricional de diversos genes alvo (Yoshida et al., 1998; Yoshida et al., 2001; Yoshida 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). 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 (Yamamoto et al., 2007). Também já foi descrito que a formação de heterodímeros com sXBP-1 induz expressão de subconjuntos distintos de genes que influenciam o dobramento, transporte ou degradação das proteínas presentes no interior do RE (Shoulders et al., 2013).

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 et al., 2004) demonstraram que o mecanismo molecular envolvido nessa degradação está relacionado à ubiquitinação de p90ATF6 e sua degradação pelo proteossoma em resposta ao tratamento com esses indutores do estresse do RE.

Além da ubiquitinação, outras modificações pós-traducionais de ATF6 também influenciam sua ativação, como o estado de glicosilação e a presença de pontes dissulfeto em p90ATF6. ATF6 existe constitutivamente como uma proteína glicosilada, e a modificação do seu estado de glicosilação pode servir como um mecanismo sensor da homeostase do RE, podendo resultar na ativação de ATF6 e da UPR (Hong et al., 2004). Quanto às pontes dissulfeto, já foi mostrado que elas influenciam na oligomerização de ATF6, sendo que somente ATF6 monomérico é transportado para o complexo de Golgi (Nadanaka et al., 2007). Ainda, é a reorganização das pontes dissulfeto em ATF6 que determina o seu empacotamento em vesículas COPII e transporte para o Golgi (Schindler e Schekman, 2009; Higa et al., 2014).

1.2.3.1 Fatores de transcrição do tipo bZIP relacionados a ATF6

Em tipos celulares específicos outros fatores de transcrição com domínio bZIP relacionado a ATF6 e responsivos ao estresse do RE foram identificados. A família de fatores OASIS inclui Luman/LZIP/CREB3; OASIS/CREB3L1; CREBH/CREB3L3; CREB4/Tips40/CREB3L4; BBF2H7/CREB3L2. Com exceção de Luman, que tem distribuição em diversos tecidos, esses fatores de transcrição são tecido-específicos e podem ser encontrados em maior abundância, respectivamente, em osteoblastos e astrócitos (Kondo et al., 2005; Murakami et al., 2009); hepatócitos (Omori et al., 2001; Zhang et al., 2006); testículo e próstata (Stelzer e Don, 2002; Nagamori et al., 2006); e condrócitos (Saito et al., 2009).

Por meio de análises da sequência de aminoácidos destas proteínas, verificou-se que os membros da família OASIS possuem domínios transmembrana, bZIP e de transativação transcricional altamente conservados e semelhantes aos domínios de ATF6 α e ATF6 β , e apresentam também sítios de clivagem pelas proteases S1P e S2P. Por outro lado, o tamanho total de cada proteína é distinto e somente os membros da família OASIS apresentam outra região altamente conservada que se encontra adjacente ao domínio bZIP (ver Figura 2A – bloco de cor rosa). Na Figura 2B é possível verificar o alinhamento de aminoácidos entre os diferentes domínios dessas proteínas. Ademais, os domínios luminais dos membros dessa família tem baixíssima homologia com o domínio luminal de ATF6, não possuindo as regiões de ligação a BiP e de localização no complexo de Golgi (Asada et al., 2011). Apesar das semelhanças estruturais, as diversas distribuições teciduais, estímulos responsáveis por sua ativação e ligação específica a diferentes elementos regulatórios indicam que elas exercem funções distintas na regulação da UPR.

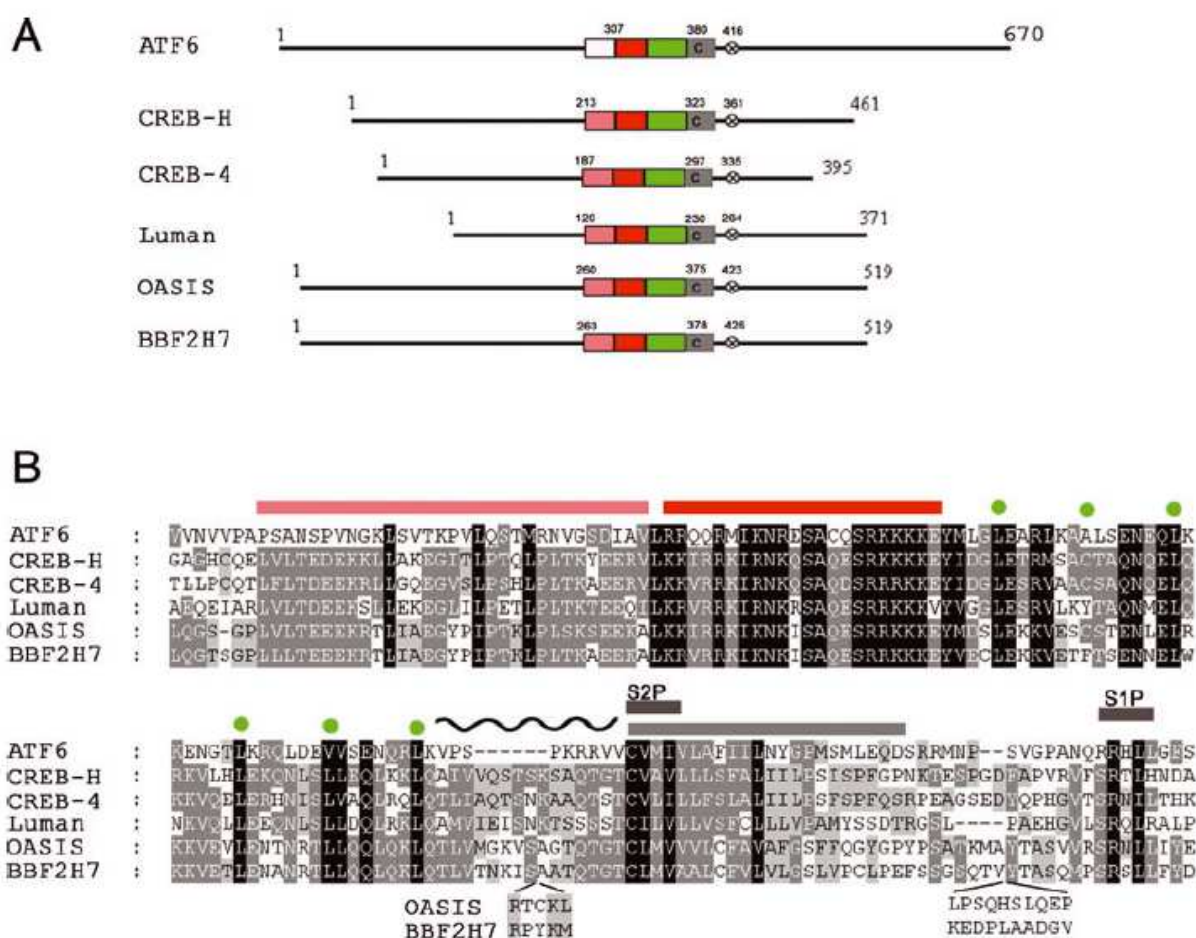


Figura 2 – Representação dos domínios dos fatores de transcrição do tipo bZIP relacionados a ATF6. A) representação esquemática dos tamanhos e localização dos domínios dos fatores de transcrição do tipo bZIP. B) alinhamento dos aminoácidos dos domínios centrais conservados. O sombreamento indica o nível de conservação. A região de coloração rosa adjacente ao domínio bZIP (barra vermelha) é conservado na família OASIS mas ausente em ATF6. O domínio transmembrana é indicado pela barra cinza, com os sítios S1P e S2P indicados. A linha ondulada indica a região citossólica imediatamente proximal ao domínio transmembrana. Fonte: adaptado de Llarena e colaboradores (2010).

1.2.3.2 Papéis de ATF6 no desenvolvimento e homeostase do organismo

A geração de camundongos deficientes de ATF6 mostrou que a deleção de ATF6 α ou ATF6 β não compromete o desenvolvimento embrionário e pós-natal dos animais. Todavia, a deleção simultânea dos dois genes é letal para o embrião. Estudos com MEFs obtidos destes animais demonstraram que ATF6 α é dispensável para a expressão basal de chaperonas residentes do RE, porém é necessária para a indução da expressão desses genes durante o estresse do RE e para otimizar o dobramento e degradação das proteínas mal dobradas (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007).

Em *Caenorhabditis elegans* a proteína homóloga de IRE1, ire-1, é a principal responsável pela regulação da homeostase do retículo endoplasmático e, juntamente com xbp-1, são necessárias para o desenvolvimento normal desses animais (Shen et al., 2001). As vias de pek-1 e atf-6 (homólogos de PERK e ATF6, respectivamente), por outro lado, são complementares a ire-1/xbp-1, uma vez que só prejudicam o desenvolvimento larval quando ocorre sua deleção simultânea a ire-1 ou xbp-1. Evidências indicam que em *C. elegans* existem duas vias de resposta à UPR, sendo uma delas constituída de genes induzíveis (i-UPR), ativados pelo estresse do RE, e outra de genes constitutivos, ativados durante o desenvolvimento. Cada um dos três sensores da UPR é responsável por ativar conjuntos específicos de genes de cada resposta; atf-6, ao contrário de pek-1, regula poucos genes da i-UPR, porém é responsável pela ativação da maior parte dos genes da c-UPR (Shen et al., 2005).

Apesar da sobreposição funcional existente entre as vias de PERK, IRE1 e ATF6 em mamíferos, principalmente em condições de homeostase, resultados de experimentos *in vivo* com animais deficientes de ATF6 α comprovaram que a sinalização coordenada por essa via é fundamental para o retorno à homeostase celular. A expressão de genes responsivos ao estresse do RE, como BiP, CHOP, GADD34, p58^{ipk} é reduzida no fígado de animais nocautes que foram injetados intraperitonealmente com tunicamicina. O tratamento com tunicamicina se mostrou muito mais tóxico para os animais nocautes, que tiveram sobrevivência reduzida quando desafiados com tunicamicina (Wu et al., 2007). Ainda, análise macroscópica e histológica dos fígados desses animais revelou um acúmulo acentuado de lipídeos e indução de esteatose hepática nos animais deficientes de ATF6 α (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2010).

Em humanos, acromatopsia é até hoje a única doença genética em que mutações no gene de ATF6 α foram identificadas. Essa doença é caracterizada por daltonismo, fotofobia e visão reduzida, relacionadas a um defeito nas células cone da retina. Por outro lado, os pacientes com acromatopsia não parecem ter outros fenótipos sistêmicos ou neurológicos, o que correlaciona com a ausência de defeitos no

desenvolvimento dos camundongos nocautes de ATF6. Nestes animais, apesar de não serem identificáveis disfunções na retina na juventude, tais alterações se tornam evidentes com o envelhecimento (Kohl et al., 2015).

Estudos mais aprofundados das mutações no gene de ATF6 revelaram que em pacientes com acromatopsia elas se agrupam em três classes que diferem no nível de ativação de ATF6. Na primeira classe, a mutação causa um prejuízo no transporte de ATF6 do RE para o Golgi, o que reduz o seu processamento e atividade transcricional; na segunda classe a proteína preserva o seu domínio citossólico e mantém sua atividade transcricional, porém a mutação induz uma atividade constitutiva e ativação de genes alvo mesmo na ausência de estresse do RE; na terceira classe ATF6 não possui atividade transcricional devido a defeitos ou à ausência do domínio bZIP da proteína. As evidências sugerem que os níveis alterados de atividade de ATF6 levam à uma maior susceptibilidade ao estresse do RE, o que de fato foi observado em fibroblastos primários obtidos de pacientes com mutações das classes 1 e 3 (Chiang et al., 2017).

Em outros contextos, o comprometimento da atividade de ATF6 também se mostrou prejudicial para a manutenção de homeostase e funções celulares. Animais nocautes para ATF6 α desafiados com uma dieta rica em gorduras são menos tolerantes à glicose e apresentam menor conteúdo de insulina no pâncreas, além de maior disfunção de células β (Usui et al., 2012). No fígado, a inibição da atividade de ATF6 pela superexpressão de um dominante negativo aumentou a susceptibilidade de animais resistentes à insulina à esteatose hepática (Chen et al., 2016). No coração, a deficiência de ATF6 resultou em maior dano celular e maior perda de função do órgão após a indução de isquemia e reperfusão. No mesmo estudo, os autores demonstraram que a perda da atividade de ATF6 aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio devido à expressão reduzida de genes responsivos ao estresse oxidativo, como catalase, o que sugere que ATF6 também pode induzir a ativação transcricional de outros genes fora da via de estresse do RE (Jin et al., 2017). Finalmente, a indução da atividade de ATF6, seja ela farmacológica ou pela expressão de forma ativa da proteína, aumenta o controle de qualidade do RE sobre

proteínas mal dobradas e reduz a agregação e secreção de complexos de proteínas amiloidogênicas (Chen et al., 2014; Plate et al., 2016).

1.3 Fármacos moduladores do estresse do retículo endoplasmático

Dado que a correlação entre a ocorrência de estresse do RE em diferentes tecidos e a etiologia e patogênese de inúmeras doenças já foi demonstrada, existe grande interesse no desenvolvimento de estratégias que permitam a regulação da ativação de vias do estresse do RE. Atualmente, maiores avanços têm sido alcançados na descoberta de inibidores de PERK e IRE1, tendo sido descobertos inibidores competitivos de ATP para cada uma dessas proteínas e também inibidores da atividade de RNase de IRE1 (Maly e Papa, 2014).

De modo geral, a redução da carga de proteínas mal dobradas no interior do RE resulta em alívio do estresse do RE e redução simultânea da ativação das três vias. Esse efeito pode ser alcançado através da utilização de fármacos chamados de chaperonas químicas, que exercem função semelhante às proteínas chaperonas (ou chaperonas moleculares) e aumentam a capacidade do RE de processar proteínas mal dobradas. Exemplos de chaperonas químicas são o 4-fenilbutirato (4-PBA, *4-phenylbutyrate*) e alguns ácidos biliares. O 4-PBA, especificamente, é um fármaco com boa biodisponibilidade oral, permeável à barreira hematoencefálica e já aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, agência regulatória dos Estados Unidos) para o tratamento de doenças relacionadas ao ciclo da ureia. Diversos estudos sugerem que o 4-PBA tem potencial também no tratamento de doenças relacionadas ao estresse do RE, como, por exemplo, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas (Cortez e Sim, 2014; Vega et al., 2016).

Inibidores específicos da via de ATF6 eram até pouco desconhecidos, mas dois estudos recentes que utilizaram uma plataforma de *screening* descobriram uma nova classe de moléculas capazes de inibir a ativação de ATF6. Os ceapins, como foram chamados esses fármacos, induzem a oligomerização de ATF6 no RE e com isso impedem a sua translocação para o complexo de Golgi e seu consequente processamento e ativação (Gallagher et al., 2016; Gallagher e Walter, 2016).

Já foi verificado que componentes proteicos das vias de sinalização envolvidas no estresse do RE podem ser alvo de diversos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), cujo mecanismo clássico de ação é a inibição da ciclo-oxigenase (COX). Essas ações podem ser específicas para tipos celulares diferentes, nos quais uma mesma molécula pode exercer ações antagônicas de ativação ou inibição de um mesmo alvo, podendo então resultar em ações terapêuticas benéficas ou em toxicidade (Mügge e Silva, 2015). Por exemplo, o tratamento de células com celecoxibe, um AINE inibidor seletivo de COX-2, induz a ativação de moléculas relacionadas ao estresse do RE, como fosforilação de eIF2alfa, ATF4, CHOP, dentre outras, que podem resultar na indução de autofagia e sensibilização de células tumorais (Yu et al., 2017). Por outro lado, a indução de estresse do RE e autofagia também podem ser responsáveis pela toxicidade gástrica dos AINEs, sendo que a inibição farmacológica de autofagia reduziu os efeitos citotóxicos e os danos gástricos causados pela indometacina em ratos (Ock et al., 2017).

1.4 Salicilatos

Drogas vegetais ricas em salicilatos têm sido utilizadas para tratar doenças inflamatórias, dor e febre há mais de dois mil anos. O primeiro registro de estudo clínico com esses remédios foi feito no século XVIII pelo reverendo inglês Edward Stone, que administrou um preparado de casca de salgueiro para tratar a febre de pacientes sofrendo com malária (Stone, 1763). No século XIX, o princípio ativo da casca do salgueiro foi isolado e identificado como salicina, um derivado do ácido salicílico, sendo sua síntese em laboratório realizada no mesmo século. Seu uso tornou-se recorrente no tratamento da gota e artrite, porém a administração direta causava severos efeitos adversos gastrointestinais. O ácido acetilsalicílico (AAS), composto com uma menor acidez, foi sintetizado em 1898 com o objetivo de reduzir os danos gastrointestinais dos pacientes, tendo sido patenteado pela empresa farmacêutica Bayer em 1899, ano em que também teve início a sua comercialização com o nome de aspirina. A partir de então, a aspirina passou a ser amplamente utilizada como anti-inflamatória, analgésica e antipirética (Vainio e Morgan, 1997; Amann e Peskar, 2002).

Foi somente em 1971, no entanto, que Vane estabeleceu que a modulação da inflamação pelo AAS ocorre pela inibição da COX, o que bloqueia a síntese de prostaglandinas (PGs) – ver Figura 3. O salicilato de sódio (NaSal), metabólito resultante da acetilação de COX pelo AAS, é um inibidor muito fraco desta enzima e, mesmo assim, possui atividade anti-inflamatória equivalente à do AAS *in vivo* (Vane, 1971; Vane e Botting, 2003; Steinberg et al., 2013).

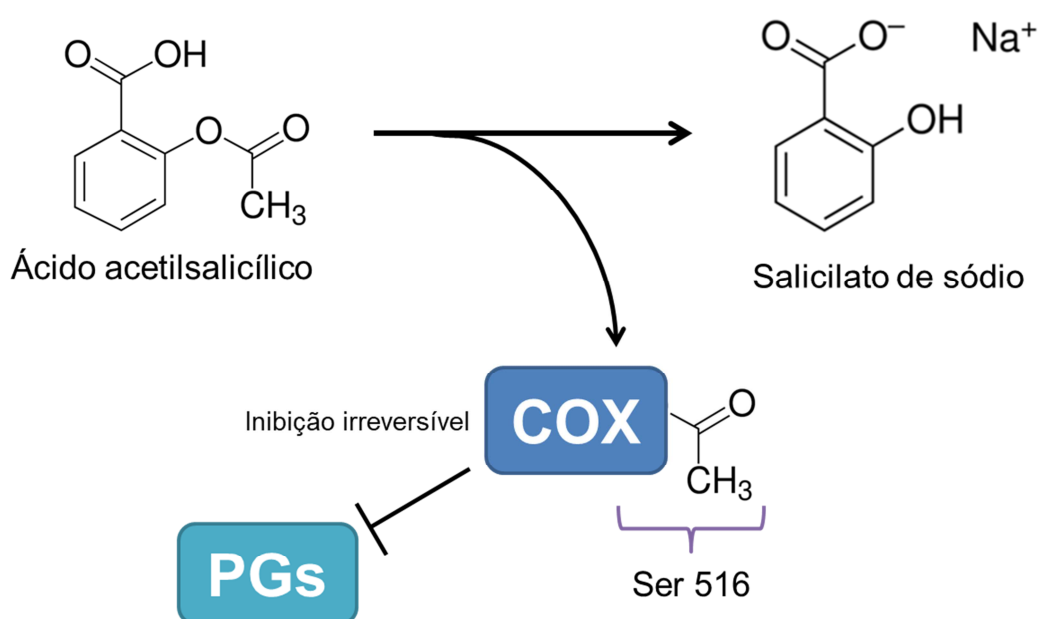


Figura 3 – Representação esquemática da inibição da COX pelo ácido acetilsalicílico e geração do metabólito salicilato de sódio. No interior das células, o ácido acetilsalicílico promove a acetilação da enzima ciclo-oxigenase (COX) na serina 516, o que causa sua inibição irreversível. A inibição da COX causa o bloqueio da síntese das prostaglandinas (PGs) e resulta em efeito anti-inflamatório e analgésico. A reação de acetilação tem como produto a molécula de salicilato de sódio.

De fato, diversos estudos já constataram que os salicilatos exercem efeitos celulares através de mecanismos independentes da inibição da COX, que podem se somar ao efeito anti-inflamatório da inibição da síntese de prostaglandinas, mas que também resultam na inibição da proliferação celular e indução de apoptose de diferentes tipos celulares (Mahdi et al., 2006).

A indução de apoptose pelos salicilatos pode ocorrer pela indução de vias pró-apoptóticas, como ativação de caspases e MAP cinases (MAPK), e a inibição de proteínas anti-apoptóticas, como as pertencentes à família Bcl-2. Foi demonstrado,

por exemplo, que em neutrófilos e células de linhagem de leucemia o tratamento com salicilatos induz a ativação de caspases e de PARP (*poly ADP-ribose polimerase*) e leva à degradação de Mcl-1, uma proteína Bcl-2 (Klampfer et al., 1999; Derouet et al., 2006). Em cultura de células de carcinoma de fígado, o tratamento com aspirina causa interrupção do ciclo celular e indução de estresse oxidativo, que resultam em disfunção mitocondrial e ativação de caspase 3 e PARP (Raza et al., 2011), enquanto que em células de carcinoma de próstata e colorretal a indução de apoptose ocorre por redução da expressão de Bcl-2. Neste contexto, a superexpressão dessa proteína foi capaz de reverter a apoptose induzida pela aspirina (Kim et al., 2005). Adicionalmente, a inibição da atividade do proteassomo é outro mecanismo implicado na indução de apoptose pelo tratamento com aspirina (Dikshit et al., 2006).

Outras evidências demonstram que os salicilatos promovem diretamente a ativação de p38 MAPK em diferentes tipos celulares, como macrófagos (Vittimberga et al., 1999) e fibroblastos (Schwenger et al., 1997), mas que, por outro lado, a ativação de JNK ocorre de maneira célula específica – somente em células COS-1 (fibroblastos de rim de macaco verde africano) e HT29 (adenocarcinoma de colon humano) (Schwenger et al., 1999). O tratamento com salicilato de sódio também causa inibição da ativação de ERK e JNK induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos (Vittimberga et al., 1999) e a inibição de ERK e JNK induzida por fator de necrose tumoral (TNF) (Schwenger et al., 1996; Schwenger et al., 1997).

Em experimentos com *C. elegans*, foi demonstrado que o tratamento com aspirina expande o período de vida desses animais, o que parece estar relacionado à ativação de vias de resposta ao estresse oxidativo (Ayyadevara et al., 2013) e vias relacionadas ao metabolismo (Wan et al., 2013; Huang et al., 2017).

Outra via de sinalização intracelular afetada pelo tratamento com salicilatos é a do fator nuclear kappa B (NF- κ B), cuja ativação é inibida em células expostas a esses fármacos. Este efeito inibitório é resultado da inibição da fosforilação e degradação do inibidor de NF- κ B, I κ B (Kopp e Ghosh, 1994; Schwenger et al., 1998; McCarty e Block, 2006), tendo sido demonstrado que o alvo primário de aspirina e salicilato de

sódio nesta via é o complexo IKK. Ao se ligarem à subunidade IKK β , esses fármacos reduzem a ligação de ATP e inibem a sua atividade de cinase (Yin et al., 1998), um efeito que pode ser considerado inespecífico, uma vez que a competição com ATP pode causar a inibição da atividade de diversas outras cinases intracelulares (Steinberg et al., 2013).

Em relação à cinase AMPK, o efeito parece ser específico, uma vez que os salicilatos se ligam a um sítio específico da proteína, causando ativação alostérica e inibindo sua fosforilação (Hawley et al., 2012). A ativação de AMPK pelo tratamento com salicilato leva ao aumento da oxidação de ácidos graxos por células HepG2 (He et al., 2015) e redução de níveis de ácidos graxos no sangue de camundongos, efeito que é perdido em animais nocautes de AMPK (Hawley et al., 2012).

Estudos diversos também demonstraram que salicilatos são capazes de se ligar *in vitro* a outras proteínas, como GAPDH (Choi et al., 2015); CBP/p300 (Shirakawa et al., 2016); diferentes acetiltransferases (Fernandez e Linden, 2017); e BiP (Deng et al., 2001). Este mesmo estudo apresenta evidências de que a ligação a BiP ocorreria no sítio de ligação a polipeptídeos, o que não causa indução da sua expressão mas poderia interferir com a sua função de chaperona (Deng et al., 2001).

Investigações sobre os efeitos dos salicilatos sobre outros componentes celulares que exercem papéis na resposta ao estresse do RE têm 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).

Além de causar bloqueio do proteassomo (Dikshit et al., 2006), aspirina e salicilato de sódio também inibem a síntese proteica (Spohn e McColl, 1980; Kwon et al., 1997). Mais tarde foi demonstrado que o mecanismo de inibição da síntese proteica é dependente do eixo PERK-eIF2 α , uma vez que ela não ocorre em MEFs deficientes de Perk. Esses dois fármacos também induziram uma expressão significativa da proteína CHOP, que estava reduzida nas células Perk KO, e a

clivagem de caspase 12. Entretanto, AAS e NaSal não apresentaram efeito sobre o processamento de XBP-1 mediado por IRE-1 (Silva et al., 2007).

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 apoptose induzida pelo NaSal é dependente de GCN2. Além disso, a ativação transcricional e a expressão da proteína CHOP, o acúmulo proteico de ATF6 e a expressão de genes envolvidos em vias de ubiquitinação e do ERAD são induzidos por NaSal e também dependentes de GCN2 (Gentz et al., 2013). Em minha dissertação de mestrado, confirmamos que o tratamento de MEFs com NaSal leva a um aumento de expressão de *Atf6 α* e ao acúmulo da proteína, mas esse efeito não é acompanhado da indução da atividade transcricional de *Atf6* (Mügge, 2015).

Em um estudo com adipócitos primários humanos, foi sugerido que o salicilato de sódio alivia o estresse do RE, uma vez que reduz a expressão de marcadores como ATF6, CHOP e GRP78 nas células em que o estresse do RE foi induzido pelo tratamento 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 da resposta ao estresse do RE por AINEs e especificamente pelos salicilatos sugerem um 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.

2. JUSTIFICATIVA

Já foi demonstrado em estudos do nosso grupo que os salicilatos exercem ação sobre componentes celulares relacionados ao estresse do RE, como a ativação de PERK e a inibição da síntese proteica dependente desta proteína, a indução de apoptose dependente de GCN2 e a expressão de vários genes relacionados ao estresse do RE. Por outro lado, os salicilatos não ativam IRE-1 e não promovem o processamento de XBP1 (Silva et al., 2007; Gentz et al., 2013).

Em relação ao ramo da UPR coordenado por ATF6, nenhum estudo havia investigado seu papel nas respostas celulares aos salicilatos. Evidências indicam que o tratamento com NaSal aumenta os níveis de RNA mensageiro e induz acúmulo da proteína nas células (Gentz et al., 2013), mas um estudo sistemático da cinética e dose-resposta, bem como a consequência desse efeito sobre a ativação de ATF6 e as etapas subsequentes da regulação da UPR não foi descrita até o momento. Neste trabalho, nossa primeira hipótese é que NaSal induz a ativação de ATF6 e que o consequente aumento da sua atividade transcricional resulta na expressão de genes responsivos ao estresse do RE.

O uso de aspirina é amplamente difundido e recorrente em pacientes com doenças cardiovasculares ou inflamatórias, o que faz com que diversos tecidos do organismo sejam expostos ao metabólito salicilato de sódio. Portanto, é necessário compreender seus efeitos farmacológicos e toxicológicos. Considerando o papel da via de ATF6 na homeostase e no estresse do RE, estudos mecanísticos sobre o papel dessa e outras vias da UPR sobre os efeitos celulares dos salicilatos podem contribuir na descoberta de potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de um grande número de doenças, especialmente o câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do fármaco anti-inflamatório salicilato de sódio sobre o ramo da resposta a proteínas mal dobradas mediado por ATF6.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do salicilato de sódio sobre a ativação e localização subcelular de ATF6;
2. Investigar o mecanismo pelo qual o salicilato de sódio interfere na via de resposta às proteínas mal dobradas mediada por ATF6;
3. Analisar se os efeitos do salicilato de sódio sobre ATF6 também ocorrem para outros fatores de transcrição do tipo bZIP relacionados a ATF6;
4. Avaliar os efeitos do NaSal sobre a via de ATF6 em linhagens de células tumorais.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura de células

As células utilizadas neste estudo foram fibroblastos embrionários murinos (MEFs) SV40 imortalizados, WT e KO (para PERK ou ATF6), e as linhagens celulares HEK293 (rim embrionário humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); A549 (células epiteliais de carcinoma pulmonar humano). 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 foram gentilmente cedidas pelo 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 (100 µg/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 linhagens celulares, 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 linhagens celulares eram testadas quanto à presença de contaminação por micoplasma por meio de PCR. Culturas de células que estivessem contaminadas com micoplasma eram descartadas ou, quando necessário, tratadas com o fármaco antimicrobiano ciprofloxacino na concentração 10 µg/mL para o controle e eliminação dos micoplasmas. Após 15 dias de tratamento o ensaio de PCR era repetido para confirmar a eliminação dos micro-organismos.

4.1.1 Detecção de contaminação por micoplasma

Para a manutenção de estoques de linhagens celulares livres de contaminação por micoplasma, as células em cultivo foram rotineiramente testadas por meio de PCR (metodologia adaptada de Freshney, 2005). Durante um procedimento de repique, uma suspensão de células em meio DMEM era coletada em tubo de microcentrífuga e fervida a 100°C por dez minutos em termobloco para promover a lise das células. Os tubos eram centrifugados e 2,0 µL do lisado utilizado para a reação de PCR. Para cada 25 µL de reação eram adicionados 16,125 µL de água livre de nucleases; 2,5 µL de tampão da enzima polimerase (10 Buffer 10x, Phoneutria); 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM (Phoneutria); 0,5 µL de dNTPs 10 mM; 1,25 µL de oligonucleotídeo GPO3 (GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT); 1,25 µL de oligonucleotídeo MGSO (TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC); 0,125 µL de Taq DNA polimerase 5 U/µL (Phoneutria). O programa de termociclagem utilizado foi:

Repetições	Tempo	Temperatura
1x	5 minutos	94°C
35x	30 segundos	94°C
	30 segundos	55°C
	30 segundos	72°C
1x	5 minutos	72°C

Posteriormente à PCR, os produtos obtidos eram fracionados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo juntamente com peso molecular de 1 Kb e controle positivo e avaliadas quanto à presença ou ausência de contaminação com micoplasma pela visualização em transiluminador UV. As amostras positivas apresentavam banda de aproximadamente 270 pb.

4.2 Tratamentos das células

Em cada experimento uma solução 1,0 M de salicilato de sódio (Sigma-Aldrich) ou ácido acetilsalicílico (Sigma Aldrich) era preparada em água para injeção estéril. Para isso, o NaSal ou o AAS eram pesados em balança analítica de precisão e

então dissolvido com água estéril e livre de pirogênios até completa solubilização. O volume necessário para se obter a concentração de uso desejada 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 5 mg/mL em DMSO. O volume necessário para se alcançar a concentração de 3 µg/mL ou 5 µg/mL era adicionado ao meio contido nas placas de cultura de células. O mesmo procedimento foi realizado para os tratamentos com os outros indutores de estresse do RE e inibidor de proteassomo, sendo as concentrações dos estoques de 10 mM para taspigargina (Tg, Tocris Biosciences); 5 mg/mL para brefeldina A (BFA, Sigma Aldrich); 1 M para DTT (Promega); 50 mM para bortezomib (BMZ, Calbiochem) e as concentrações de uso 1 µM ou 500 nM (Tg); 5 µg/mL ou 1 µg/mL (BFA); 1 mM (DTT); e 10 µM (BMZ). O indutor de estresse do complexo de Golgi, nigericina (Sigma Aldrich), foi utilizada na concentração de 1 µM, obtida a partir do estoque com concentração de 5 mg/mL.

4.3 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 (Thermo Fisher) era imediatamente adicionado por poço. As placas foram armazenadas em freezer a -20° C até o dia da extração do RNA total. Posteriormente, foi seguido o procedimento de extração descrito pelo fabricante do reagente TRIzol. Após descongelamento, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e as amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram realizadas as etapas de separação de fases (utilizando-se clorofórmio), precipitação do RNA (utilizando-se isopropanol) e lavagem do RNA (utilizando-se etanol) conforme instruções do fabricante. Ao final, o RNA foi solubilizado em água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato) 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 μ L de cada amostra foi analisado em espectrofotômetro (Nanodrop Lite, ThermoFisher)

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) e utilizando-se dNTPs e oligodT.

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 (foram utilizados kits das marcas Thermo Scientific e BioRad – Maxima SYBR Green Master Mix e IQ SYBR Green Supermix, respectivamente) para um volume de 10 μ L por reação, tendo sido feitas duas réplicas técnicas para cada amostra. Foram utilizados pares de oligonucleotídeos específicos para os genes alvos *Atf6*, *Chop/Gadd153*, *Grp78/BiP*, *Pdia4*, *Hrd-1*, *Herpud-1*, *p58^{ipk}*, *Xbp-1* total, *Xbp-1* processado e para o gene referência *Rpl32* (ver Tabela 1), que foram obtidos no banco de dados Primerbank da Universidade Harvard (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). As reações foram realizadas em equipamento CFX-96 (BioRad) e as condições térmicas da PCR foram programadas de acordo com instruções específicas para cada master mix utilizado. Posteriormente a cada reação foram realizadas as etapas de obtenção da curva de dissociação (*melting curve*) dos oligonucleotídeos utilizados, conforme programação do equipamento. As curvas de dissociação dos iniciadores são apresentadas no Anexo A.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')
<i>Atf6α</i>	TCGCCTTTTAGTCCGGTTCTT	GGCTCCATAGGTCTGACTCC
<i>Atf6β</i>	TGGAGCAGGATGTCCCGTT	CTGTGGAAAGATGTGAGGACTC
<i>Grp78/BiP</i>	TGGTATTCTCCGAGTGACAGC	AGTCTTCAATGTCCGCATCC
<i>Gadd153/Chop</i>	TGCAGTCATGGCAGCTGAGTC	TAGAACTCTGACTGGAATCTG
<i>Pdia4</i>	TCCCATTGCTGTAGCGAAGAT	GGGGTAGCCACTCACATCAAAT
<i>Herpud-1</i>	GCAGTTGGAGTGTGAGTCG	TCTGTGGATTCAGCACCCCTTT
<i>p58^{pk}</i>	GGCGCTGAGTGTGGAGTAAAT	GCGTGAAACTGTGATAAGGCG
<i>Hrd1</i>	CGTGTGGACTTTATGGAACGC	CGGGTCAGGATGCTGTGATAAG
<i>Xbp-1 total</i>	AAGAACACGCTTGGGAATGG	ACTCCCCTTGGCCTCCAC
<i>Xbp-1 processado</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
<i>Rpl32</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG	TGACTGGTGCCTGATGAACT
<i>HRD1</i> (humano)	CTTCACCGTTTTTCGGGATGA	CCAGGAGGAACATAAGAGAGACA
<i>RPL32</i> (humano)	GCCCAAGATCGTCAAAAAGAGA	TCCGCCAGTTACGCTTAATTT

4.4 Plasmídeos para expressão de EGFP-ATF6, V5-OASIS-HA, V5-CREBH-HA e manosidase II

A expressão forçada de ATF6 em fusão à proteína verde fluorescente EGFP, em MEFs ou células HEK293, para realização dos ensaios de *western blot* ou gene repórter de luciferase, foi alcançada ao se transfectar as células com o plasmídeo pEGFP-ATF6 (adquirido na Addgene, código #3295547) utilizando-se polietilenoimina (PEI, Polysciences) como reagente de transfecção. Nos experimentos de microscopia de fluorescência, MEFs ou células HEK293 eram transfectadas com o plasmídeo pCMVshort-EGFP-ATF6, fornecido pelo Dr. Mori (Universidade de Kyoto, Japão) (Nadanaka et al., 2007). A expressão de manosidase II em fusão à proteína vermelha fluorescente (RFP, do inglês *red fluorescent protein*) monomérica de desempenho robusto (mRuby2) foi possível pela transfecção de células com o plasmídeo mRuby2-MannII obtido da Addgene (código #55903). Os plasmídeos utilizados para induzir a expressão de V5-OASIS-HA ou V5-CREBH-HA foram fornecidos pelo Dr. Peter O'Hare (Imperial College, Londres,

Inglaterra) (Stirling e O'Hare, 2006) e foram transfectados em células HEK293 utilizando-se também PEI como reagente de transfecção.

4.5 Western Blot

Obtenção dos extratos celulares

Para a obtenção de extratos celulares totais, após a remoção do meio as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado. Em seguida foi adicionado PBS-EDTA 1 mM e as células dissociadas foram coletadas em tubos de microcentrífuga. Após centrifugação a 600 x g por cinco minutos, o sobrenadante dos tubos foi descartado e o *pellet* de células foi lisado com tampão 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). Após incubação em gelo por trinta minutos, os extratos celulares foram clarificados por centrifugação a 12000 x g por 15 minutos.

O fracionamento dos extratos em citoplasmático e nuclear foi realizado em algumas análises. Para tanto, após duas lavagens com PBS 1X, tampão contendo HEPES pH 7,9 20 mM; KCl 10 mM; EDTA 1mM; EGTA 1mM; DTT 1mM; NP-40 0,25% e inibidores de protease como descrito acima foi adicionado diretamente às placas contendo as células. Após dez minutos de incubação em gelo, os extratos foram centrifugados a 14000 x g por um minuto. O sobrenadante obtido continha a fração citoplasmática, que foi transferida para novo tubo. Para o fracionamento dos núcleos, após lavagem da monocamada de células com PBS 1X, tampão contendo sacarose 320 mM; HEPES pH 7,4 10 mM; MgCl₂ 5 mM e 1% de Triton X-100 foi adicionado às placas. Após incubação por dez minutos no gelo e centrifugação a 2000 x g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os núcleos das células foi lisado com tampão contendo HEPES pH 7,9 20 mM; NaCl 420 mM; EDTA 1mM; EGTA 1mM; DTT 1mM; 25% de glicerol e inibidores de protease, por vinte minutos em gelo. O extrato nuclear foi coletado após centrifugação a 14000 x g por cinco minutos.

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 a cinquenta microgramas dos extratos celulares (quantificados utilizando-se o reagente de Bradford – BioRad), 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 de polifluoreto de vinilideno, PVDF (Immobilon-P, Merck Millipore), 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% Tween 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^o 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 ECL Western Blotting” (Thermo Scientific ou BioRad) 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. Após a exposição, o filme foi revelado (nas instalações do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens, CAPI – ICB/UFMG) utilizando-se as soluções de revelação e fixação.

Anticorpos

Os anticorpos primários específicos utilizados foram: anti-ATF6 α (código sc-22799, Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actina (clone AC-74, código A2228, Sigma-Aldrich), anti-V5 (código 46-0705, Invitrogen) e anti-lamina B (código sc-6216, Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos secundários utilizados estavam de acordo com a espécie animal em que foram produzidos, podendo ser coelho ou camundongo, das

marcas Cell Signalling (código #7074) ou Sigma-Aldrich (código A9044), respectivamente.

4.6 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 (código #11976). No dia anterior à transfecção, foram plaqueadas $0,5 \times 10^5$ a $0,8 \times 10^5$ células por poço 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, era 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 1 mg/mL: micrograma de DNA plasmideano). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram tratadas com salicilato de sódio ou os agentes indutores de estresse do RE por diferentes intervalos de tempo. Em alguns estudos, como no co-tratamento com salicilato de sódio e indutores de estresse do RE, as células foram pré-tratadas por uma hora com salicilato de sódio, seguido do tratamento com as outras substâncias. 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, 5 a 20 μ L do extrato celular foram transferidos para uma placa de 96 poços (FluoroNuncMaxiSorp, Nunc), na qual foram adicionados 40 μ l do reagente Luciferase Assay Reagent II (LAR II), seguido da captura da luminescência em luminômetro (Lumicount-Packard). Posteriormente, foram adicionados 40 μ l do substrato da *Renilla* (reagente Stop and Glo), realizando-se também captura e registro dos valores.

4.7 Microscopia de fluorescência

MEFs foram cultivados em lamínulas de 13 mm por 24 horas e transfectadas com 1 µg de pCMVshort-EGFP-ATF6 utilizando-se lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Nos experimentos de co-expressão de EGFP-ATF6 e manosidase II, células HEK293 foram simultaneamente plaqueadas e transfectadas. Após tripsinização e ressuspensão das células, elas foram incubadas em meio DMEM contendo 500 ng de pCMVshort-EGFP-ATF6, quantidades de 20 a 500 ng de mRuby2-MannII e lipofectamina 2000, sendo em seguida plaqueadas sobre lamínulas de vidro. Os tratamentos com NaSal e/ou DTT foram realizados 24 horas após a transfecção, seguida de fixação das células com paraformaldeído 1%, coloração dos núcleos com DAPI e montagem das lamínulas utilizando-se Vectashield. A fluorescência foi visualizada em microscópio Nikon Eclipse TI e os experimentos de co-localização foram analisados no microscópio Zeiss Apotome. Ambos equipamentos foram utilizados no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI- ICB/UFMG).

4.8 Análise por citometria de fluxo

Células HEK293 foram transfectadas com pEGFP-ATF6 e tratadas com NaSal e/ou DTT 24 horas após a transfecção. Ao término dos tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e raspadas das placas com um tampão contendo sacarose 320 mM; Hepes pH 7,4 10 mM; MgCl₂ 5 mM e 1% de Triton X-100, que promove o rompimento da membrana plasmática das células por lise hipotônica. Após incubação em gelo por dez minutos, os núcleos das células foram centrifugados a 2000 x g por cinco minutos e ressuspensos em tampão de mesma fórmula, porém sem adição de Triton X-100. Em seguida foi realizada a dissociação dos núcleos com o auxílio de uma seringa e sua integridade foi verificada por meio de coloração com trypan blue visualização em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. O citômetro utilizado nas análises foi um equipamento do modelo FACSCan da Plataforma de Citometria do ICB/UFMG.

4.9 Análise estatística

Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão do número de réplicas independentes indicadas em cada experimento. Para as análises estatísticas, o valor de p foi calculado por meio do teste t de Student não pareado ou ANOVA one-way seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 A expressão de ATF6 α , mas não ATF6 β , é induzida em células tratadas com salicilato de sódio

Para iniciar a caracterização dos efeitos do tratamento com salicilato de sódio (NaSal) sobre ATF6, os níveis do RNA mensageiro (mRNA) de ATF6 α foram quantificados por RT-qPCR em amostras coletadas de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) tratados por diferentes intervalos de tempo com concentrações crescentes do fármaco (Figura 4). No estudo de cinética (Figura 4a), observamos que a expressão de ATF6 α é induzida pelo NaSal 20 mM. Ainda, observamos que essa expressão é crescente de quatro a oito horas pós-tratamento e se mantém constante e em níveis semelhantes aos presentes em células tratadas com o agente indutor de estresse tunicamicina (3,0 μ g/mL) nos intervalos de 12 e 24 horas de tratamento. Ao serem testadas doses crescentes de NaSal por um intervalo de 12 horas (Figura 4b), é evidenciado que os níveis de mRNA de ATF6 α são semelhantes em células tratadas com as concentrações de 5, 10 e 20 mM de NaSal.

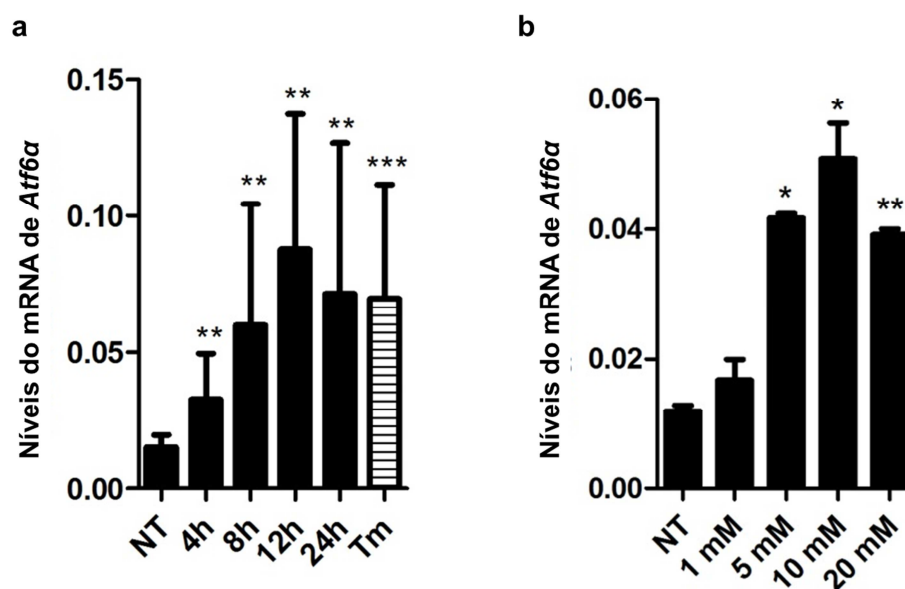


Figura 4 – Quantificação dos níveis de mRNA de ATF6 α em MEFs tratados com NaSal. (a) MEFs foram tratados com NaSal 20 mM pelos tempos indicados ou com 3 μ g/mL de tunicamicina (Tm) por oito horas. RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol e as PCR quantitativas em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas após a síntese do cDNA. (b) MEFs foram tratados por doze horas com as concentrações indicadas de NaSal e os níveis de mRNA foram quantificados por RT-qPCR. N = 3 para cada experimento e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão. *, ** e *** indicam

diferença estatisticamente significativa em relação às células não tratadas ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), determinado pelo teste T de Student.

ATF6 α e ATF6 β , apesar de possuírem grande similaridade estrutural, diferem entre si em suas porções N-terminais, mais especificamente no domínio de ativação transcricional. Dessa forma, apesar de ambos os fatores de transcrição se ligarem a elementos regulatórios de genes responsivos ao estresse do RE, somente ATF6 α é capaz de ativar eficientemente a transcrição de genes que contém o elemento regulatório ERSE em suas regiões promotoras. Por outro lado, evidências sugerem que N-ATF6 β possa atuar como repressor da atividade de N-ATF6 α , na medida em que a formação de heterodímeros entre esses dois fatores de transcrição reduz a ativação de ERSE mediada por N-ATF6 α (Thuerauf et al., 2004; Thuerauf et al., 2007). Tendo em vista as diferenças funcionais entre ATF6 α e ATF6 β e o mecanismo regulatório descrito, seria possível que o aumento da expressão de ATF6 α levasse também a um aumento compensatório de expressão de ATF6 β . Ao avaliarmos comparativamente os níveis de mRNA de ATF6 α e ATF6 β em MEFs tratados com NaSal 20 mM por oito horas, utilizando iniciadores específicos para cada isoforma de ATF6, observamos que a expressão de ATF6 β é reprimida nessas células. A Figura 5 reproduz o que foi encontrado na Figura 4 em relação ao aumento da expressão de ATF6 α em células tratadas com NaSal, porém os níveis do mRNA de ATF6 β nos MEFs tratados com NaSal são significativamente reduzidos ($p < 0,01$) quando comparados àqueles quantificados em MEFs não tratados.

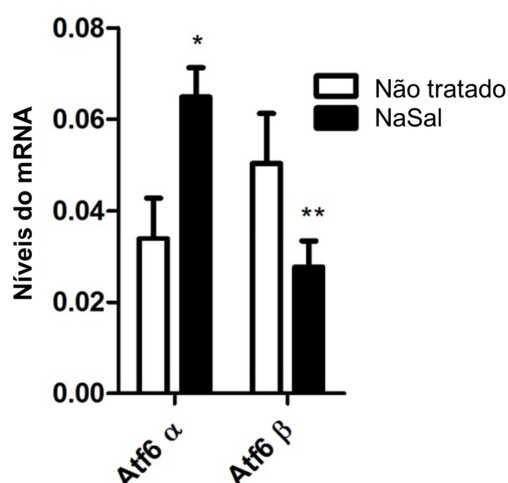


Figura 5 – Quantificação dos níveis de mRNA de ATF6 α e ATF6 β durante tratamento com NaSal. Amostras de cDNA de MEFs selvagens tratados com NaSal 20 mM por oito horas foram analisadas quanto à expressão de Atf6 α e Atf6 β utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para cada gene. N = 3 para cada análise e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação às células não tratadas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), determinado pelo teste T de Student.

Considerando que PERK exerce papel na expressão e ativação de ATF6 α durante a resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE) (Teske *et al.*, 2011), MEFs selvagens (WT) e deficientes de Perk (Perk KO) foram tratados com NaSal 20 mM ou tunicamicina 3,0 $\mu\text{g/mL}$ por oito horas para quantificação dos níveis de mRNA. Como esperado, o tratamento com tunicamicina induziu a expressão de ATF6 α somente nas células selvagens, sendo os níveis detectados nas células Perk KO tratados com tunicamicina semelhantes àqueles das células não tratadas. Supreendentemente, a expressão de ATF6 α foi induzida nos MEFs Perk KO, sendo os níveis de mRNA quantificados semelhantes aos observados nos MEFs WT (Figura 6). Esse achado indica que a expressão de ATF6 α induzida pelo tratamento com NaSal ocorre de maneira independente de Perk, o contrário do que é observado durante a resposta ao estresse do RE.

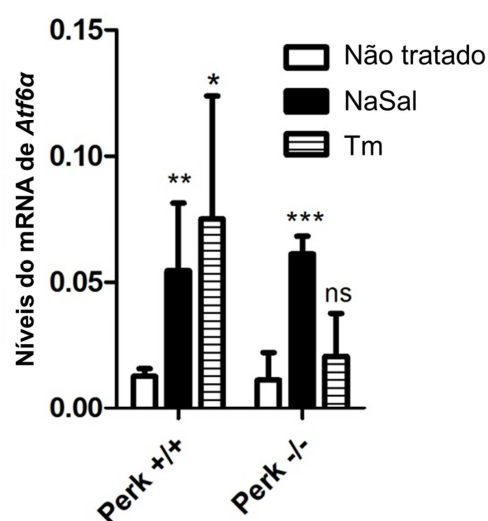


Figura 6 – Expressão de ATF6 α em MEFs WT e Perk KO tratados com NaSal e tunicamicina. MEFs selvagens ou deficientes de Perk foram mantidos sem tratamento ou tratados com NaSal 20 mM ou Tm 3 μ g/mL por oito horas. O RNA total foi extraído e a expressão de Atf6 α foi avaliada após a síntese do cDNA. N = 3 para cada análise e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação às células não tratadas ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), determinado pelo teste T de Student. ns indica diferença não significativa.

5.2 O tratamento com NaSal induz o acúmulo, mas não a clivagem de p90ATF6

Baseado nos resultados obtidos dos estudos de análise da expressão do mRNA de ATF6 α induzida por NaSal, decidimos examinar os níveis de acúmulo da proteína ATF6 α nos MEFs selvagens e nocautes para Perk. Como mostrado na Figura 7a, o tratamento com NaSal 20 mM por oito horas induz o acúmulo da proteína ATF6 α de maneira semelhante em MEFs WT e Perk KO, ao contrário do que ocorre para as células tratadas com tunicamicina 3,0 μ g/mL, que induz acúmulo de maneira dependente de Perk. Somente nos extratos de células tratadas com tunicamicina é possível observar a presença de duas bandas com altura próxima a 90 kDa, que correspondem às formas glicosilada (maior peso molecular aparente) e não glicosilada (menor peso molecular aparente) de ATF6 α , o que indica que o NaSal não altera o estado de glicosilação da proteína. Dados da literatura já demonstraram que a ativação de ATF6 α durante o estresse do RE é dependente de Perk (Teske *et al.*, 2011), o que foi reproduzido em nossos experimentos conduzido em MEFs WT e Perk KO tratados com tunicamicina. Intrigantemente, a forma ativada de ATF6 α , ou

seja, o fragmento aminoterminal clivado de 50 kDa, não foi detectada nas células tratadas com NaSal. A ausência de clivagem de ATF6 α no tratamento com NaSal também foi observada em células HEK293 transfectadas com EGFP-ATF6. A Figura 7b confirma a presença das formas glicosilada, não glicosilada e clivada (aproximadamente 80 kDa) de EGFP-ATF6 em células submetidas ao tratamento com tunicamicina 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a não ocorrência de inibição da glicosilação e a ausência de processamento de ATF6 após tratamento com NaSal 20 mM.

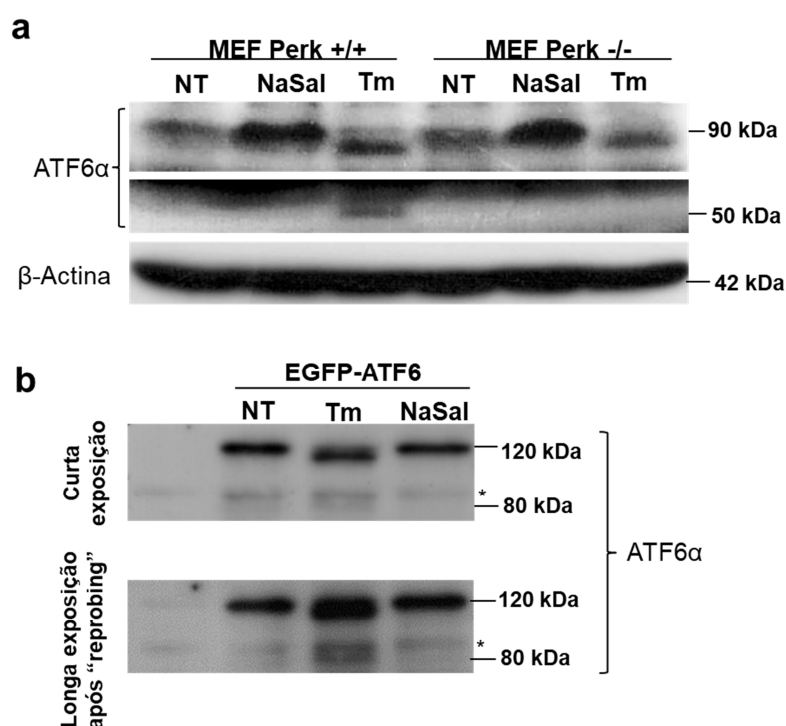


Figura 7 – Acúmulo da proteína e processamento de ATF6 α em células tratadas com NaSal. (a) MEFs selvagens e Perk KO foram mantidos sem tratamento (NT) ou tratados com NaSal 20 mM ou Tm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por oito horas. Após os tratamentos os extratos celulares totais foram obtidos utilizando-se tampão RIPA e fracionados em gel de poli-acrilamida 10%. Ao final, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF que foram incubadas com anticorpos anti-ATF6 α e anti- β -actina. (b) HEK293 foram transfectados com o plasmídeo pEGFP-ATF6 e tratadas com NaSal 20 mM ou Tm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por oito horas. Os extratos celulares totais foram submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-ATF6 α . Asterisco indica banda inespecífica. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

5.3 A atividade transcricional de ATF6 α não é induzida pelo tratamento com salicilato de sódio

Por ser um fator de transcrição, a forma clivada de ATF6 α apresenta a habilidade de se ligar a elementos regulatórios presentes em genes responsivos ao estresse do RE. Tendo demonstrado que NaSal induz a expressão de ATF6 α assim como o seu acúmulo proteico, mas não a sua clivagem em quantidades detectáveis por *western blot*, decidimos avaliar a atividade transcricional de ATF6 por ensaio de gene repórter. MEFs foram transfectados com gene repórter da luciferase que contém cinco cópias de sítios de ligação a ATF6, o p5xATF6-GL3 (Wang et al., 2000), e foram posteriormente tratados com NaSal. Em células transfectadas com esse plasmídeo repórter que são posteriormente tratadas com um agente indutor de estresse de RE, ocorre o processamento de ATF6 α na sua forma ativa de 50 kDa (p50ATF6), que, por sua vez, se liga aos elementos de ligação de ATF6 α clonados no plasmídeo pGL3-basic. Com isso, a síntese da proteína luciferase é induzida de forma proporcional à quantidade de ATF6 α ativo presente na célula, o que torna possível a quantificação da atividade transcricional de ATF6 α . O resultado apresentado na Figura 8 demonstra que o tratamento com tunicamicina 3,0 μ g/mL por oito horas induz aumento da atividade transcricional de ATF6 α de 3 a 4 vezes em comparação com a atividade observada para células não tratadas. Por outro lado, o tratamento com NaSal não foi capaz de induzir aumento significativo na atividade transcricional de ATF6 α , o que corrobora os resultados apresentados anteriormente de que o tratamento com este fármaco não leva à clivagem e indução da atividade transcricional de ATF6 α . Assim, os resultados tomados em conjunto até o momento fornecem evidências que o NaSal induz a expressão de ATF6 α , porém sem acarretar em sua ativação nas células.

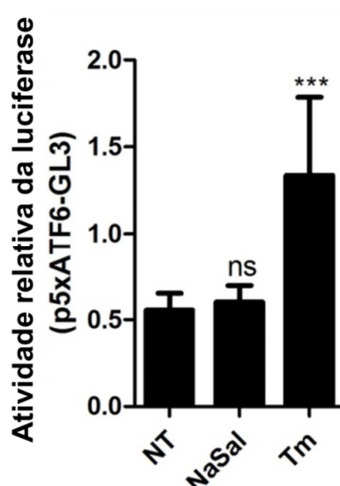


Figura 8 – Avaliação da atividade transcricional de ATF6 por ensaio de gene repórter em MEFs tratados com NaSal. MEFs foram transfectados com p5xATF6-GL3 e pRL-TK. Vinte quatro horas após a transfecção as células foram tratadas com NaSal 20 mM ou Tm 3 µg/mL por oito horas. Os extratos celulares foram obtidos com tampão de lise passiva (*passive lysis buffer*) e analisados quanto à atividade relativa de luciferase de vagalume e *Renilla*, utilizando-se o kit Dual Luciferase da Promega. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação às células não tratadas ($p < 0,001$), determinado pelo teste T de Student. ns indica diferença não significativa. N = 3 e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão.

5.4 Os níveis basais de mRNA de genes alvo de ATF6 α não são alterados após tratamento com NaSal

O papel chave de ATF6 α na UPR é atuar como fator de ativação da transcrição principalmente de genes que compõem o ERAD, para que a célula possa promover efetivamente a degradação de proteínas mal dobradas que estejam no lúmen do RE e de genes de chaperonas, para promover o dobramento mais eficiente dessas proteínas. Essas duas respostas são importantes para aliviar o estresse do RE e promover a sobrevivência celular (Wang e Kaufman, 2016; Lindholm et al., 2017). Uma vez que a indução da atividade transcricional de ATF6 não foi detectada por meio do ensaio de gene repórter em células tratadas com NaSal, nosso próximo passo foi avaliar a expressão de genes responsivos ao estresse do RE em MEFs selvagens e deficientes de ATF6 α tratados com NaSal. Os genes elencados para este estudo foram escolhidos seguindo-se dois critérios: (1) a relevância do seu papel como marcador da indução de estresse do RE (exemplos: *BiP*; *Chop*; *Xbp-1*); (2) a sua dependência em relação a ATF6 α como principal fator responsável pela sua ativação transcricional durante a UPR (exemplos: *Pdia4*; *Herpud-1*; *p58^{ipk}*; *Hrd-*

1). De forma a investigar o papel de ATF6 α na expressão destes genes no tratamento por oito horas com tunicamicina ou NaSal, os experimentos foram realizados em MEFs selvagens e deficientes de ATF6 α . Como esperado, a expressão de todos os genes avaliados encontra-se induzida em células selvagens tratadas com tunicamicina, mas esta indução é parcial ou totalmente dependente de ATF6 α para todos os genes, com exceção de *Xbp-1* (Figura 9g). Interessantemente, somente a expressão de *Chop* (Figura 9b) e *p58^{ipk}* (Figura 9e) são induzidas após o tratamento com NaSal em níveis comparáveis em MEFs WT e *Atf6 α* KO. Os níveis basais inalterados de mRNA dos demais genes nas células tratadas com NaSal são uma evidência adicional que este composto não induz a atividade transcricional de ATF6 α . A indução de *Chop* e *p58^{ipk}* está de acordo com o que foi descrito por Silva e colaboradores (2007) e Gentz e colaboradores (2013), que demonstraram que o tratamento com NaSal induz a ativação de Perk e fosforilação de eIF2 α (Silva et al., 2007) e a ativação transcricional do elemento regulatório ERSE presente no promotor de *Chop* (Gentz et al., 2013). O resultado mostrado na Figura 9h também confirma as observações de Silva e colaboradores (2007) de que o tratamento com NaSal não leva à ativação de IRE-1 e, portanto, não induz o processamento (*splicing*) de *Xbp-1*. Também é relevante destacar que os níveis de mRNA de *BiP*, considerado um marcador de estresse do RE, não estão aumentados durante o tratamento com NaSal, apesar da habilidade deste fármaco de induzir a ativação de PERK (Silva et al., 2007).

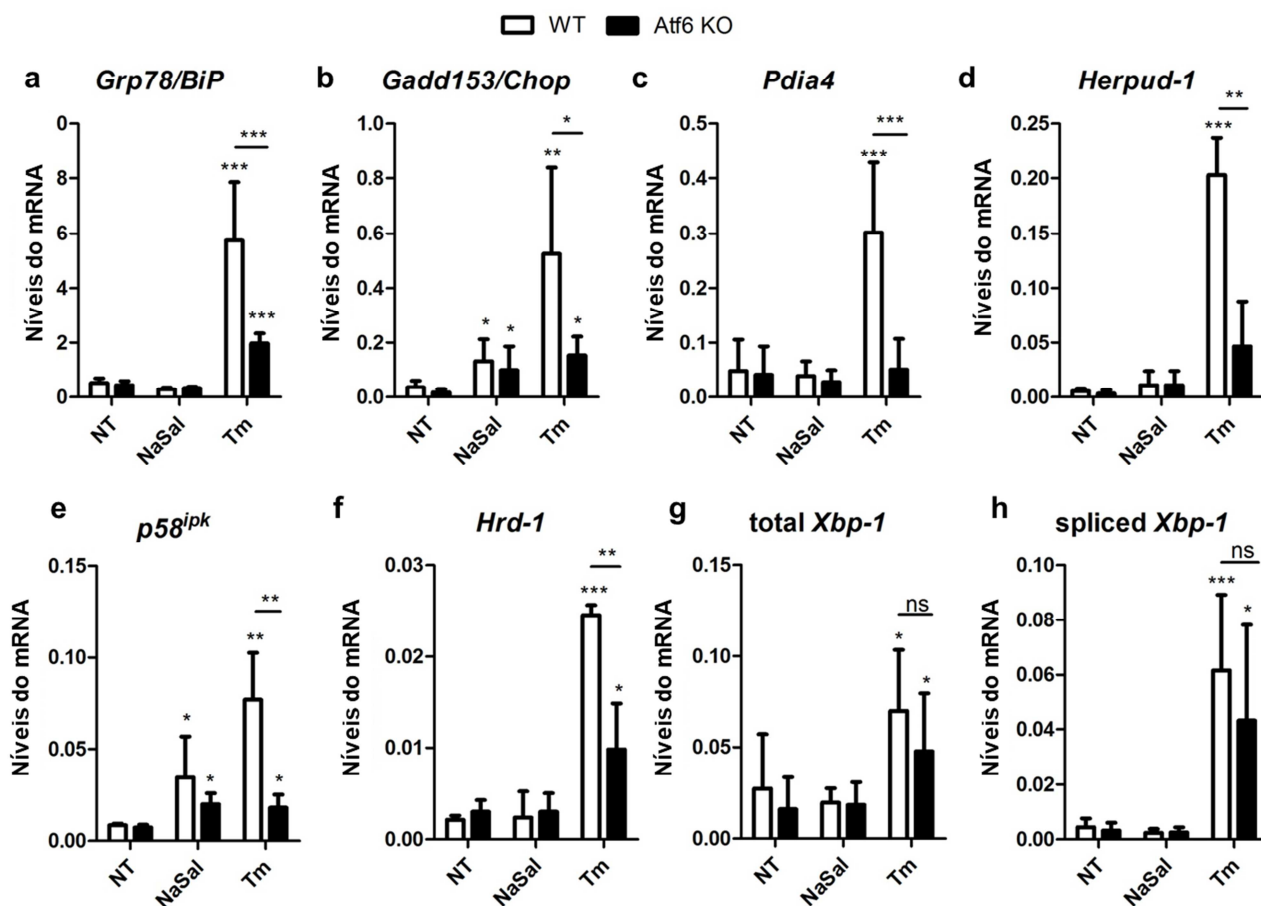


Figura 9 – Expressão de genes alvo da UPR em MEFs selvagens e deficientes de ATF6 tratados com salicilato de sódio. MEFs WT e deficientes de Atf6α foram tratados com NaSal 20 mM ou Tm 3 μg/mL por oito horas. RNA total foi extraído e os níveis de expressão de BiP/Grp78 (a), CHOP/Gadd153 (b), Pdia4 (c), Herpud-1 (d), p58^{ipk} (e), Hrd-1 (f), total Xbp-1 (g) e spliced Xbp-1 (h) foram quantificados por RT-qPCR após a síntese do cDNA. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação às células não tratadas ou quando são comparadas células WT e Atf6α KO (p<0,05; p<0,01 e p<0,001, respectivamente). Valores de p foram calculados por meio de análise ANOVA seguida de teste de Bonferroni. ns indica diferenças não significativas. N = 3 para cada análise e resultados estão plotados como média ± desvio padrão.

5.5 NaSal inibe a expressão de genes alvo de ATF6α induzida por agentes indutores de estresse do RE

Estudos conduzidos por Silva e colaboradores (2007) e Gentz e colaboradores (2013) sustentam evidências diretas que o salicilato de sódio exerce efeitos biológicos importantes sobre a via de estresse do RE ao inibir a tradução global de mRNAs e provocar a expressão de *Chop/Gadd153* de modo dependente de PERK (Silva et al., 2007) assim como em induzir a expressão de vários genes responsivos ao estresse do RE (Gentz et al., 2013). No entanto, nossos dados mostrados até o

momento indicaram que a via de estresse do RE mediada por ATF6 α não é ativada por NaSal, não confirmando nossa hipótese inicial de que o NaSal ativa Atf6 α .

Por outro lado, é desconhecido se a resposta de estresse do RE induzida por moléculas como tunicamicina é perturbada por NaSal. Assim, baseando-se nas evidências de Silva e colaboradores (2007) e Gentz e colaboradores (2013), hipotetizamos que o tratamento com NaSal tem efeito aditivo (ou talvez sinérgico) na expressão de genes responsivos ao estresse do RE induzida por agentes indutores do estresse do RE. Portanto, para testar esta hipótese, nós decidimos avaliar se a expressão de genes responsivos ao estresse do RE induzida por tunicamicina e mediada pelos três ramos da via UPR é alterada em MEFs que tenham sido previamente tratados com NaSal.

Os resultados (Figura 10) mostram que os níveis do mRNA de *Atf6 α* , *Chop/Gadd153* e *Xbp-1* processado e não-processado que encontram-se elevados em resposta ao tratamento por tunicamicina permanecem inalterados na presença de NaSal (Figura 10a-d). Entretanto, e de modo surpreendente, os níveis do mRNA de *Bip/Grp78*, *p58^{ipk}*, *Hrd-11*, *Herpud-1* e *Pdia4* induzidos por Tm foram encontrados significativamente reduzidos nas células que foram expostas ao NaSal (Figura 10e-i). Interessante notar que esses últimos são genes alvo de ATF6 α (Teske et al., 2011), sugerindo que NaSal inibe a atividade transcricional de ATF6 α durante o estresse do RE.

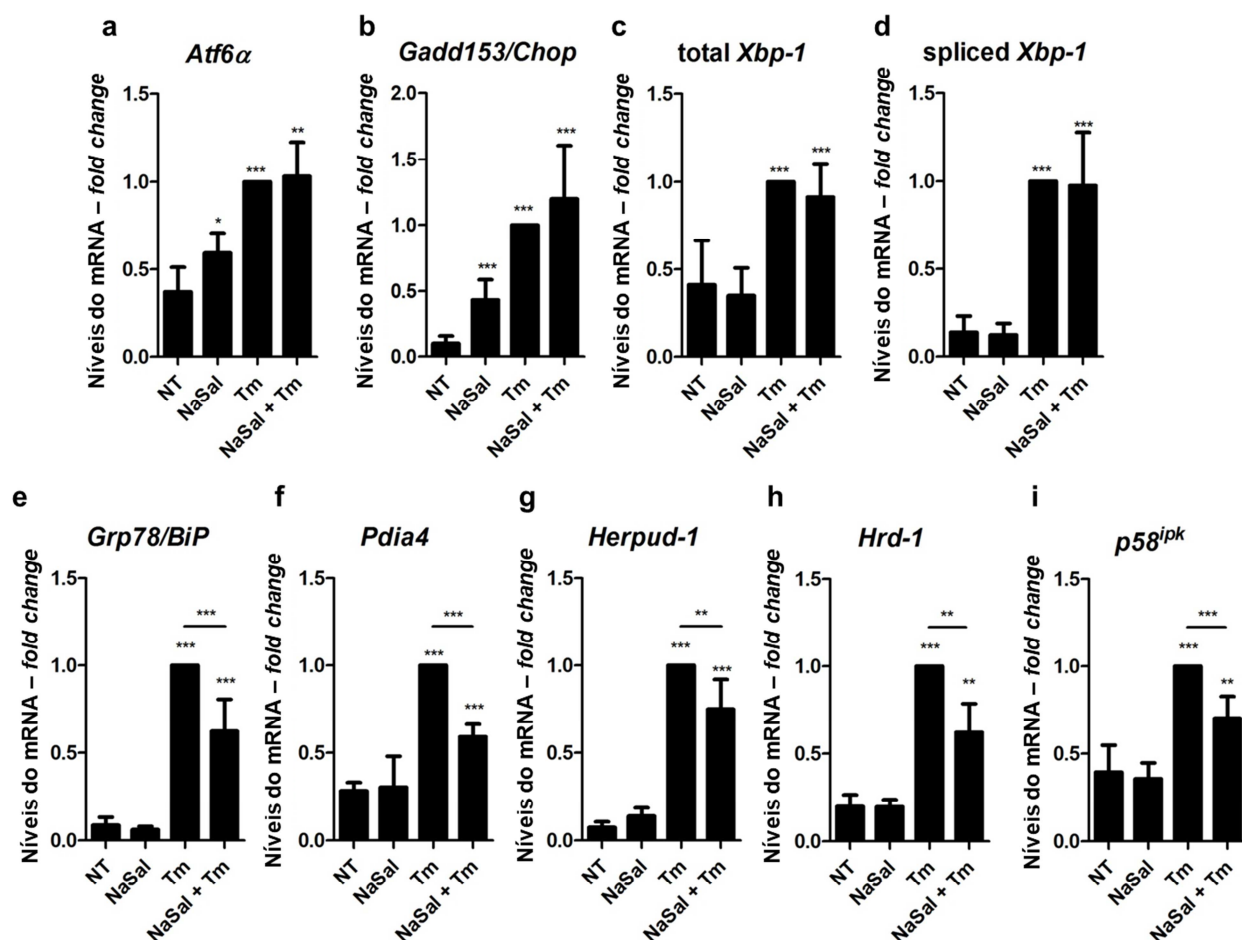


Figura 10 – Expressão de genes alvo da UPR em células co-tratadas com NaSal e tunicamicina. MEFs foram mantidos sem tratamento (NT) ou foram tratados com NaSal 20 mM por uma hora antes da adição de tunicamicina (Tm 3 µg/mL) ao meio de cultura. Após seis horas de tratamento ou não com Tm, o RNA total foi extraído e isolado para síntese do cDNA. Um grupo de células também foi tratado somente com NaSal 20 mM por sete horas e outro grupo somente com Tm por seis horas. A expressão de *Atf6α*, *Chop*, *total Xbp-1*, *spliced Xbp-1*, *BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1*, *Hrd-1* e *p58^{ipk}* foi avaliada por RT-qPCR. N = 3 para cada análise e *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), determinado pelo teste T de Student. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de *fold change*, tendo sido os níveis de mRNA normalizados em relação aos valores obtidos para as amostras tratadas apenas com Tm (considerado 100% de expressão).

Adicionalmente, os níveis de mRNA de *HRD1*, que foi um dos genes mais inibidos pelo co-tratamento, também foram avaliados em células HepG2 tratadas com NaSal e/ou tunicamicina ou tapsigargina. Como apresentado na Figura 11, os níveis do mRNA de *HRD1* são induzidos por esses agentes. No entanto, sua expressão foi fortemente inibida na presença de NaSal. Interessante comparar esse resultado aos obtidos anteriormente e mostrados na Figura 10 que o efeito de NaSal sobre a expressão de *HRD1* em células HepG2 é mais marcante que nos MEFs, o que

indica que os efeitos do NaSal sobre ATF6 também ocorrem em outras linhagens celulares.

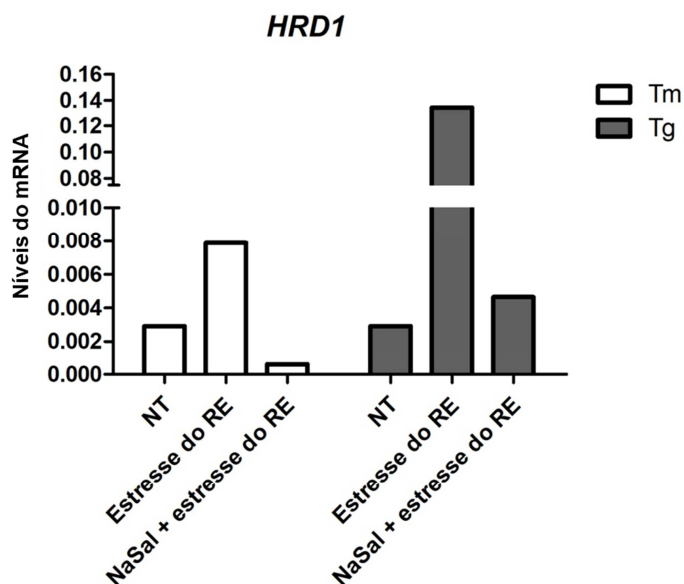


Figura 11 – Expressão de *HRD1* em células HepG2 co-tratadas com NaSal e agente indutor de estresse. Células HepG2 foram mantidas sem tratamento (NT) ou tratadas por uma hora com NaSal 20 mM, seguido de tratamento por vinte e quatro horas com tunicamicina (Tm 3 µg/mL) ou tapsigargina (Tg) 500 nM. Grupos de células também foram tratados somente com Tm ou Tg (controles positivos). Após o tratamento o RNA total das células foi extraído, o cDNA sintetizado e a expressão de *HRD1* foi avaliada por RT-qPCR. Este resultado é representativo de apenas um experimento.

5.6 A atividade transcricional de ATF6α induzida por agentes indutores de estresse do RE é inibida pelo tratamento com NaSal e AAS

Devido à inibição da expressão de genes alvo de ATF6α observada em células co-tratadas com NaSal e agentes indutores de estresse do RE, decidimos avaliar por estudos de gene repórter a atividade transcricional de Atf6a induzida por agentes indutores de estresse na presença de NaSal. Para tanto, MEFs selvagens transfectados com o plasmídeo p5xATF6-GL3 foram pré-tratados por uma hora com NaSal, sendo em seguida estimulados com quatro diferentes indutores de estresse do RE. Cada uma destas moléculas induz acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE por diferentes mecanismos, sendo eles a inibição da formação de pontes dissulfeto pelo DTT; a perturbação do transporte de cálcio através da membrana do RE pela tapsigargina; a retrotranslocação de proteínas do complexo

de Golgi pela brefeldina A; e a inibição da glicosilação pela tunicamicina. Como apresentado na Figura 12a, os tratamentos com indutores do estresse do RE causam um aumento de pelo menos quatro vezes na atividade transcricional de ATF6, sendo a maior indução, de aproximadamente oito vezes, causada pelo DTT. Surpreendentemente, a atividade transcricional de ATF6 induzida por qualquer um dos estímulos é praticamente abolida nas células que foram co-tratadas com NaSal. Além disso, o efeito inibitório também foi verificado em concentração duas vezes menor de NaSal (10 mM) (Figura 12b), e quando as células foram tratadas com aspirina 10 ou 5 mM (Figura 12c).

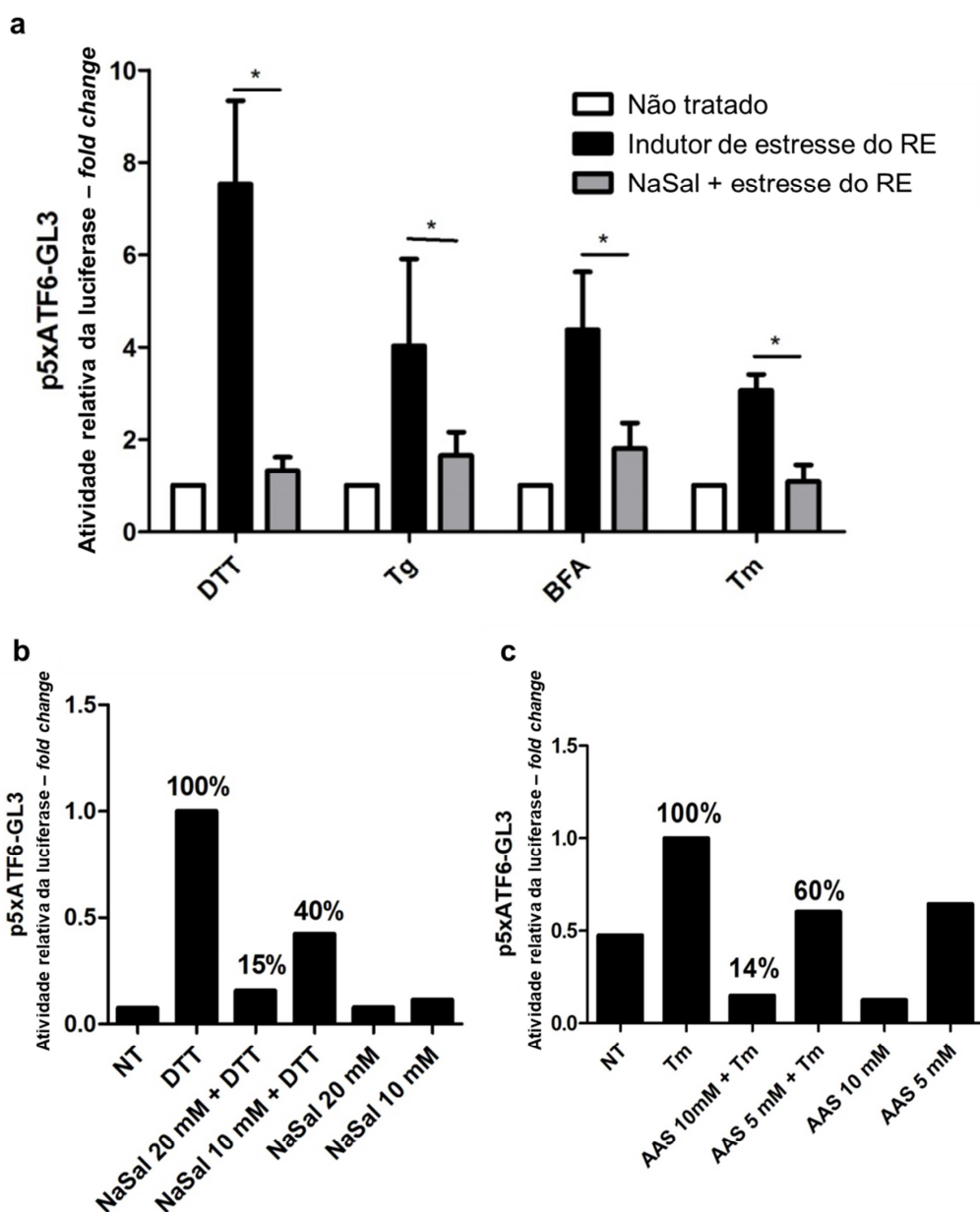


Figura 12 – Avaliação da atividade transcricional de ATF6 em MEFs co-tratados com NaSal ou aspirina e agentes indutores de estresse do RE. (a) Vinte e quatro horas após a transfecção com p5xATF6-GL3 e pRL-TK, MEFs foram mantidos sem tratamento ou pré-tratados por uma hora com NaSal 20 mM, e em seguida tratados por seis horas com Tm (3 µg/mL), DTT (1 mM), brefeldina A (BFA, 5 µg/mL) ou Tg (1 µM). Os extratos celulares foram coletados ao término dos tratamentos e a atividade de luciferase de vagalume e *Renilla* foi quantificada em luminômetro utilizando-se o kit Dual Luciferase (Promega). Os resultados estão apresentados como *fold* das leituras de atividade relativa (vagalume/*Renilla*) de células tratadas em relação a células não tratadas. O meio das células não foi trocado entre os diferentes tratamentos. N = 3 para cada tipo de tratamento. * indica diferença estatisticamente significativa entre células tratadas somente com indutor de estresse ou NaSal + indutor de estresse ($p < 0,05$), determinado pelo teste T de Student. (b) e (c) Células HEK293 foram transfectadas com p5xATF6-GL3 e pRL-TK e tratadas com NaSal 20 mM ou 10 mM e DTT 1mM (b) ou AAS 10 mM ou 5 mM e Tm 3 µg/mL como descrito em (a). Os resultados de atividade relativa da luciferase foram normalizados em relação aos valores obtidos para as amostras tratadas apenas com agente indutor de estresse (considerado 100% de atividade), e a porcentagem de atividade em células que foram pré-tratadas com NaSal ou AAS está indicada nos gráficos.

5.7 O bloqueio da atividade do proteassomo não afeta a inibição da ativação de ATF6 causada pelo NaSal

Dados da literatura demonstraram que a ativação e a atividade de ATF6 nas células podem ser reguladas por meio de diferentes mecanismos. Por exemplo, estudos anteriores indicaram que o tratamento com inibidores de proteassomo promove estabilização da forma N-terminal de ATF6, o que leva à manutenção de níveis mais elevados de ATF6 ativado nas células (Thuerauf et al, 2002; Yoshida et al., 2009). Considerando que Gentz e colaboradores (2013) constataram que o tratamento de MEFs com NaSal induz a expressão de diversos componentes das vias de ubiquitinação que medeiam a degradação de substratos pelo proteassomo, poderíamos supor que o mecanismo de inibição da atividade de ATF6 pelo NaSal fosse dependente da atividade do proteassomo nas células. De modo a verificar se a redução da atividade transcricional de ATF6 observada nas células tratadas com salicilatos poderia ser resultado de uma aceleração da degradação de N-ATF6 pelo proteassomo, experimento semelhante ao apresentado na Figura 12 foi realizado na presença e ausência do inibidor de proteassomo bortezomib (Figura 13). Foi observado que o tratamento com bortezomib por si só leva a um aumento da ativação de ATF6 em níveis equivalentes ao tratamento com DTT e que o co-tratamento com NaSal continua exercendo efeito inibitório concomitantemente à inibição do proteassomo.

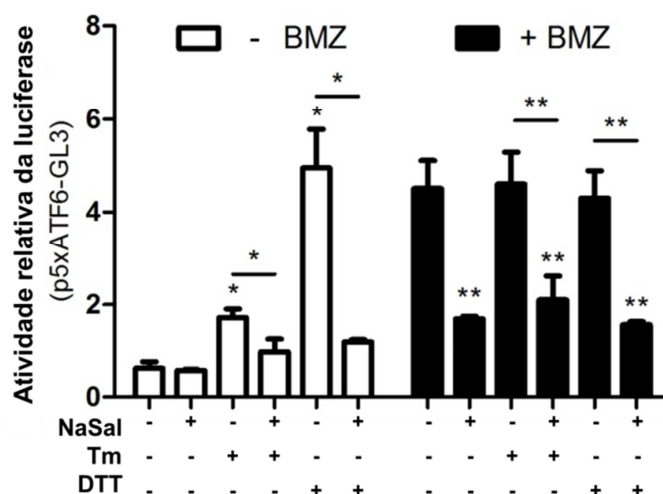


Figura 13 – Efeito da inibição do proteassomo pelo tratamento com bortezomib sobre bloqueio da atividade transcricional de ATF6 induzida pelo salicilato de sódio. Vinte e quatro horas após transfecção com p5xATF6-GL3 e pRL-TK MEFs foram tratados com Tm 3 μ g/mL ou DTT 1 mM por seis horas, precedido ou não de tratamento com NaSal 20 mM por uma hora. Onde indicado, os tratamentos foram realizados na presença de 10 μ M do inibidor de proteassomo bortezomib. Obtenção de extratos celulares e cálculos da atividade relativa da luciferase foram realizados como na Figura 8. * ou ** indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$, respectivamente), determinado por teste T de Student. N = 3 e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão.

5.8 O co-tratamento com NaSal não inibe a redução de glicosilação de ATF6 causada pela tunicamicina

Outro mecanismo de regulação da ativação de ATF6 nas células é a modificação do seu estado de glicosilação. ATF6 é uma glicoproteína, e em células sem estresse do RE, ela permanece com glicosilação total em três sítios Asn-X-Ser/Thr, localizados no seu domínio luminal. Porém, quando a resposta ao estresse do RE é ativada, esse estado de glicosilação é reduzido e contribui para o transporte até o complexo de Golgi e subsequente ativação da proteína. Uma forma com glicosilação reduzida pode ser detectada em células tratadas com tapsigargina, enquanto que o tratamento com tunicamicina, que é um inibidor de glicosilação, leva ao surgimento de uma forma de ATF6 completamente não glicosilada. Essa forma é facilmente detectada em ensaios de *western blot* devido à sua migração mais acelerada quando comparada à forma glicosilada. Para verificar se o tratamento com NaSal é capaz de alterar o estado de glicosilação de ATF6, extratos citossólicos de células HEK293 transfectadas com EGFP-ATF6 e tratados com NaSal e/ou tunicamicina foram analisados por *western blot*. A Figura 14 demonstra que o pré-tratamento com

salicilato de sódio seguido de tratamento com tunicamicina não bloqueia a inibição da glicosilação de ATF6 promovida pela tunicamicina, mas parece aumentar a proporção da forma glicosilada em relação à forma não glicosilada. Nas células co-tratadas também podem ser visualizadas duas bandas de alturas distintas, nas proximidades de 120 kDa, mas a banda de migração mais lenta é mais forte. Níveis de beta-actina foram também examinados para demonstrar que quantidades equivalentes de extratos foram carregadas e fracionadas no gel (Figura 14, painel inferior).

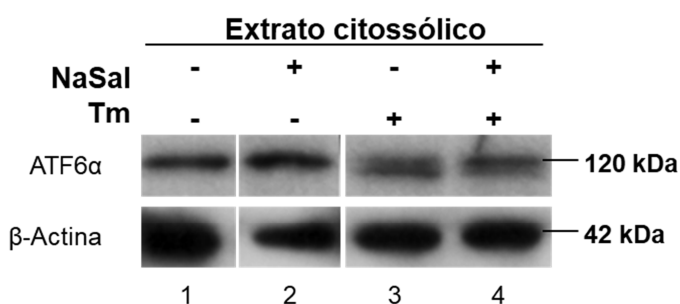


Figura 14 – *Western blot* de extrato citossólico de células HEK293 transfectadas com EGFP-ATF6 e tratadas com NaSal e/ou tunicamicina. Células HEK293 transfectadas com pEGFP-ATF6 foram mantidas sem tratamento (canaleta 1), tratadas somente com NaSal 20 mM por sete horas (canaleta 2), somente com Tm 5 μ g/mL por seis horas (canaleta 3) ou pré-tratadas com NaSal por uma hora e em seguida com Tm por seis horas (canaleta 4). Extratos celulares citoplasmáticos foram obtidos do sobrenadante coletado após centrifugação para separação dos núcleos e analisados com anticorpo anti-ATF6 α e anti- β -actina. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

5.9 A inibição da atividade transcricional de ATF6 α pelo NaSal é independente de PERK

Silva e colaboradores (2007) demonstraram que os salicilatos promovem a ativação de Perk, que resulta em fosforilação de eIF2 α e inibição da síntese proteica global das células de modo dependente de PERK. Uma vez que o mecanismo de inibição da atividade transcricional de ATF6 α pelo NaSal poderia ser resultado de uma diminuição da síntese global de proteínas celulares, realizamos ensaio de gene repórter da atividade transcricional de ATF6 α em MEFs deficientes de Perk. A Figura 15a demonstra que o tratamento com NaSal também promove a inibição da atividade transcricional de ATF6 α nas células nocautes para Perk tratadas ou não com tunicamicina, indicando que o mecanismo de inibição é independente desta proteína e portanto não relacionado à inibição da síntese proteica. Adicionalmente,

observamos que tanto nas células selvagens quanto nas células deficientes de Perk o tratamento com DTT induz a expressão dos genes *Hrd-1* e *Pdia4*, apesar de essa indução ocorrer em menores níveis nas células nocautes, provavelmente devido a níveis mais baixos de ATF6 nessas células (Teske et al., 2011 e resultados da Figura 7). Nessas condições, verificamos que o co-tratamento com NaSal também inibe a expressão de *Hrd-1* e *Pdia4* induzida pelo DTT nas células deficientes de Perk (Figura 15, painéis b e c), apontando que a ativação de PERK e a inibição da atividade transcricional de ATF6 pelo tratamento com NaSal ocorrem por mecanismos distintos e independentes.

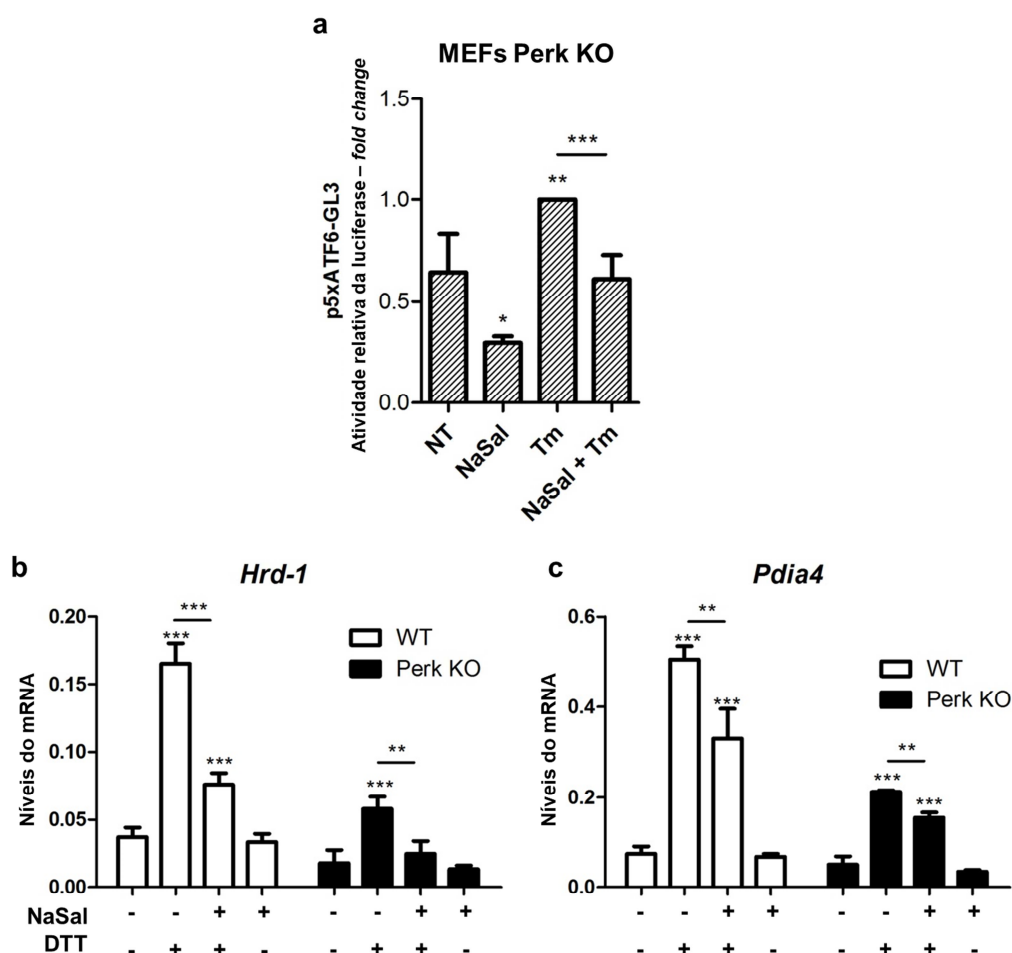


Figura 15 – Atividade transcricional e expressão de genes alvo da UPR dependentes de ATF6 α em células deficientes de Perk. (a) Vinte e quatro horas após transfecção com p5xATF6-GL3 e pRL-TK MEFs deficientes de Perk foram tratados com Tm 3 μ M por seis horas, precedido ou não de tratamento com NaSal 20 mM por uma hora. Um grupo de células foi tratado somente com NaSal 20 mM por sete horas. Os resultados de atividade relativa da luciferase foram normalizados em relação aos valores obtidos para as amostras tratadas apenas com Tm (considerado 100% de atividade). (b) e (c) MEFs WT e Perk KO foram tratados do mesmo modo que na Figura 10, porém utilizando-se DTT como agente indutor de estresse ao invés de tunicamicina. O RNA total foi isolado e a síntese do cDNA foi realizada para a análise dos níveis de expressão de *Hrd-1* e *Pdia4* por meio de RT-qPCR. **

ou *** indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$, respectivamente), determinado por teste T de Student. $N = 3$ e resultados estão plotados como média \pm desvio padrão.

5.10 EGFP-ATF6 não é translocado para o núcleo de células tratadas com NaSal

Uma vez que ATF6 é uma proteína residente do RE, mas que o seu mecanismo de ativação compreende etapas de transporte do RE para o complexo de Golgi e do complexo de Golgi para o núcleo, nosso próximo passo foi avaliar a localização subcelular de ATF6 em células tratadas com NaSal. Para isso, MEFs transfectados com EGFP-ATF6 foram tratados com NaSal e/ou DTT e visualizados em microscópio de fluorescência. Nos painéis da Figura 16 observa-se que a translocação de EGFP-ATF6 para o núcleo das células é evidente somente em células tratadas com DTT pelo intervalo de uma hora. Em células não tratadas ou tratadas somente com NaSal por duas horas, a fluorescência aparece principalmente de maneira dispersa no citoplasma das células, enquanto que no tratamento somente com DTT por dez minutos e nas células pré-tratadas com NaSal e em seguida tratadas com DTT a fluorescência parece estar concentrada em pontos bem definidos da região perinuclear.

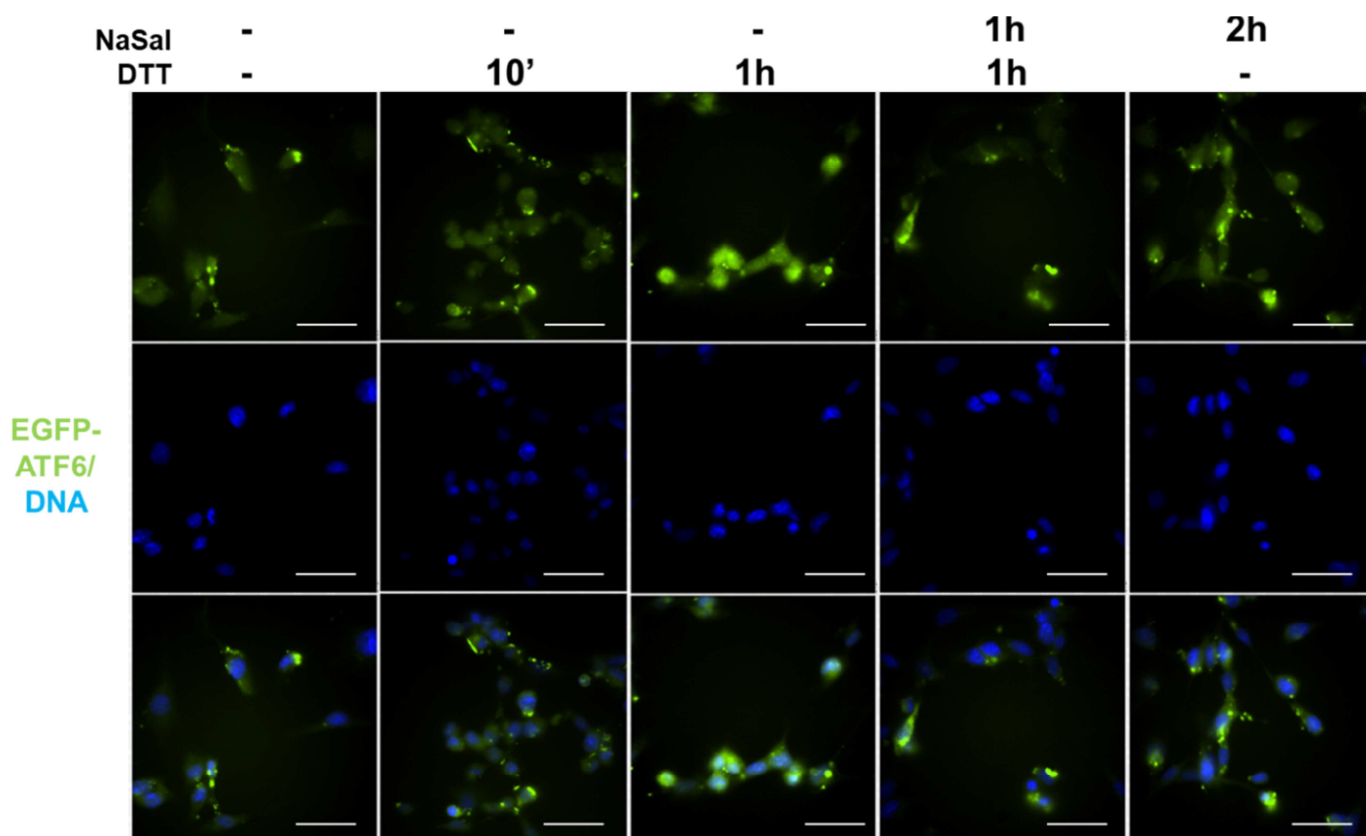


Figura 16 – Microscopia de fluorescência de MEFs transfectados com EGFP-ATF6. MEFs foram plaqueados sobre lamínulas de vidro e transfectados com 1 µg de pCMVshortEGFP-ATF6. Oito horas após a transfecção as células foram tratadas com NaSal 20 mM, DTT 1 mM ou uma combinação de ambos, pelos tempos indicados. Após os tratamentos as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, coradas com DAPI, e as lamínulas foram montadas utilizando-se Vectashield. A fluorescência foi visualizada sobre aumento de 600 vezes em microscópio de fluorescência. As barras brancas em cada painel indicam 50 µm.

De modo a fornecer evidências mais contundentes dos efeitos inibitórios de NaSal sobre a translocação nuclear de ATF6a, amparadas com análises quantitativas, nós conduzimos estudos de citometria de fluxo e *western blot*.

Para as análises de citometria de fluxo, células HEK293 foram transfectadas com EGFP-ATF6, tratadas com NaSal e/ou DTT e lisadas para obtenção de núcleos. Brevemente, após os tratamentos as células foram dissociadas das placas de cultura e submetidas a uma lise hipotônica com solução que manteve a integridade nuclear. Nos procedimentos realizados no citômetro de fluxo, os núcleos foram selecionados em *gate* correspondente de tamanho e granulosidade, e a partir deste *gate* foram obtidos histogramas de intensidade de fluorescência *versus* contagem de eventos. Observa-se nos painéis da Figura 17 que somente no tratamento com DTT houve detecção de núcleos com alta fluorescência (FL1 H: GFP maior que 10^2), o

que corrobora a ausência de translocação de ATF6 para o núcleo das células nos demais tratamentos.

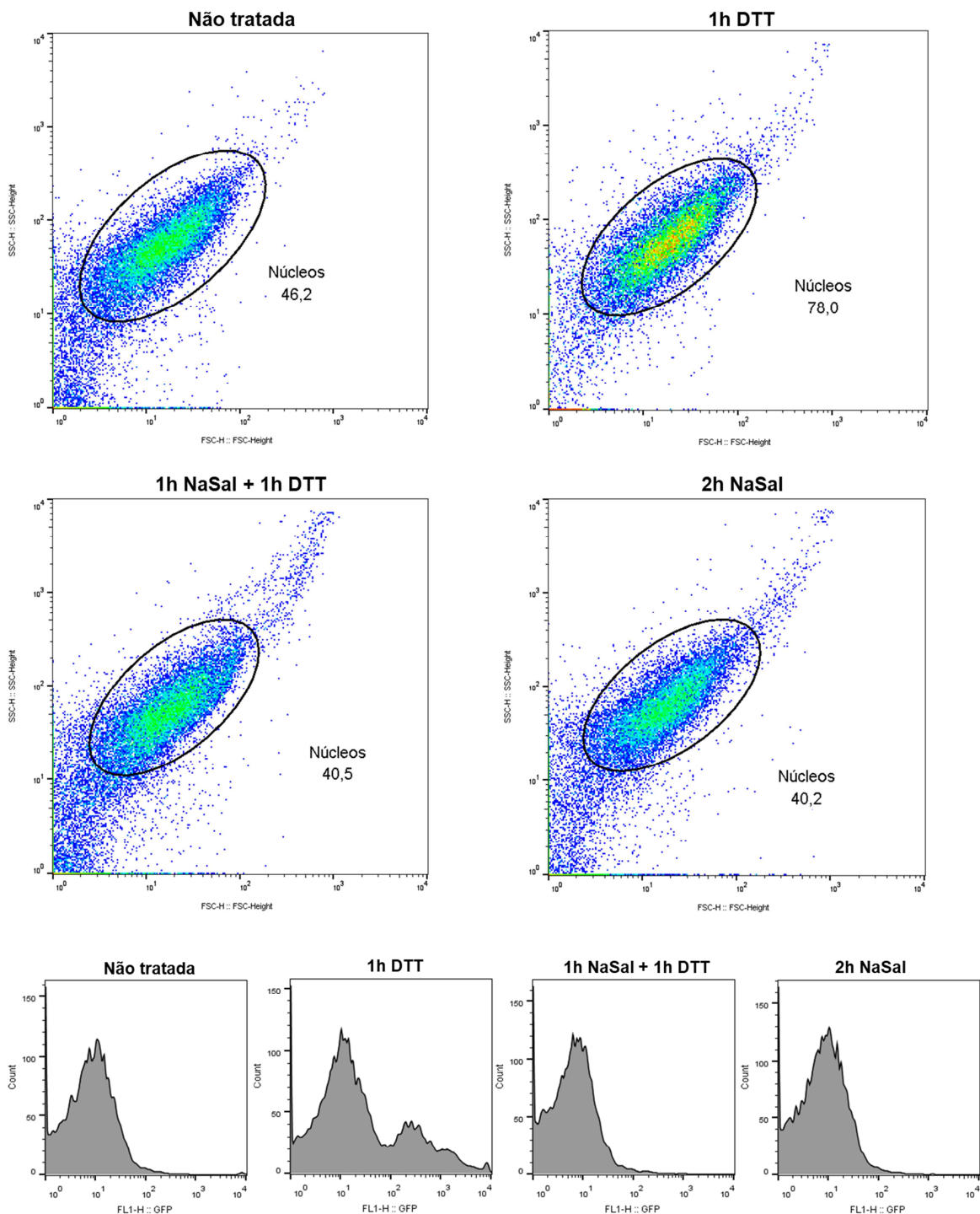


Figura 17 – Detecção de EGFP-ATF6 em núcleos de células tratadas com NaSal e/ou DTT. Células HEK293 foram transfectadas com pEGFP-ATF6 e tratadas com NaSal 20 mM ou DTT 1 mM pelos tempos indicados ou pré-tratadas com NaSal por uma hora e em seguida com DTT por mais uma hora. As células foram coletadas e lisadas com tampão de lise hipotônica para obtenção de núcleos para citometria de fluxo. Os núcleos foram obtidos após centrifugação e lavagem e foram analisados quanto à presença de fluorescência verde em um citômetro do modelo FACScan. Foram coletados 10.000 eventos dentro do *gate* estabelecido com base em tamanho e granulosidade e os resultados

de intensidade de fluorescência foram plotados em histogramas de intensidade versus contagem de eventos. Este resultado é representativo de três experimentos independentes.

Em outro experimento, os núcleos das células, ao invés de serem analisados no citômetro, foram lisados e os extratos nucleares obtidos foram utilizados em estudos de *western blotting*. Os resultados obtidos sustentam as evidências anteriores de que não ocorre translocação de N-ATF6 α para os núcleos de células tratadas com salicilato de sódio. Como pode ser observado na Figura 18, uma banda de aproximadamente 75 kDa, de maior intensidade, está presente somente nos extratos nucleares provenientes de células tratadas com DTT (painel superior, canaleta 4). Por outro lado, nessa mesma altura de migração relativa, as bandas de extratos nucleares provenientes de células expostas ao NaSal na presença ou ausência de DTT têm intensidade equivalente à de extratos nucleares obtidos de células controle não tratadas (canaletas 3 e 5). Além disso, a superexpressão de EGFP-ATF6 por si só induziu a ativação constitutiva de ATF6 α endógeno mesmo em células que não foram submetidas ao tratamento com DTT. Isso pode ser evidenciado pela presença de uma banda com intensidade elevada com migração relativa de 50 kDa (painel do meio, canaleta 2), condizente com o esperado para células nas quais ATF6 foi ativado. Banda de intensidade similar e na mesma altura ocorre nos extratos provenientes de células tratadas com DTT (painel do meio, canaleta 4), porém ela está ausente nos extratos de células tratadas somente com NaSal ou co-tratadas com NaSal e DTT. Níveis de lamina B foram examinados nos extratos nucleares desse experimento para demonstrar que quantidades equivalentes de extratos foram carregadas e fracionadas no gel (painel inferior).

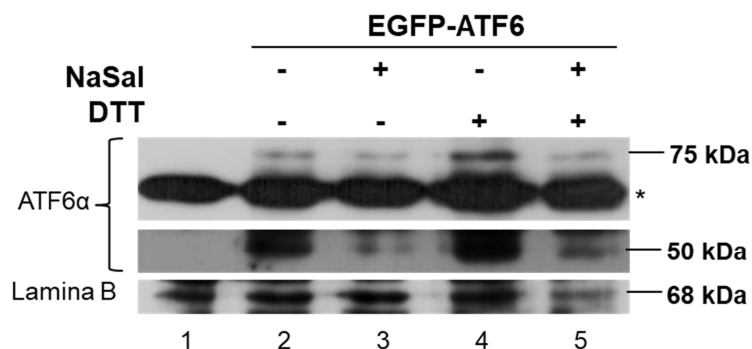


Figura 18 – Níveis proteicos de EGFP-ATF6 em núcleos de células tratadas com NaSal e/ou DTT. Núcleos de células HEK293 transfectadas com pEGFP-ATF6 e tratados com NaSal 20 mM e/ou DTT 1 mM (canaleta 1 = células não transfectadas e não tratadas; 2 = não tratadas; 3 = tratadas com NaSal por duas horas; 4 = tratadas com DTT por uma hora; 5 = tratadas com NaSal por uma hora e DTT por mais uma hora) foram obtidos seguindo-se o protocolo de citometria de fluxo, tendo sido lisados após a lavagem para obtenção de extratos nucleares. Os extratos foram analisados com anticorpo anti-ATF6 α e anti-lamina B após *western blotting*. O asterisco indica uma banda não específica. Este resultado é representativo de três experimentos independentes.

5.11 EGFP-ATF6 parece ser retido no complexo de Golgi em células tratadas com NaSal

Os dados apresentados na seção anterior demonstraram que em células tratadas com NaSal não ocorre o transporte de p50ATF6 para o núcleo das células e que este fármaco é capaz de inibir a clivagem e translocação nuclear de ATF6 induzidas pelo estresse do RE. Tendo em vista que o complexo de Golgi é a organela celular onde ocorre a clivagem de ATF6, o que resulta na sua dissociação da membrana e liberação do seu domínio N-terminal ativo, novos experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados com células HEK293 co-transfectadas com EGFP-ATF6 e o plasmídeo mRuby2-MannII, para a expressão da proteína marcadora de Golgi manosidase II vermelho-fluorescente. A expressão do marcador de Golgi permite visualizarmos se EGFP-ATF6 encontra-se nessa organela nas células tratadas com NaSal. As imagens apresentadas na Figura 19 sugerem que há co-localização da fluorescência de EGFP-ATF6 e manosidase II nas células submetidas ao tratamento por 30 minutos com DTT, e também no co-tratamento com NaSal e DTT. Por outro lado, em células controle (não-tratadas) ou que foram tratadas apenas com salicilato de sódio a fluorescência de EGFP-ATF6 permanece dispersa no citoplasma, sem indício de co-localização com o marcador de complexo de Golgi.

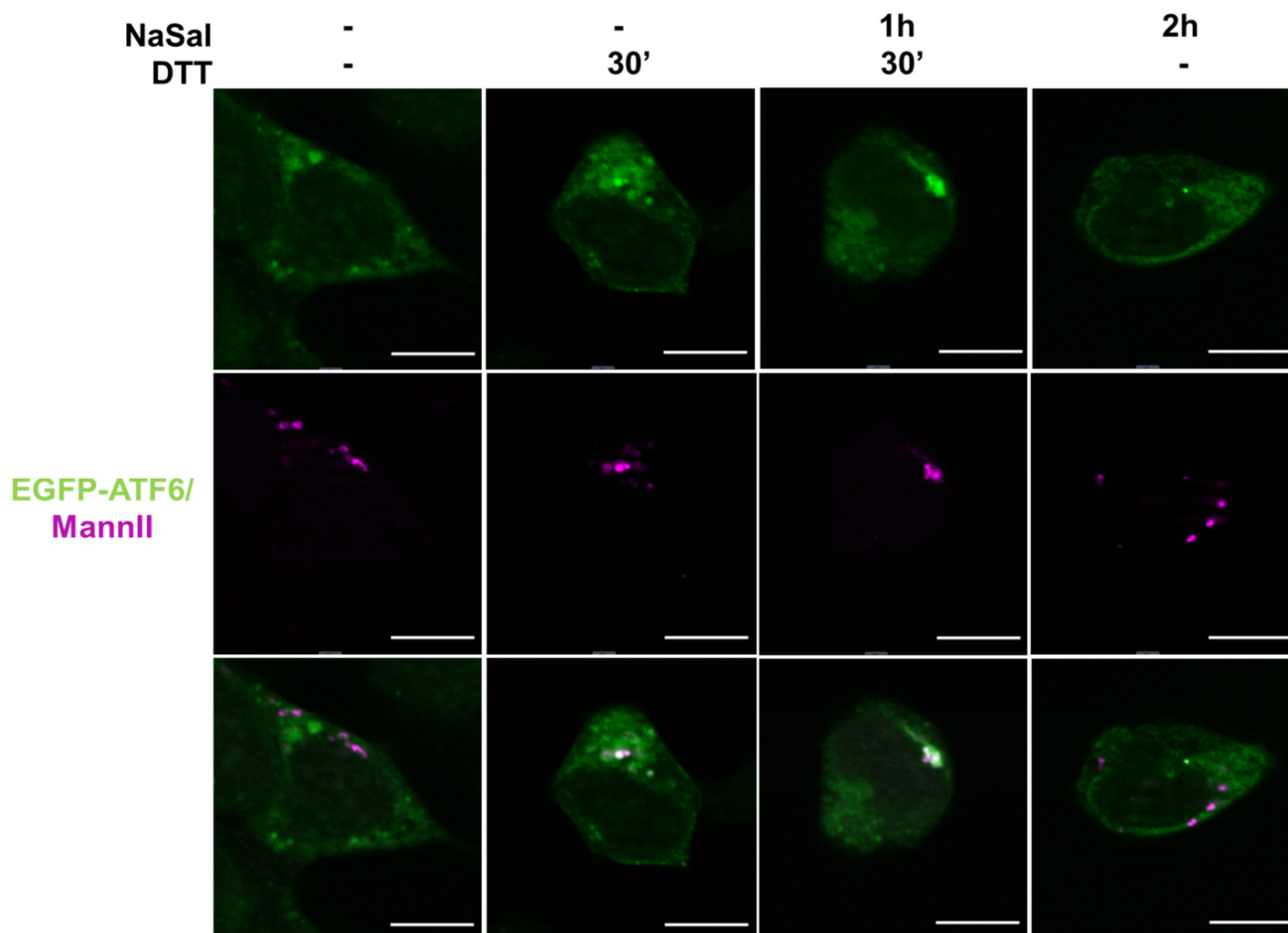


Figura 19 – Microscopia de fluorescência de células HEK293 co-transfectadas com EGFP-ATF6 e mRuby2-MannII e tratadas com NaSal e/ou DTT. Células HEK293 foram simultaneamente plaqueadas e transfectadas com 500 ng de pCMVshort-EGFP-ATF6 e 20 ng de mRuby2-MannII. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram mantidas sem tratamento ou tratadas com NaSal 20 mM e/ou DTT 1 mM pelos tempos indicados. Após os tratamentos as células foram fixadas com PFA 4% e montadas em lâminas utilizando-se Vectashield como meio de montagem. A visualização das células e captura de imagens foi realizada em microscópio de fluorescência Apotome. As barras brancas indicam 20 μ m. Resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Nos experimentos em que foram realizadas as transfecções para a co-expressão de EGFP-ATF6 e MannII não era visualizada a translocação de EGFP-ATF6 para os núcleos das células tratadas com DTT, independente da quantidade de manosidase II transfectada (Figura 20). Intrigados por esse fenômeno, nós decidimos avaliar por estudos de gene repórter (utilizando-se o plasmídeo p5xATF6-GL3) a atividade transcricional de ATF6 em células HEK293 que foram transfectadas com a manosidase II em quantidades reduzidas. O resultado (Figura 21) revela que extratos provenientes de células transfectadas com a manosidase II apresentam redução da atividade transcricional de ATF6 nas células, o que pode explicar, em parte, a não translocação de EGFP-ATF6 para o núcleo nas células co-transfectadas.

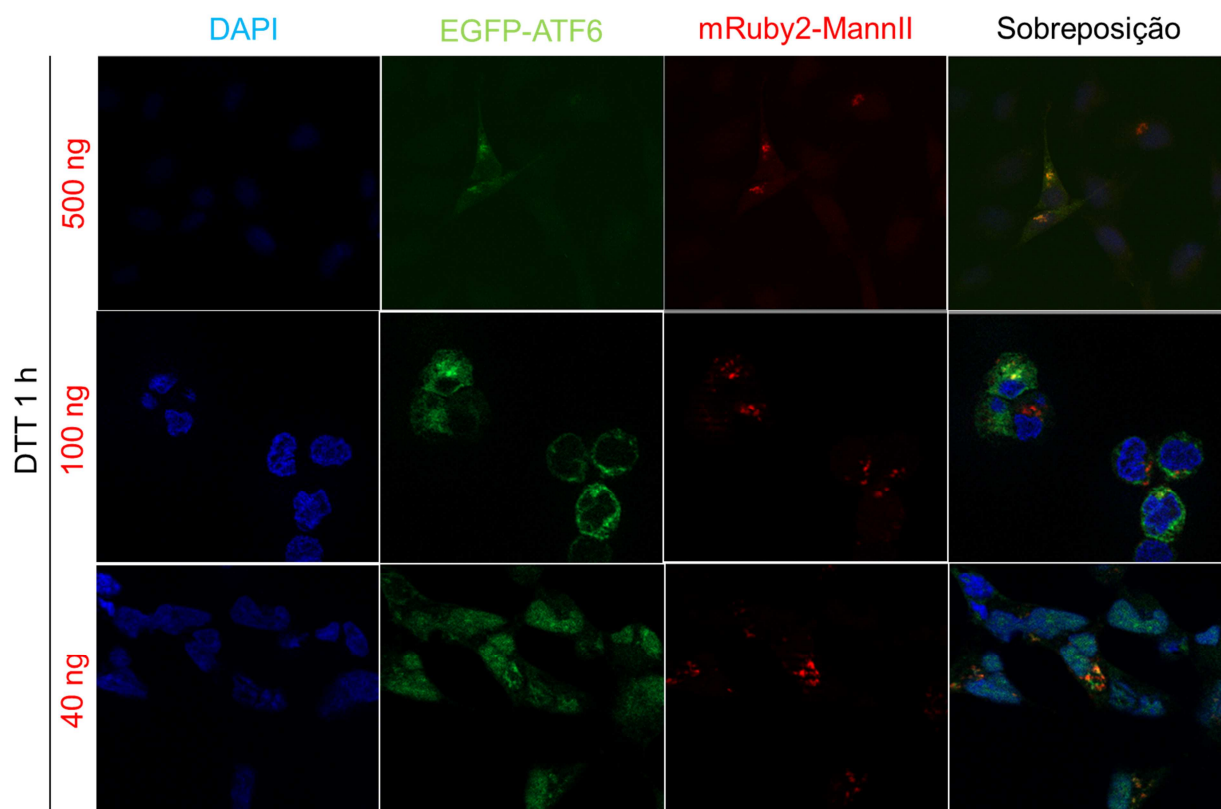


Figura 20 – Microscopia de fluorescência de células HEK293 co-transfectadas com EGFP-ATF6 500 ng e quantidades decrescentes de mRuby2-MannII e tratadas com DTT. Células HEK293 foram simultaneamente plaqueadas e transfectadas com 500 ng de pCMVshort-EGFP-ATF6 e 500, 100 ou 40 ng de mRuby2-MannII. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram mantidas sem tratamento ou tratadas com NaSal 20 mM e/ou DTT 1 mM pelos tempos indicados. Após os tratamentos as células foram fixadas com PFA 4% e montadas em lâminas utilizando-se Vectashield como meio de montagem. A visualização das células e captura de imagens foi realizada em microscópio de fluorescência Apotome.

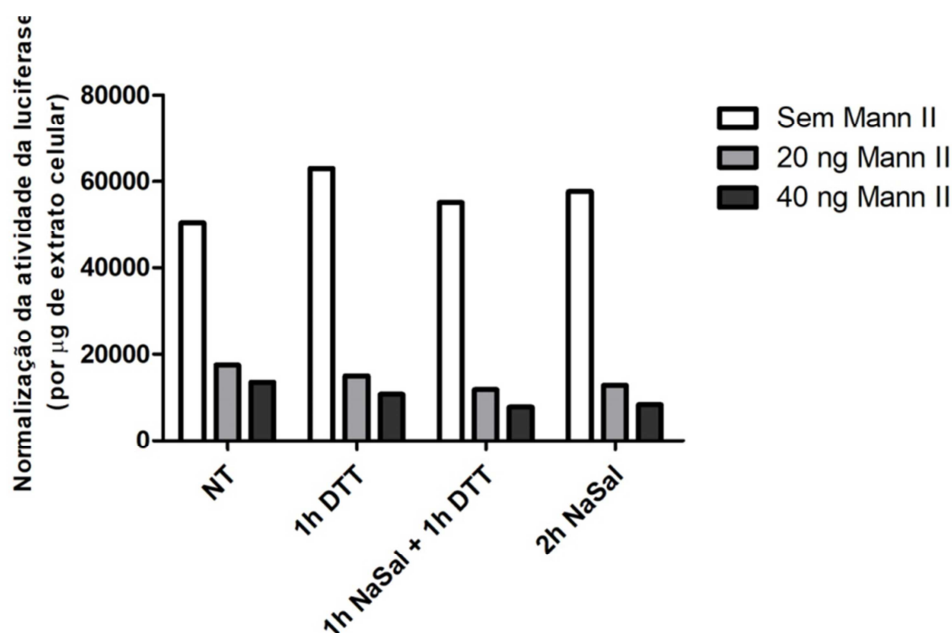


Figura 21 – Ensaio de gene repórter da atividade transcricional de ATF6 em células transfectadas com mRuby2-MannII. Células HEK293 foram transfectadas com plasmídeo mRuby2-MannII nas quantidades indicadas, p5xATF6-GL3 e pRL-TK. Após vinte e quatro horas de transfecção as células foram tratadas com NaSal 20 mM e/ou DTT 2 mM pelos tempos indicados e os extratos celulares foram coletados. A atividade da luciferase de vagalume foi avaliada como na Figura 8 e posteriormente normalizada em relação à concentração de proteínas nos extratos celulares ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que foi quantificada utilizando-se reagente de Bradford. Este resultado é representativo de apenas um experimento.

5.12 O tratamento com NaSal não afeta a ativação dos fatores de transcrição OASIS e CREBH induzida no estresse do RE

Tendo em vista que a ativação de ATF6 ocorre no complexo de Golgi, onde a proteína é clivada sequencialmente pelas proteases S1P e S2P, e que os estudos da sessão anterior sugerem que ATF6 α fica retido no Golgi de células tratadas com NaSal, hipotetizamos que o salicilato de sódio poderia atuar como um inibidor dessas proteases. De modo a se testar essa hipótese, células HEK293 foram transfectadas com plasmídeos para expressão de OASIS e CREBH, que são fatores de transcrição do tipo bZip relacionados a ATF6. As sequências de aminoácidos das duas proteínas cuja expressão é induzida por esses plasmídeos são etiquetadas *in frame* com os peptídeos V5 e HA em suas extremidades aminoterminal e carboxiterminal, respectivamente. Desse modo, essas construções tornam possível a detecção dessas moléculas em suas formas completas ou clivadas através de *western blot* utilizando-se anticorpos específicos para esses peptídeos. A

visualização das bandas correspondentes ao V5-OASIS-HA só foi possível seguindo-se o protocolo de obtenção de extratos nucleares, sendo utilizada lamina B para aferir que quantidades equivalentes de extratos proteicos foram fracionados no gel. Para CREBH, o protocolo regular de obtenção de extrato celular total como descrito na seção de metodologias foi utilizado e bem sucedido.

Na Figura 22a podemos observar pelas análises dos extratos celulares que níveis semelhantes de OASIS foram translocados para os núcleos de células tratadas somente com NaSal ou somente com tunicamicina. Curiosamente, a banda correspondente a OASIS apresenta intensidade mais elevada nos extratos nucleares provenientes de células co-tratadas com NaSal e tunicamicina. O painel b da Figura 22 mostra que a forma clivada de CREBH está presente nos extratos de células tratadas somente com NaSal. Além disso, o pré-tratamento com NaSal falha em inibir a clivagem de CREBH induzida pela brefeldina A. Considerando dados da literatura que já demonstraram que CREBH em sua forma ativada é capaz de se ligar ao elemento responsivo a ATF6 α presente na região promotora do plasmídeo p5xATF6-GL3, conduzimos estudo de gene repórter para examinar se o tratamento com NaSal exerce algum efeito sobre a atividade transcricional de V5-CREBH induzida pelo tratamento com brefeldina A. O resultado (gráfico da Figura 22c) corrobora o resultado do painel b ao indicar que há baixos níveis de CREBH transcricionalmente ativo em células tratadas somente com NaSal e que não há redução dos níveis de ativação de CREBH induzida pela brefeldina A em células expostas ao NaSal em relação àquelas que foram tratadas somente com brefeldina A. Neste ensaio a transfecção com EGFP-ATF6 foi utilizada como controle no lugar de se utilizar um plasmídeo vazio.

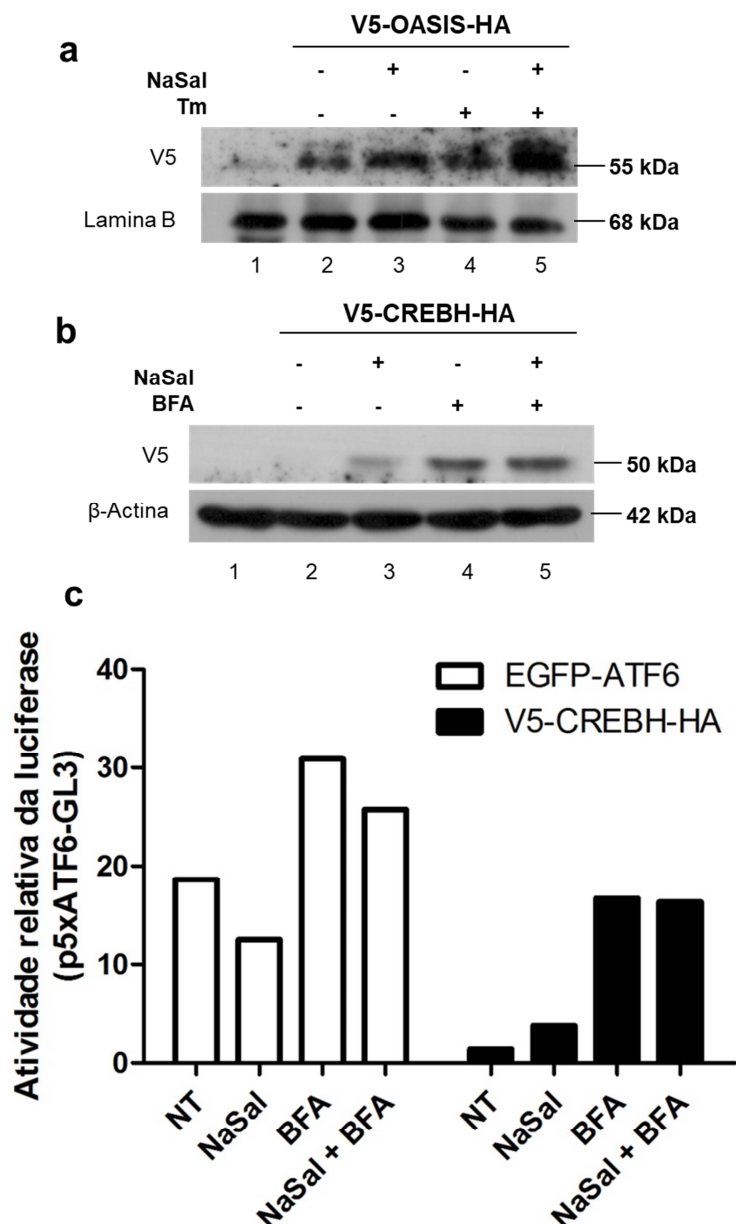


Figura 22 – Ativação de OASIS e CREBH em células tratadas com salicilato de sódio e indutores de estresse do RE. (a) Células HEK293 foram transfectadas com V5-OASIS-HA por vinte e quatro horas (canaletas 2 a 5). O meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo bortezomib (BMZ) 10 μ M e as células foram mantidas somente com BMZ (canaleta 2), tratadas somente com NaSal 20 mM por sete horas (canaleta 3), somente com tunicamicina (Tm, 5 μ g/mL) por seis horas (canaleta 4) ou pré-tratadas por uma hora com NaSal e em seguida por seis horas com Tm (canaleta 5). Núcleos celulares foram obtidos e processados como na Figura 18 e analisados com anticorpos anti-V5 e anti-lamina B. (b) Células HEK293 foram transfectadas com V5-CREBH-HA por vinte e quatro horas nos grupos indicados e tratadas com BMZ, NaSal e indutor de estresse como descrito em (a), substituindo-se Tm por brefeldina A (BFA). Os extratos celulares totais foram obtidos e analisados com anticorpo anti-V5 e anti- β -actina após *western blotting*. Resultados em (a) e (b) são representativos de dois experimentos. (c) Células HEK293 foram transfectadas com pEGFP-ATF6 ou V5-CREBH-HA adicionados a um mix de transfecção já contendo p5xATF6-GL3 e pRL-TK. Os tratamentos foram realizados da mesma forma que em (b), na presença de BMZ, e as amostras foram processadas para quantificação da atividade relativa da luciferase como na Figura 8. Este resultado é representativo de apenas um experimento.

5.13 A atividade transcricional de ATF6 induzida por tunicamicina é inibida em células tratadas com indutor de estresse de complexo de Golgi

Os resultados anteriores sugerem que o efeito do NaSal sobre a ativação de ATF6 α induzida por agentes de estresse do RE é exercido sobre a proteína que já foi transportada do RE e se encontra no complexo de Golgi. Ainda, é possível que os efeitos do NaSal sobre ATF6 α sejam resultado de perturbações da homeostase do Golgi que afetem especificamente a ativação deste fator de transcrição. Para testar esta hipótese, células HEK293 foram transfectadas com o plasmídeo p5xATF6-GL3 e posteriormente tratadas com NaSal ou nigericina, uma substância que perturba a homeostase do Golgi, seguido do co-tratamento com tunicamicina. O resultado apresentado na Figura 23 demonstra que a nigericina por si apenas causa um aumento discreto, porém estatisticamente significativo, da atividade transcricional de ATF6 α . No entanto, a atividade transcricional de ATF6 α é significativamente reduzida em aproximadamente 2 vezes em células que foram co-tratadas com nigericina e posteriormente estimuladas com tunicamicina. Tal redução da atividade de ATF6 α provocada pela nigericina é significativa, porém menos acentuada que aquela observada nas células co-tratadas com NaSal e tunicamicina.

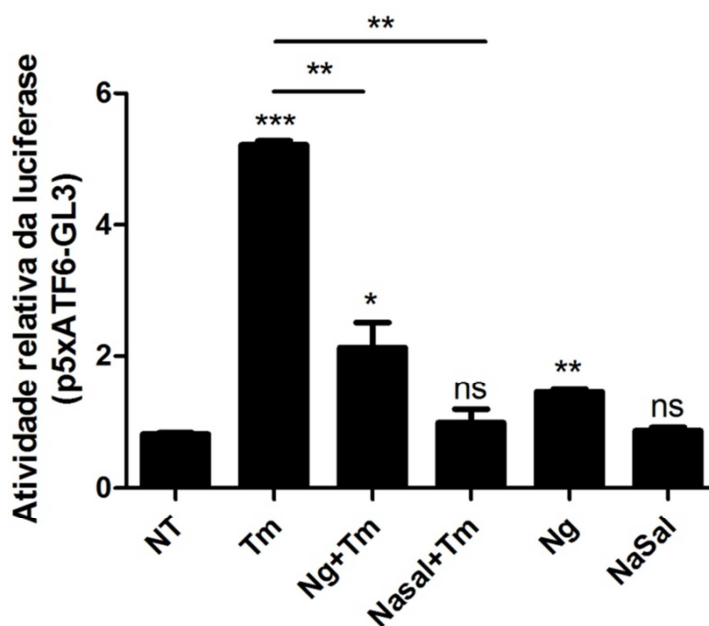


Figura 23 – Atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com nigericina, salicilato de sódio e/ou tunicamicina. Células HEK293 transfectadas com p5xATF6-GL3 e pRL-TK foram mantidas sem tratamento (NT) tratadas com NaSal 20 mM, tunicamicina (Tm, 3µg/mL) e/ou nigericina (Ng, 1 µM) de acordo com as combinações apresentadas no gráfico. O tratamento apenas com Ng ocorreu por oito horas, apenas com NaSal por sete horas e apenas com Tm por seis horas. Quando em combinação, o primeiro reagente ao meio de cultura foi utilizado em pré-tratamento por uma hora, seguido da adição do segundo reagente ao meio de cultura por seis horas. Obtenção dos extratos e avaliação da atividade relativa da luciferase foram realizados como na Figura 8. N = 2 e resultados são apresentados como média ± desvio padrão. ns indica indução não significativa em relação a NT e *, ** ou *** indicam diferenças significativas em relação a NT ou entre tratamentos quando sobre a barra (p<0,05; p<0,01 e p<0,001, respectivamente), determinado pelo teste T de Student.

5.14 O efeito inibitório do NaSal sobre a atividade transcricional de ATF6 também ocorre em linhagens de células tumorais

Os estudos com MEFs trazem vantagens como a possibilidade de se trabalhar com células nocautes (para Perk e Atf6α) que tem um bom crescimento em cultura e com isso facilitam estudos do papel de proteínas específicas em respostas celulares. As células HEK293, por sua vez, são também facilmente cultiváveis e têm alta taxa de transfecção, o que é favorável para a realização de estudos que dependem da expressão forçada de proteínas fluorescentes ou *taggeadas*, por exemplo. Por outro lado, MEFs e células HEK293, além de serem embrionárias, não têm características tecido-específicas, o que pode prejudicar a transposição de dados experimentais para tecidos com funções específicas. Desse modo, para descartar a possibilidade de o efeito do NaSal sobre a ativação de ATF6α ocorrer especificamente em MEFs

ou HEK293, e com o objetivo de investigar esses efeitos em linhagens de células tumorais, reproduzimos os ensaios de gene repórter da atividade transcricional de ATF6 α em células A549 (originária de carcinoma de células epiteliais alveolares) e HepG2 (originária de carcinoma hepatocelular). É possível observar na Figura 24 que a inibição da atividade transcricional de ATF6 pelo NaSal também ocorre nessas linhagens celulares.

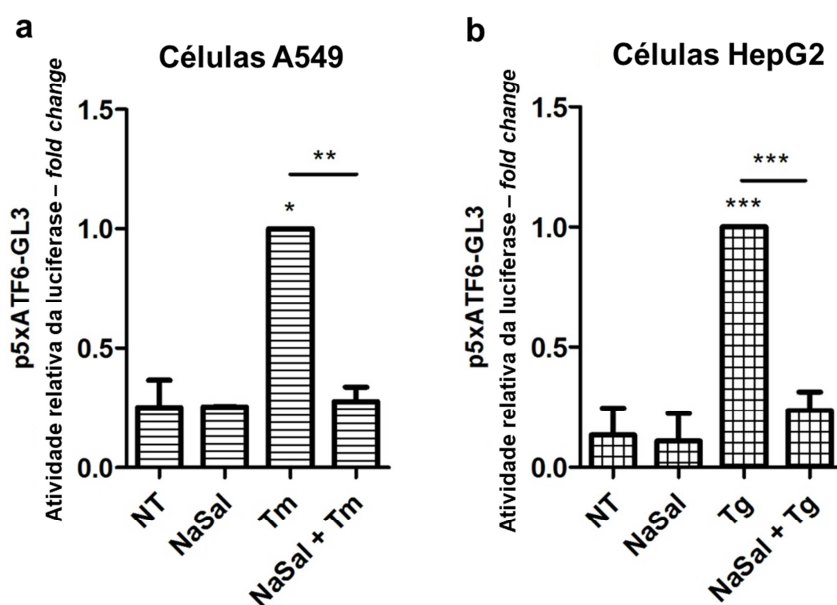


Figura 24 – Avaliação do efeito do co-tratamento com NaSal e tunicamicina sobre a atividade transcricional de ATF6 em linhagens de células tumorais. Células A549 (a) ou HepG2 (b) foram transfectadas com p5xATF6-GL3 e pRL-TK por vinte e quatro horas e mantidas sem tratamento (NT), tratadas com as combinações indicadas de NaSal e agentes indutores de estresse do RE (Tm = tunicamicina 3 μ M; Tg = tapsigargina 1 μ M). Tratamentos somente com NaSal foram realizados por sete horas, ou por uma hora quando seguidos de tratamento com Tm ou Tg, que foram mantidos por seis horas. Obtenção dos extratos, quantificação da atividade relativa da luciferase e cálculo do *fold change* foram realizados como na Figura 15a. N = 3 e resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. *, ** ou *** indicam diferenças significativas em relação a NT ou entre tratamentos quando sobre a barra ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), determinado pelo teste T de Student.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o fármaco salicilato de sódio (NaSal) inibe a ativação do fator de transcrição ATF6 α , o que ocorre nas etapas finais que antecedem sua translocação nuclear. A redução da atividade transcricional de ATF6 α em células tratadas com NaSal leva também a uma inibição da expressão de um conjunto específico de genes responsivos ao estresse do retículo endoplasmático (RE).

Quando um paciente faz uso oral de aspirina, aproximadamente 50% da dose são imediatamente biotransformados em salicilato, cuja meia vida de eliminação pode variar de duas a 30 horas. As concentrações plasmáticas normalmente alcançadas na terapia anti-inflamatória podem chegar a 300 $\mu\text{g/mL}$, que seria equivalente a aproximadamente 2 mM de salicilato. No entanto, devido à sua alta afinidade de ligação a proteínas e a características de irrigação ou a estados de inflamação de diferentes órgãos (ou tumores, por exemplo), deve-se considerar que as concentrações teciduais e intracelulares desse fármaco sejam ainda mais elevadas nesses microambientes (Amann e Peskar, 2002). Dessa forma, em ensaios *in vitro* é relevante utilizar concentrações suprafarmacológicas (como 10 ou 20 mM de salicilato) para que respostas mais robustas e com implicações terapêuticas sejam observadas.

Estudos anteriores já haviam verificado que os salicilatos e outras classes de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs ou do inglês NSAIDs, *non steroidal anti-inflammatory drugs*) são capazes de interferir com as vias da UPR, de modo a alterar diferentes respostas celulares relacionadas tanto aos seus efeitos farmacológicos quanto à sua toxicidade (Mügge e Silva, 2015). Especificamente para os salicilatos, evidências mostram que eles inibem a síntese proteica (Spohn e McColl, 1980; Kwon et al., 1997) e que esse efeito é dependente da ativação de PERK e fosforilação de eIF2 α (Silva et al., 2007). Outra cinase do fator eIF2 α , GCN2, também é requerida para ações biológicas do NaSal. Ficou demonstrado que células nocautes para essa proteína são mais resistentes à apoptose induzida pelo

NaSal e que a indução de diversos genes responsivos ao estresse do RE também é prejudicada nas células deficientes de GCN2 (Gentz et al., 2013).

Nossos resultados revelam que o tratamento com NaSal induz a expressão de ATF6 α , mas não de ATF6 β , o que resulta em níveis aumentados de RNA mensageiro e de proteína nas células. Ao contrário do que ocorre para células tratadas com tunicamicina (demonstrado anteriormente por Teske e colaboradores (2011) e corroborado por nossos resultados), a expressão de ATF6 α induzida pelo NaSal não é dependente de PERK, uma vez que os níveis de mRNA e proteína nas células deficientes de PERK tratadas com este fármaco são semelhantes aos níveis encontrados nas células selvagens. Evidências obtidas anteriormente pelo nosso grupo já haviam indicado que a expressão de ATF6 α induzida pelo NaSal é dependente de GCN2 (Gentz et al., 2013).

Ademais, nossos resultados corroboram também o que já havia sido observado por Silva e colaboradores (2007) de que o tratamento com NaSal não induz a ativação de IRE1 e conseqüente processamento de *Xbp1*, sendo que os níveis do mRNA de *Xbp1* processado (*spliced*) permanece inalterado nas células tratadas com NaSal (Silva et al., 2007). Os níveis de expressão de *Xbp1* total (não processado + processado) também não são induzidos pelo NaSal, o que ocorre de modo semelhante para *BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1* e *Hrd-1*. Ao contrário de *Chop* e *p58^{ipk}*, que dentre os genes estudados são principalmente dependentes da via de PERK/ATF4 para sua ativação (Teske et al., 2011), os demais genes são alvos preferenciais de ATF6 α , como pode ser observado nos dados obtidos em células nocautes de ATF6 α . Essas observações se correlacionam com a ausência de clivagem de ATF6 α detectada em extratos proteicos de células tratadas com NaSal e que é refletida na inabilidade do NaSal de induzir a atividade transcricional de ATF6 α avaliada por ensaios de gene repórter.

Consistente com a inexistência de atividade transcricional de ATF6 α nas células é a ausência de translocação de EGFP-ATF6 para os núcleos após o tratamento com NaSal, o que foi demonstrado por meio de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e *western blot*. Interessantemente, o tratamento com NaSal também inibiu a

atividade transcricional de ATF6 induzida por diferentes moléculas indutoras de estresse do RE, sugerindo que o efeito do NaSal não é específico sobre um único estímulo indutor de estresse do RE. Essa inibição também resulta na redução da expressão de genes alvo de ATF6 α , mais especificamente de *BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1*, *Hrd-1*, e *p58^{gipk}*.

Como a expressão do próprio *Atf6 α* , de *Chop* e *Xbp-1* induzidas pela tunicamicina permaneceu inalterada em células co-tratadas com NaSal, essas evidências atestam que as vias de PERK/ATF4 e IRE1/XBP1 induzidas pelo estresse do RE permanecem ativadas na presença de NaSal. Também foi demonstrado que em células deficientes de Perk a ausência dessa proteína não impacta os efeitos inibitórios do NaSal sobre ATF6 α e sobre a expressão de seus genes alvo. Ainda, os resultados obtidos nas células nocaute de PERK indicam que a redução de atividade transcricional de ATF6 observada no ensaio de gene repórter com células tratadas com NaSal não é consequência indireta da inibição da síntese proteica por esse fármaco.

Alguns estudos haviam mostrado previamente que o tratamento de adipócitos humanos primários e de células hepáticas com NaSal era capaz de reduzir a expressão de ATF6 (somente nos adipócitos) e CHOP. É possível que as diferenças detectadas na expressão desses genes entre os diferentes estudos e os nossos resultados tenham ocorrido devido ao tempo de exposição ao fármaco e ao tipo celular estudado. No estudo com adipócitos, por exemplo, as células utilizadas eram primárias (ao contrário dos tipos celulares utilizados por nós, que são linhagens imortalizadas) e o tempo de tratamento com NaSal foi de 24 horas (Alhusaini et al., 2010; Jeong et al., 2013). O uso das linhagens imortalizadas, como A549 e HepG2, por outro lado, tem a vantagem de aproximar as nossas condições experimentais daquelas encontradas em tumores, uma vez que essas células possuem alta capacidade de divisão celular e alta demanda metabólica, características que são mantidas nessas culturas. Ainda, observamos em nossos estudos que os efeitos inibitórios do NaSal sobre a atividade transcricional de ATF6 α também ocorre nessas células, o que mostra que esses efeitos não são célula-específicos.

Considerando a cadeia de eventos necessária para a ativação de ATF6, poderíamos supor que a inibição dessa ativação pelo NaSal pudesse ocorrer em qualquer uma dessas etapas, sendo elas: (1) a sua translocação do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi; (2) a sua clivagem sequencial pelas proteases S1P e S2P; e (3) a sua translocação do complexo de Golgi para o núcleo da célula.

A translocação de ATF6 para o complexo de Golgi é um evento que depende do estado em que a proteína se encontra no interior do retículo. Já foi demonstrado que a redução do nível de glicosilação de ATF6 induzida por taspigargina ou tunicamicina é um mecanismo que favorece a sua ativação e serve como um sensor da homeostase do retículo, uma vez que uma proteína mutante de ATF6 que replica a forma reduzida em glicosilação possui uma migração constitutiva mais acelerada para o Golgi (Hong et al., 2004). Por outro lado, nossos resultados sugerem que a modificação da glicosilação de ATF6 não é o mecanismo de ação do NaSal sobre essa proteína, pois em células co-tratadas com NaSal e tunicamicina é possível observar a formação de duas bandas de migração diferente, correspondentes às formas glicosilada e não glicosilada, que também aparecem nas células tratadas somente com tunicamicina.

Outra modificação pós-tradução que influencia no transporte de ATF6 para o Golgi é a presença de pontes dissulfeto intra e intermoleculares, sendo que estas últimas modificam também o estado de oligomerização da proteína. As pontes dissulfeto presentes no domínio luminal de ATF6 ocorrem em dois resíduos de cisteína (cys467 e cys618) e a redução dessas ligações, que leva ATF6 a alcançar a forma de monômero, é necessária para o transporte para as vesículas COPII que levarão a proteína até o complexo de Golgi (Nadanaka et al., 2007). Curiosamente, um conjunto de estudos constatou que o ácido salicílico, que em plantas é uma molécula importantíssima e essencial para o sistema imune do organismo, regula a atividade de um fator de transcrição através da ligação a resíduos de cisteína e modificação de pontes dissulfeto. A forma inativa do fator de transcrição NPR1 é citoplasmática, e as evidências sugerem que a ligação do ácido salicílico às cisteínas cys(521/529), por meio de interação com o metal cobre, leva a uma mudança conformacional de NPR1, que assume um estado monomérico, e

consequentemente resulta na liberação do domínio C-terminal transcricionalmente ativo (Mou et al., 2003; Wu et al., 2012). Infelizmente não é possível inferir como as pontes dissulfeto do domínio luminal de ATF6 se comportam em presença do salicilato de sódio a partir dos nossos resultados, pois nossos extratos celulares foram submetidos a condições redutoras durante seu processamento e eletroforese.

Ainda que seja necessário investigar o papel de pontes dissulfeto nas ações do NaSal sobre ATF6 localizado no RE, nossos estudos de microscopia de fluorescência demonstram que, na presença deste fármaco, EGFP-ATF6 se acumula em pontos localizados na região perinuclear que se co-localizam com o marcador de complexo de Golgi manosidase II. Portanto, é pouco provável que o mecanismo de ação do NaSal seja restringir a localização de ATF6 ao retículo endoplasmático, como ocorre no tratamento com os fármacos recém descobertos, os ceapins, que são inibidores seletivos da ativação de ATF6 (Gallagher et al., 2016; Gallagher e Walter, 2016).

A constatação de que ATF6 é encontrado no Golgi, mas não é transportado para o núcleo nas células tratadas com NaSal, leva à especulação de que este fármaco poderia atuar como um inibidor das proteases S1P e/ou S2P, o que impediria a clivagem de ATF6 e sua liberação da membrana do Golgi. Estudos anteriores demonstraram que ATF6 fica retido no Golgi em células deficientes de S2P (Nadanaka et al., 2006), mas a suposição de que NaSal seria um inibidor direto que se ligaria à protease pode ser descartada, uma vez que a clivagem de dois fatores de transcrição b-Zip relacionados a ATF6 não é afetada pelo tratamento com NaSal. Em nossos experimentos observamos que a clivagem de OASIS e CREBH ocorre tanto em células tratadas somente com NaSal (em menor extensão) como em células co-tratadas com NaSal e os indutores de estresse do RE tunicamicina (para OASIS) e brefeldina A (para CREBH). Na verdade, a seletividade do NaSal por ATF6 α é bastante relevante, pois fármacos que são inibidores de S1P e S2P, como AEBSF e Nelfinavir, têm efeitos sobre qualquer substrato dessas proteínas, como, por exemplo, os fatores de transcrição SREBP, que regulam diversas vias relacionadas ao metabolismo de colesterol (Okada et al., 2003; Hawkins et al., 2008; Guan et al., 2011; Guan et al., 2012; Guan et al., 2014). Entretanto, para atestar a

seletividade do NaSal sobre ATF6 α também é necessário avaliar a ativação de SREBP em células tratadas com esse fármaco.

Como o tratamento com inibidores de proteassomo é capaz de estabilizar a forma clivada de ATF6 α (Thuerauf et al., 2002), caso o efeito do NaSal sobre a atividade de ATF6 fosse resultado da aceleração da degradação de sua forma processada, seria esperado que o tratamento simultâneo com NaSal e bortezomib atenuasse ou anulasse o efeito do NaSal. Apesar de Gentz e colaboradores (Gentz et al., 2013) terem demonstrado que o tratamento com NaSal induz a expressão de diversos genes de vias de ubiquitinação, a inibição do proteassomo não prejudicou a inibição da ativação de ATF6 α causada pelo tratamento com NaSal.

No ponto em que nossos estudos se encontram não é possível determinar se o mecanismo pelo qual o NaSal inibe a atividade transcricional de ATF6 α é direto ou indireto. É possível que o salicilato se ligue diretamente a ATF6 α localizado no complexo de Golgi e induza mudanças conformacionais ou oligomerização que impeçam a ação de S2P sobre ATF6. Essas especulações são suportadas pela ausência de resíduos de cisteína e formação de pontes dissulfeto no domínio luminal de OASIS e CREBH (Figura 2), o que, considerando-se o modo de interação entre ácido salicílico e NPR1, poderia prejudicar a interação do salicilato com OASIS e CREBH e não causaria o bloqueio da sua ativação, o contrário do que ocorre para ATF6 α . Nossos estudos não fornecem evidências suficientes para corroborar essas suposições, e para tanto seria necessário realizar extensos estudos sobre modificações dos domínios luminiais de OASIS, CREBH e ATF6 α para verificar, por exemplo, se a deleção de cisteínas em ATF6 α anularia o efeito inibitório do NaSal.

Ainda no complexo de Golgi, outro mecanismo de ação possível seria a modificação inespecífica de substratos presentes nessa organela pela indução de perturbações na sua homeostase. Os dados obtidos nos experimentos de gene repórter da atividade de ATF6 com a superexpressão do marcador de Golgi manosidase II e com o tratamento com nigericina sugerem que alterações da homeostase dessa organela possam prejudicar a ativação de ATF6 α . A nigericina, especificamente, é um ionóforo indutor de estresse do complexo de Golgi. Essa resposta é ativada

fisiologicamente quando a organela precisa aumentar a sua capacidade de processamento de substratos que sofrem modificações no seu interior ou patológica/farmacologicamente quando a estrutura da organela é desorganizada (Taniguchi e Yoshida, 2017). Nossos resultados indicam, indiretamente, que as ações do salicilato e da nigericina sobre ATF6 α parecem ser semelhantes, uma vez que ambos os tratamentos reduzem a atividade transcricional de ATF6 induzida por tunicamicina (aproximadamente duas vezes para nigericina e cinco vezes para o NaSal). Para avançar nessa linha de investigação, entretanto, é necessário verificar a ativação das vias de estresse de Golgi em células tratadas com NaSal. Tais estudos podem ser realizados quantificando-se a expressão de genes marcadores dessa resposta e também por ensaio de gene repórter com plasmídeo contendo em sua região promotora elementos de ligação responsivos a fatores de transcrição ativados no estresse de Golgi, sabidamente TFE3 e MLX (Taniguchi et al., 2016).

Além disso, seria interessante avaliar a ultraestrutura das organelas celulares em células tratadas com NaSal, o que também poderia sugerir a ocorrência de respostas ao estresse de Golgi caso alguma alteração fosse detectada. Buscas na literatura revelam que um estudo com ratos demonstrou que a injeção intraperitoneal de salicilato de sódio causou um aumento no número de peroxissomos e alterações no complexo de Golgi de hepatócitos, ao mesmo tempo em que o retículo endoplasmático permaneceu inalterado (Bullock et al., 1970).

Apesar de não termos descrito o mecanismo completo de inibição da ativação de ATF6 α pelo salicilato de sódio, é fato que este fármaco inibe a atividade transcricional dessa proteína na resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Considerando-se os diferentes contextos em que ocorre a ativação da via de ATF6 α , não parece haver benefício do uso dos salicilatos, por exemplo, em doenças neurodegenerativas. Fazemos essa observação, pois foi demonstrado que é a ativação farmacológica dessa via que traz benefícios, uma vez que promove redução do acúmulo de proteínas amiloidogênicas e poderia trazer resultados positivos na prevenção e tratamento desse tipo de doença (Chen et al., 2014; Plate et al., 2016).

Por outro lado, uma série de estudos já forneceu evidências de que ATF6 α tem um papel no surgimento e na sobrevivência de células cancerígenas. A perda da “proteostase” do RE parece ser, de modo geral, uma característica de células tumorais, o que pode torná-las susceptíveis a intervenções nas vias que tendem a levar as células de volta à homeostase (Oakes, 2017). Estudos com culturas de células tumorais já indicaram que a ativação da via de ATF6 α confere reduzida susceptibilidade à indução de morte celular, como apoptose induzida pelo estresse do RE (Tay et al., 2014), resistência a fármacos citostáticos (Schewe e Aguirre-Ghiso, 2008; Higa et al., 2014) ou à radiação (Dadey et al., 2016). Adicionalmente, em amostras clínicas de pacientes com câncer colorretal (Hanaoka et al., 2017), de próstata (Liu et al., 2017) e em carcinoma biliopancreático (Martinez-Useros et al., 2015) foram estabelecidas correlações entre a ativação da UPR e expressão de ATF6 α e piores prognósticos. Essas correlações indicam que a expressão de ATF6 α possa estar associada à progressão maligna de lesões pré-cancerosas no intestino grosso (Hanaoka et al., 2017) e à recorrência de tumores pancreáticos após ressecção cirúrgica (Martinez-Useros et al., 2015).

Há mais de uma década têm sido despendidos esforços para fornecer evidências concretas de que o uso contínuo de aspirina possa reduzir a incidência de câncer, pois essa correlação começou a ser estabelecida em estudos clínicos nos quais os pacientes faziam uso de baixas doses desse fármaco para a prevenção de eventos cardiovasculares. A metanálise de dados obtidos em estudos controlados e randomizados demonstrou que o uso diário de aspirina em baixas doses (75 a 100 mg) levou a uma redução da incidência de câncer colorretal e na morte em decorrência de diversos tipos de câncer (principalmente de estômago e próstata) a partir de cinco anos de uso (amostragem de aproximadamente 25 mil pacientes). Também foi verificado que esse efeito é resiliente por um período de 20 anos e que não depende da dose utilizada de aspirina (desde que acima de 75 mg diárias), sendo 7,08% a redução global do risco de morte por câncer em pacientes que fizeram uso desse fármaco (Rothwell et al., 2010; Rothwell et al., 2011). Outra metanálise também sugeriu que os benefícios do uso da aspirina na prevenção do câncer possam ser alcançados em tempo mais curto (dois a três anos) com doses mais altas (próximas de 400 mg) (Rothwell et al., 2012), mas nesse caso é

necessário fazer uma avaliação do risco benefício devido ao aumento da incidência de sangramentos nos períodos iniciais de uso do medicamento (Chan e Cook, 2012).

Considerando-se a convergência dessas evidências e dos resultados obtidos neste trabalho, ficamos tentados a especular que a prevenção de carcinogênese promovida pelo tratamento contínuo com aspirina possa estar, pelo menos em parte, relacionada à inibição da via de ATF6 α induzida pela UPR em células pré-cancerosas. Todavia, a confirmação dessa hipótese somente seria possível por meio da análise minuciosa da expressão/ativação de ATF6 α e de genes alvos da UPR em amostras de pacientes participantes de estudos clínicos.

Atualmente, encontram-se em realização dois estudos duplo cegos, controlados e randomizados com populações idosas (acima de 65 anos) que recebem/receberão uma dose diária de aspirina por um período de cinco anos. No primeiro estudo (Add-Aspirin), pacientes do Reino Unido e da Índia que tiveram câncer de mama, próstata, colorretal ou gastroesofágico e cujos tumores foram removidos cirurgicamente serão randomizados em grupos que receberão placebo ou aspirina para se avaliar o potencial benefício do uso deste fármaco para a prevenção da recorrência dos tumores e sobrevivência geral dos pacientes (Coyle et al., 2016).

O estudo ASPREE (ASPIrin in Reducing Events in the Elderly) recrutou pacientes dos Estados Unidos e da Austrália (totalizando quase 20 mil indivíduos), que recebem uma dose diária de 100 mg de aspirina ou de placebo. O término desse estudo está previsto para dezembro de 2018, e o grupo de pesquisa tem o objetivo de investigar o efeito da aspirina sobre a mortalidade dos indivíduos e especificamente sobre diversos aspectos do envelhecimento, como a incidência de eventos cardiovasculares, câncer, problemas neurológicos (demência, depressão), fraturas e perdas auditivas (ASPREE Investigator Group, 2013). Tendo em vista o tamanho do estudo e a importância de determinar não somente riscos/benefícios, mas também os mecanismos pelos quais os efeitos da aspirina ocorrem, seria no mínimo interessante que também fosse verificada a ativação ou inibição de vias

intracelulares relacionadas aos eventos que serão investigados em biópsias que forem obtidas dos pacientes.

7. CONCLUSÃO

Com os dados apresentados neste trabalho, foi possível estabelecer que o fator de transcrição ATF6 α é um alvo da ação de fármacos da classe dos salicilatos. Nossas principais conclusões são:

- O tratamento com salicilato de sódio induz a expressão, porém não a atividade transcricional de ATF6 α ;
- A clivagem e translocamento de ATF6 α para o núcleo induzida por moléculas indutoras de estresse do retículo endoplasmático são inibidas pelo co-tratamento com NaSal;
- O efeito inibitório do NaSal sobre ATF6 α não ocorre para outros fatores de transcrição semelhantes a ATF6, como OASIS e CREBH;
- O mecanismo pelo qual ocorre a inibição da atividade transcricional de ATF6 α é possivelmente o bloqueio direto ou indireto da sua clivagem no complexo de Golgi (sugestão de mecanismo apresentado na Figura 25);
- A inibição da atividade transcricional de ATF6 α resulta em redução da expressão de diversos genes alvo de ATF6 α responsivos ao estresse do retículo endoplasmático;
- O efeito inibitório do NaSal é observado em diferentes tipos celulares, incluindo células de linhagens tumorais.

O estabelecimento de uma nova conexão entre os efeitos dos salicilatos e uma via da resposta a proteínas mal dobradas contribui para o entendimento dos efeitos biológicos dessa classe de fármacos e pode auxiliar na compreensão do mecanismo pelo qual o tratamento prolongado com aspirina resulta em inibição da carcinogênese em diferentes tecidos.

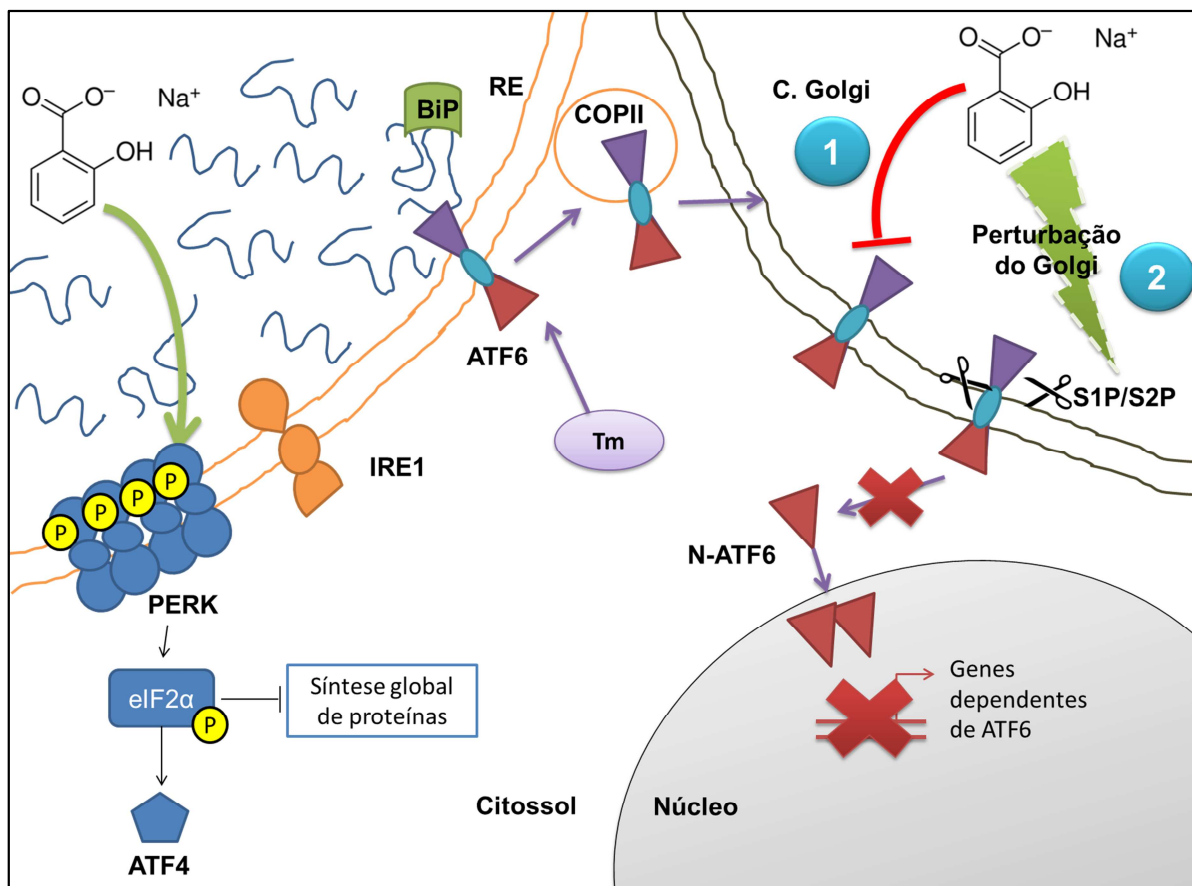


Figura 25 – Representação das propostas de mecanismos de ação do salicilato de sódio sobre componentes do estresse do RE. No retículo endoplasmático (RE), o NaSal promove a ativação de PERK, que resulta em fosforilação do fator eIF2 α , inibição da síntese proteica global e síntese do fator de transcrição ATF4. IRE1 permanece em seu estado inativo. Em células expostas a agentes indutores de estresse como tunicamicina (Tm), ATF6 α é translocado do RE para o complexo de Golgi (em vesículas COPII) e é clivado sequencialmente pelas proteases S1P e S2P. Essa etapa é seguida da translocação de N-ATF6 α para o núcleo, onde na forma de dímeros ativa a transcrição de diversos genes alvo. Em células co-tratadas com NaSal e Tm, ocorre a inibição da clivagem/ativação de ATF6 α , por mecanismo ainda desconhecido, mas que poderia ser resultado (1) da ação direta da molécula de NaSal sobre a proteína ATF6 α , possivelmente pela ligação a ela ou indução de modificações pós-tradução; ou (2) da indução de perturbações da homeostase do complexo de Golgi, que indiretamente impediria o acesso das proteases S1P e S2P aos sítios de clivagem de ATF6 α . Com isso, não ocorreria formação de N-ATF6 nas células, e a expressão de um subconjunto de genes responsivos ao estresse do RE seria inibida.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos do tratamento com salicilato de sódio sobre a ativação de ATF6 β ;
- Verificar a ocorrência de modificações pós-tradução em ATF6 α em células tratadas com salicilato de sódio;
- Investigar a ativação de vias de regulação de homeostase do complexo de Golgi em células tratadas com salicilato de sódio;
- Avaliar a expressão de ATF6 α e genes alvo em diferentes linhagens de células tumorais tratadas com salicilato de sódio.

REFERÊNCIAS

Alhusaini, S., McGee, K., Schisano, B., Harte, A., McTernan, P., Kumar, S. and Tripathi, G. (2010). "Lipopolysaccharide, high glucose and saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in cultured primary human adipocytes: Salicylate alleviates this stress." Biochem Biophys Res Commun **397**(3): 472-8.

Amann, R. and Peskar, B.A. (2002). "Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate." Eur J Pharmacol **447**(1): 1-9.

Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A. and Imaizumi, K. (2011). "The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology." J Biochem **149**(5): 507-18.

ASPREE-Investigator-Group (2013). "Study design of ASPirin in Reducing Events in the Elderly (ASPREE): a randomized, controlled trial." Contemp Clin Trials **36**(2): 555-64.

Ayyadevara, S., Bharill, P., Dandapat, A., Hu, C., Khaidakov, M., Mitra, S., Shmookler Reis, R.J. and Mehta, J.L. (2013). "Aspirin inhibits oxidant stress, reduces age-associated functional declines, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*." Antioxid Redox Signal **18**(5): 481-90.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-32.

Bullock, G.R., Delaney, V.B., Sawyer, B.C. and Slater, T.F. (1970). "Biochemical and structural changes in rat liver resulting from the parenteral administration of a large dose of sodium salicylate." Biochem Pharmacol **19**(1): 245-53.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G. and Ron, D. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**(6867): 92-6.

Chan, A.T. and Cook, N.R. (2012). "Are we ready to recommend aspirin for cancer prevention?" Lancet **379**(9826): 1569-71.

Chan, C.P., Kok, K.H., Tang, H.M., Wong, C.M. and Jin, D.Y. (2013). "Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response." Biochim Biophys Acta **1833**(10): 2165-75.

Chen, J.J., Genereux, J.C., Qu, S., Hulleman, J.D., Shoulders, M.D. and Wiseman, R.L. (2014). "ATF6 activation reduces the secretion and extracellular aggregation of destabilized variants of an amyloidogenic protein." Chem Biol **21**(11): 1564-74.

Chen, X., Zhang, F., Gong, Q., Cui, A., Zhuo, S., Hu, Z., Han, Y., Gao, J., Sun, Y., Liu, Z., Yang, Z., Le, Y., Gao, X., Dong, L.Q., Gao, X. and Li, Y. (2016). "Hepatic ATF6 Increases Fatty Acid Oxidation to Attenuate Hepatic Steatosis in Mice Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha." Diabetes **65**(7): 1904-15.

Chiang, W.C., Chan, P., Wissinger, B., Vincent, A., Skorczyk-Werner, A., Krawczynski, M.R., Kaufman, R.J., Tsang, S.H., Heon, E., Kohl, S. and Lin, J.H. (2017). "Achromatopsia mutations target sequential steps of ATF6 activation." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(2): 400-405.

Choi, H.W., Tian, M., Manohar, M., Harraz, M.M., Park, S.W., Schroeder, F.C., Snyder, S.H. and Klessig, D.F. (2015). "Human GAPDH Is a Target of Aspirin's Primary Metabolite Salicylic Acid and Its Derivatives." PLoS One **10**(11): e0143447.

Cortez, L. and Sim, V. (2014). "The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases." Prion **8**(2).

Coyle, C., Cafferty, F.H., Rowley, S., MacKenzie, M., Berkman, L., Gupta, S., Pramesh, C.S., Gilbert, D., Kynaston, H., Cameron, D., Wilson, R.H., Ring, A. and Langley, R.E. (2016). "ADD-ASPIRIN: A phase III, double-blind, placebo controlled, randomised trial assessing the effects of aspirin on disease recurrence and survival after primary therapy in common non-metastatic solid tumours." Contemp Clin Trials **51**: 56-64.

Cubillos-Ruiz, J.R., Bettigole, S.E. and Glimcher, L.H. (2016). "Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer." Cell **168**(4): 692-706.

Dadey, D.Y., Kapoor, V., Khudanyan, A., Urano, F., Kim, A.H., Thotala, D. and Hallahan, D.E. (2016). "The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma." Oncotarget **7**(2): 2080-92.

Deng, W.G., Ruan, K.H., Du, M., Saunders, M.A. and Wu, K.K. (2001). "Aspirin and salicylate bind to immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and inhibit its ATPase activity in human fibroblasts." Faseb J **15**(13): 2463-70.

Derouet, M., Thomas, L., Moulding, D.A., Akgul, C., Cross, A., Moots, R.J. and Edwards, S.W. (2006). "Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1." J Immunol **176**(2): 957-65.

Dikshit, P., Chatterjee, M., Goswami, A., Mishra, A. and Jana, N.R. (2006). "Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function." J Biol Chem **281**(39): 29228-35.

Fernandez, H.R. and Linden, S.K. (2017). "The aspirin metabolite salicylate inhibits lysine acetyltransferases and MUC1 induced epithelial to mesenchymal transition." Sci Rep **7**(1): 5626.

Frakes, A.E. and Dillin, A. (2017). "The UPR(ER): Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis." Mol Cell **66**(6): 761-771.

Freshney, I. (2015). *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*. 5th Edition. Wiley-Liss, 696 p.

Gallagher, C.M., Garri, C., Cain, E.L., Ang, K.K., Wilson, C.G., Chen, S., Hearn, B.R., Jaishankar, P., Aranda-Diaz, A., Arkin, M.R., Renslo, A.R. and Walter, P. (2016). "Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6alpha branch." Elife **5**.

Gallagher, C.M. and Walter, P. (2016). "Ceapins inhibit ATF6alpha signaling by selectively preventing transport of ATF6alpha to the Golgi apparatus during ER stress." Elife **5**.

Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M. and Walter, P. (2013). "Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a013169.

Gardner, B.M. and Walter, P. (2011). "Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response." Science **333**(6051): 1891-4.

Gentz, S.H., Bertollo, C.M., Souza-Fagundes, E.M. and da Silva, A.M. (2013). "Implication of eIF2alpha kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate." J Pharm Pharmacol **65**(3): 430-40.

Guan, M., Fousek, K. and Chow, W.A. (2012). "Nelfinavir inhibits regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding protein-1 and activating transcription factor 6 in castration-resistant prostate cancer." Febs J **279**(13): 2399-411.

Guan, M., Fousek, K., Jiang, C., Guo, S., Synold, T., Xi, B., Shih, C.C. and Chow, W.A. (2011). "Nelfinavir induces liposarcoma apoptosis through inhibition of regulated intramembrane proteolysis of SREBP-1 and ATF6." Clin Cancer Res **17**(7): 1796-806.

Guan, M., Su, L., Yuan, Y.C., Li, H. and Chow, W.A. (2014). "Nelfinavir and nelfinavir analogs block site-2 protease cleavage to inhibit castration-resistant prostate cancer." Sci Rep **5**: 9698.

Hanaoka, M., Ishikawa, T., Ishiguro, M., Tokura, M., Yamauchi, S., Kikuchi, A., Uetake, H., Yasuno, M. and Kawano, T. (2017). "Expression of ATF6 as a marker of pre-cancerous atypical change in ulcerative colitis-associated colorectal cancer: a potential role in the management of dysplasia." J Gastroenterol.

Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D. and Ron, D. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Mol Cell **7**(6): 1153-63.

Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response." Mol Cell **5**(5): 897-904.

Harding, H.P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-4.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. and Ron, D. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-33.

Hawkins, J.L., Robbins, M.D., Warren, L.C., Xia, D., Petras, S.F., Valentine, J.J., Varghese, A.H., Wang, I.K., Subashi, T.A., Shelly, L.D., Hay, B.A., Landschulz, K.T., Geoghegan, K.F. and Harwood, H.J., Jr. (2008). "Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals." J Pharmacol Exp Ther **326**(3): 801-8.

Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Peggie, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R. and Hardie, D.G. (2012). "The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase." Science **336**(6083): 918-22.

He, Z., Peng, Y., Duan, W., Tian, Y., Zhang, J., Hu, T., Cai, Y., Feng, Y. and Li, G. (2015). "Aspirin regulates hepatocellular lipid metabolism by activating AMPK signaling pathway." J Toxicol Sci **40**(1): 127-36.

Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 89-102.

Hetz, C. and Papa, F.R. (2018). "The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control." Mol Cell **69**(2): 169-181.

Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M.E., Simpson, J.C., Pasquet, J.M., Schekman, R. and Chevet, E. (2014). "Endoplasmic reticulum

stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance." Mol Cell Biol **34**(10): 1839-49.

Hong, M., Li, M., Mao, C. and Lee, A.S. (2004). "Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6." J Cell Biochem **92**(4): 723-32.

Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.M., Gogia, R.K., Li, M. and Lee, A.S. (2004). "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response." J Biol Chem **279**(12): 11354-63.

Huang, X.B., Mu, X.H., Wan, Q.L., He, X.M., Wu, G.S. and Luo, H.R. (2017). "Aspirin increases metabolism through germline signalling to extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." PLoS One **12**(9): e0184027.

Iurlaro, R. and Munoz-Pinedo, C. (2016). "Cell death induced by endoplasmic reticulum stress." Febs J **283**(14): 2640-52.

Jeong, K.W., Ku, J.M., Park, M.W., Park, S.M., Yang, J.E. and Nam, T.G. (2013). "Hydroxynaphthoic acids identified in a high throughput screening potentially ameliorate endoplasmic reticulum stress as novel chemical chaperones." Chem Pharm Bull (Tokyo) **61**(7): 740-6.

Jin, J.K., Blackwood, E.A., Azizi, K., Thuerauf, D.J., Fahem, A.G., Hofmann, C., Kaufman, R.J., Doroudgar, S. and Glembotski, C.C. (2017). "ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart." Circ Res **120**(5): 862-875.

Karagoz, G.E., Acosta-Alvear, D., Nguyen, H.T., Lee, C.P., Chu, F. and Walter, P. (2017). "An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1." Elife **6**.

Kim, K.M., Song, J.J., An, J.Y., Kwon, Y.T. and Lee, Y.J. (2005). "Pretreatment of acetylsalicylic acid promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by down-regulating BCL-2 gene expression." J Biol Chem **280**(49): 41047-56.

Klampfer, L., Cammenga, J., Wisniewski, H.G. and Nimer, S.D. (1999). "Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines." Blood **93**(7): 2386-94.

Kohl, S., Zobor, D., Chiang, W.C., Weisschuh, N., Staller, J., Gonzalez Menendez, I., Chang, S., Beck, S.C., Garcia Garrido, M., Sothilingam, V., Seeliger, M.W., Stanzial, F., Benedicenti, F., Inzana, F., Heon, E., Vincent, A., Beis, J., Strom, T.M., Rudolph, G., Roosing, S., Hollander, A.I., Cremers, F.P., Lopez, I., Ren, H., Moore, A.T., Webster, A.R., Michaelides, M., Koenekoop, R.K., Zrenner, E., Kaufman, R.J., Tsang, S.H., Wissinger, B. and Lin, J.H. (2015). "Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia." Nat Genet **47**(7): 757-65.

Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A. and Imaizumi, K. (2005). "OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes." Nat Cell Biol **7**(2): 186-94.

Kopp, E. and Ghosh, S. (1994). "Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin." Science **265**(5174): 956-9.

Kwon, G., Hill, J.R., Corbett, J.A. and McDaniel, M.L. (1997). "Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINm5F cells and rat islets." Mol Pharmacol **52**(3): 398-405.

Li, H., Korennykh, A.V., Behrman, S.L. and Walter, P. (2010). "Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(37): 16113-8.

Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S. and Lee, A.S. (2000). "ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1." Mol Cell Biol **20**(14): 5096-106.

Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O. and Koks, S. (2017). "Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease." Front Cell Dev Biol **5**: 48.

Liu, J., Xiao, M., Li, J., Wang, D., He, Y., He, J., Gao, F., Mai, L., Li, Y., Liang, Y., Liu, Y. and Zhong, X. (2017). "Activation of UPR Signaling Pathway is Associated With the Malignant Progression and Poor Prognosis in Prostate Cancer." Prostate **77**(3): 274-281.

Llarena, M., Bailey, D., Curtis, H. and O'Hare, P. (2010). "Different mechanisms of recognition and ER retention by transmembrane transcription factors CREB-H and ATF6." Traffic **11**(1): 48-69.

Mahdi, J.G., Mahdi, A.J., Mahdi, A.J. and Bowen, I.D. (2006). "The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential." Cell Prolif **39**(2): 147-55.

Maly, D.J. and Papa, F.R. (2014). "Druggable sensors of the unfolded protein response." Nat Chem Biol **10**(11): 892-901.

Martinez-Useros, J., Georgiev-Hristov, T., Borrero-Palacios, A., Fernandez-Acenero, M.J., Rodriguez-Remirez, M., del Puerto-Nevado, L., Cebrian, A., Gomez del Pulgar, M.T., Cazorla, A., Vega-Bravo, R., Perez, N., Celdran, A. and Garcia-Foncillas, J. (2015). "Identification of Poor-outcome Biliopancreatic Carcinoma Patients With Two-marker Signature Based on ATF6alpha and p-p38 "STARD Compliant"." Medicine (Baltimore) **94**(45): e1972.

Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J. and Gerlo, S. (2014). "Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation." Trends Biochem Sci **39**(5): 245-54.

McCarty, M.F. and Block, K.I. (2006). "Preadministration of high-dose salicylates, suppressors of NF-kappaB activation, may increase the chemosensitivity of many cancers: an example of proapoptotic signal modulation therapy." Integr Cancer Ther **5**(3): 252-68.

Mou, Z., Fan, W. and Dong, X. (2003). "Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes." Cell **113**(7): 935-44.

Mügge, F. and Silva, A. (2015). "Endoplasmic reticulum stress response in the roadway for the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases **2**: 1-17.

Mügge, Fernanda L. B. (2015). 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. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUBD-A2GG5S>.

Murakami, T., Saito, A., Hino, S., Kondo, S., Kanemoto, S., Chihara, K., Sekiya, H., Tsumagari, K., Ochiai, K., Yoshinaga, K., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Kou, I., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., Wanaka, A. and Imaizumi, K. (2009). "Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation." Nat Cell Biol **11**(10): 1205-11.

Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H. and Mori, K. (2007). "Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress." Mol Cell Biol **27**(3): 1027-43.

Nadanaka, S., Yoshida, H., Sato, R. and Mori, K. (2006). "Analysis of ATF6 activation in Site-2 protease-deficient Chinese hamster ovary cells." Cell Struct Funct **31**(2): 109-16.

Nagamori, I., Yomogida, K., Ikawa, M., Okabe, M., Yabuta, N. and Nojima, H. (2006). "The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis." Genes Cells **11**(10): 1161-71.

Oakes, S.A. (2017). "Endoplasmic reticulum proteostasis: a key checkpoint in cancer." Am J Physiol Cell Physiol **312**(2): C93-C102.

Oakes, S.A. and Papa, F.R. (2015). "The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology." Annu Rev Pathol **10**: 173-94.

Ock, C.Y., Park, J.M., Han, Y.M., Jeong, M., Kim, M.Y., Lee, H.J. and Hahm, K.B. (2017). "Genetic ablation or pharmacologic inhibition of autophagy mitigated NSAID-associated gastric damages." J Mol Med (Berl) **95**(4): 405-416.

Okada, T., Haze, K., Nadanaka, S., Yoshida, H., Seidah, N.G., Hirano, Y., Sato, R., Negishi, M. and Mori, K. (2003). "A serine protease inhibitor prevents endoplasmic

reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6." J Biol Chem **278**(33): 31024-32.

Omori, Y., Imai, J., Watanabe, M., Komatsu, T., Suzuki, Y., Kataoka, K., Watanabe, S., Tanigami, A. and Sugano, S. (2001). "CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression." Nucleic Acids Res **29**(10): 2154-62.

Plate, L., Cooley, C.B., Chen, J.J., Paxman, R.J., Gallagher, C.M., Madoux, F., Genereux, J.C., Dobbs, W., Garza, D., Spicer, T.P., Scampavia, L., Brown, S.J., Rosen, H., Powers, E.T., Walter, P., Hodder, P., Wiseman, R.L. and Kelly, J.W. (2016). "Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation." Elife **5**.

Raza, H., John, A. and Benedict, S. (2011). "Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells." Eur J Pharmacol **668**(1-2): 15-24.

Rothwell, P.M., Fowkes, F.G., Belch, J.F., Ogawa, H., Warlow, C.P. and Meade, T.W. (2011). "Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials." Lancet **377**(9759): 31-41.

Rothwell, P.M., Price, J.F., Fowkes, F.G., Zanchetti, A., Roncaglioni, M.C., Tognoni, G., Lee, R., Belch, J.F., Wilson, M., Mehta, Z. and Meade, T.W. (2012). "Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials." Lancet **379**(9826): 1602-12.

Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P. and Meade, T.W. (2010). "Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials." Lancet **376**(9754): 1741-50.

Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M. and Imaizumi, K. (2009). "Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BFF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis." Nat Cell Biol **11**(10): 1197-204.

Schewe, D.M. and Aguirre-Ghiso, J.A. (2008). "ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10519-24.

Schindler, A.J. and Schekman, R. (2009). "In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17775-80.

Schwenger, P., Alpert, D., Skolnik, E.Y. and Vilcek, J. (1998). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B alpha phosphorylation and degradation." Mol Cell Biol **18**(1): 78-84.

Schwenger, P., Alpert, D., Skolnik, E.Y. and Vilcek, J. (1999). "Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates." J Cell Physiol **179**(1): 109-14.

Schwenger, P., Bellosta, P., Vietor, I., Basilico, C., Skolnik, E.Y. and Vilcek, J. (1997). "Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2869-73.

Schwenger, P., Skolnik, E.Y. and Vilcek, J. (1996). "Inhibition of tumor necrosis factor-induced p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by sodium salicylate." J Biol Chem **271**(14): 8089-94.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. and Prywes, R. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell **3**(1): 99-111.

Shen, J., Snapp, E.L., Lippincott-Schwartz, J. and Prywes, R. (2005). "Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response." Mol Cell Biol **25**(3): 921-32.

Shen, X., Ellis, R.E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K. and Kaufman, R.J. (2001). "Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development." Cell **107**(7): 893-903.

Shen, X., Ellis, R.E., Sakaki, K. and Kaufman, R.J. (2005). "Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*." *PLoS Genet* **1**(3): e37.

Shirakawa, K., Wang, L., Man, N., Maksimoska, J., Sorum, A.W., Lim, H.W., Lee, I.S., Shimazu, T., Newman, J.C., Schroder, S., Ott, M., Marmorstein, R., Meier, J., Nimer, S. and Verdin, E. (2016). "Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity." *Elife* **5**.

Shoulders, M.D., Ryno, L.M., Genereux, J.C., Moresco, J.J., Tu, P.G., Wu, C., Yates, J.R., 3rd, Su, A.I., Kelly, J.W. and Wiseman, R.L. (2013). "Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments." *Cell Rep* **3**(4): 1279-92.

Silva, A.M., Wang, D., Komar, A.A., Castilho, B.A. and Williams, B.R. (2007). "Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner." *J Biol Chem* **282**(14): 10164-71.

Spohn, M. and McColl, I. (1980). "In vitro studies on the effect of salicylates on the synthesis of proteins by guinea pig gastric mucosal tissue." *Biochim Biophys Acta* **608**(2): 409-21.

Steinberg, G.R., Dandapani, M. and Hardie, D.G. (2013). "AMPK: mediating the metabolic effects of salicylate-based drugs?" *Trends Endocrinol Metab* **24**(10): 481-7.

Stelzer, G. and Don, J. (2002). "Atce1: a novel mouse cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element-binding protein-like gene exclusively expressed in postmeiotic spermatids." *Endocrinology* **143**(5): 1578-88.

Stirling, J. and O'Hare, P. (2006). "CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P." *Mol Biol Cell* **17**(1): 413-26.

Stone, E. (1763). "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* **53**.

Taniguchi, M., Sasaki-Osugi, K., Oku, M., Sawaguchi, S., Tanakura, S., Kawai, Y., Wakabayashi, S. and Yoshida, H. (2016). "MLX Is a Transcriptional Repressor of the Mammalian Golgi Stress Response." Cell Struct Funct **41**(2): 93-104.

Taniguchi, M. and Yoshida, H. (2017). "TFE3, HSP47, and CREB3 Pathways of the Mammalian Golgi Stress Response." Cell Struct Funct **42**(1): 27-36.

Tay, K.H., Luan, Q., Croft, A., Jiang, C.C., Jin, L., Zhang, X.D. and Tseng, H.Y. (2014). "Sustained IRE1 and ATF6 signaling is important for survival of melanoma cells undergoing ER stress." Cell Signal **26**(2): 287-94.

Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G. and Wek, R.C. (2011). "The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **22**(22): 4390-405.

Thuerauf, D.J., Morrison, L. and Glembotski, C.C. (2004). "Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction." J Biol Chem **279**(20): 21078-84.

Thuerauf, D.J., Morrison, L.E., Hoover, H. and Glembotski, C.C. (2002). "Coordination of ATF6-mediated transcription and ATF6 degradation by a domain that is shared with the viral transcription factor, VP16." J Biol Chem **277**(23): 20734-9.

Usui, M., Yamaguchi, S., Tanji, Y., Tominaga, R., Ishigaki, Y., Fukumoto, M., Katagiri, H., Mori, K., Oka, Y. and Ishihara, H. (2012). "Atf6alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance." Metabolism **61**(8): 1118-28.

Vainio, H. and Morgan, G. (1997). "Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug." Pharmacol Toxicol **81**(4): 151-2.

Vane, J.R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-5.

Vane, J.R. and Botting, R.M. (2003). "The mechanism of action of aspirin." Thromb Res **110**(5-6): 255-8.

Vattem, K.M. and Wek, R.C. (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11269-74.

Vega, H., Agellon, L.B. and Michalak, M. (2016). "The rise of proteostasis promoters." IUBMB Life **68**(12): 943-954.

Vittimberga, F.J., Jr., McDade, T.P., Perugini, R.A. and Callery, M.P. (1999). "Sodium salicylate inhibits macrophage TNF-alpha production and alters MAPK activation." J Surg Res **84**(2): 143-9.

Volmer, R. and Ron, D. (2015). "Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response." Curr Opin Cell Biol **33C**: 67-73.

Volmer, R., van der Ploeg, K. and Ron, D. (2013). "Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(12): 4628-33.

Wan, Q.L., Zheng, S.Q., Wu, G.S. and Luo, H.R. (2013). "Aspirin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via AMPK and DAF-16/FOXO in dietary restriction pathway." Exp Gerontol **48**(5): 499-506.

Wang, M. and Kaufman, R.J. (2016). "Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease." Nature **529**(7586): 326-35.

Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J. and Prywes, R. (2000). "Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response." J Biol Chem **275**(35): 27013-20.

Wek, R.C. and Cavener, D.R. (2007). "Translational control and the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal **9**(12): 2357-71.

Wu, J., Rutkowski, D.T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G.D. and Kaufman, R.J. (2007). "ATF6alpha optimizes long-term

endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress." Dev Cell **13**(3): 351-64.

Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V. and Despres, C. (2012). "The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid." Cell Rep **1**(6): 639-47.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2007). "Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1." Dev Cell **13**(3): 365-76.

Yamamoto, K., Takahara, K., Oyadomari, S., Okada, T., Sato, T., Harada, A. and Mori, K. (2010). "Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **21**(17): 2975-86.

Yin, M.J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (1998). "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta." Nature **396**(6706): 77-80.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1998). "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 **273**(50): 33741-9.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-91.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K. (2001). "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 **21**(4): 1239-48.

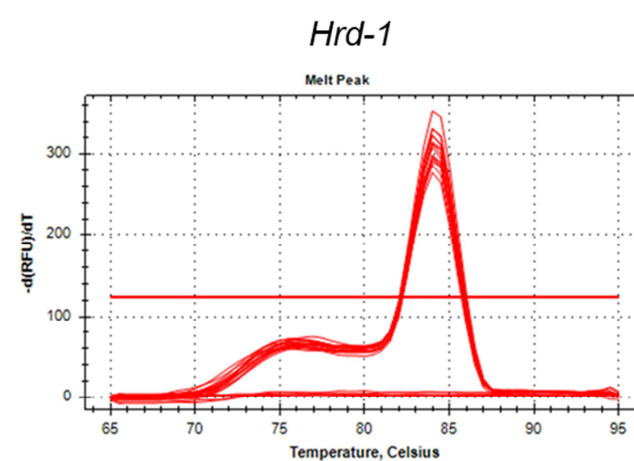
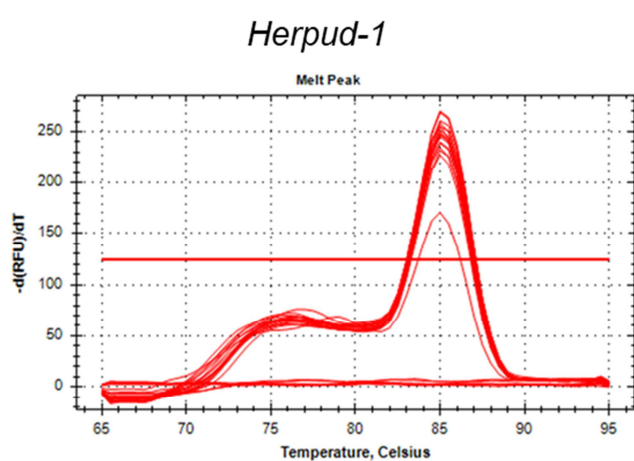
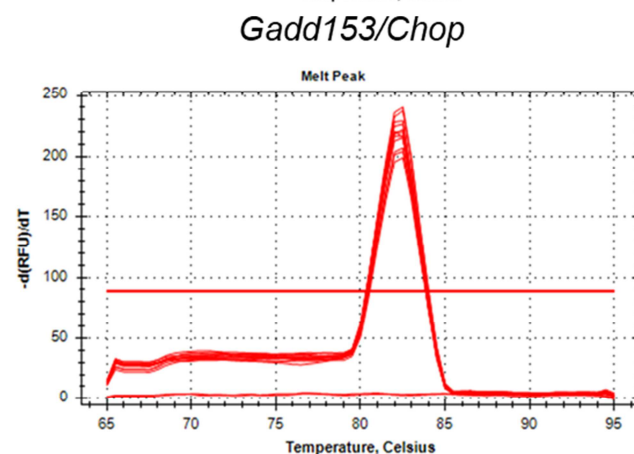
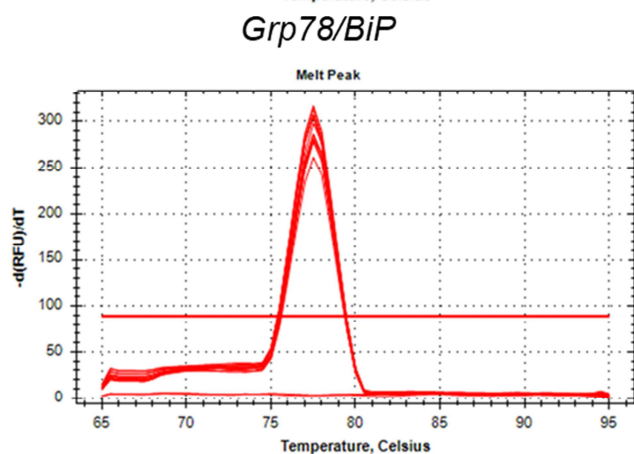
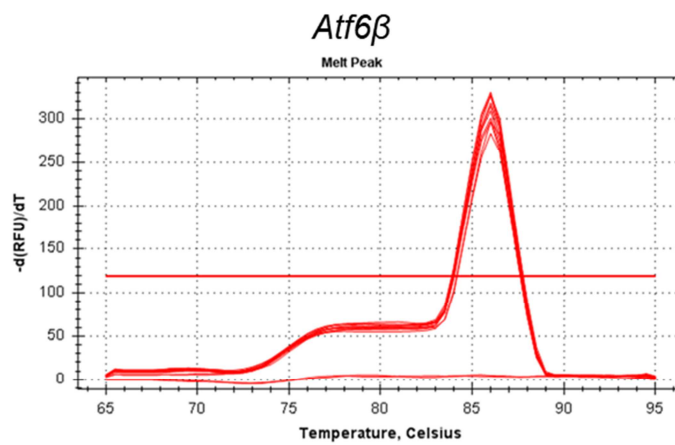
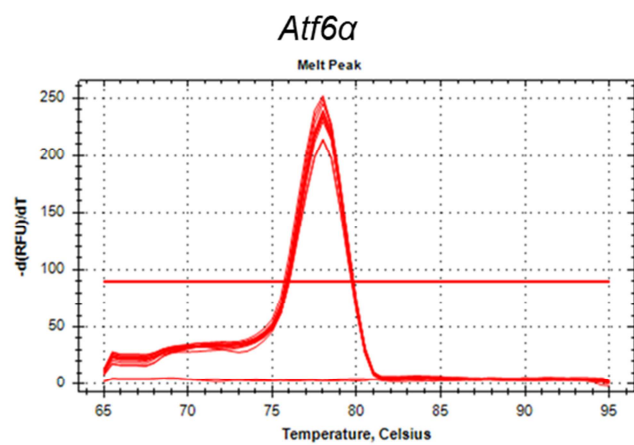
Yoshida, H., Uemura, A. and Mori, K. (2009). "pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation." Cell Struct Funct **34**(1): 1-10.

Yu, C., Li, W.B., Liu, J.B., Lu, J.W. and Feng, J.F. (2017). "Autophagy: novel applications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary cancer." Cancer Med.

Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H. and Kaufman, R.J. (2006). "Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response." Cell **124**(3): 587-99.

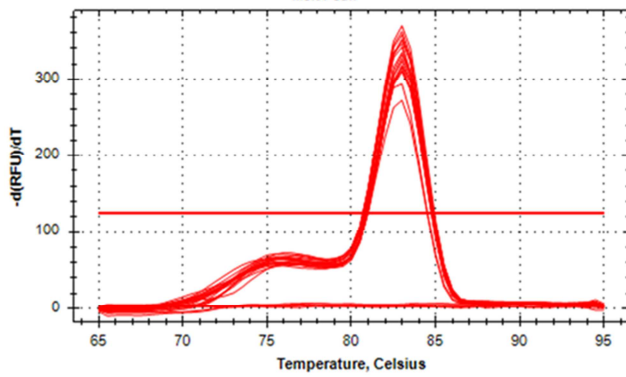
ANEXOS

Anexo A – Curvas de dissociação de iniciadores utilizados no estudo

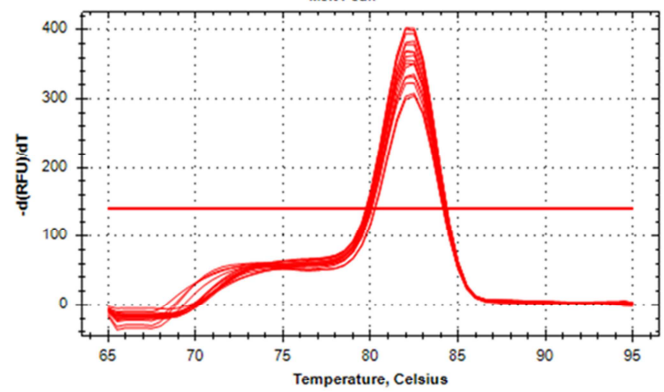


p58^{ipk}

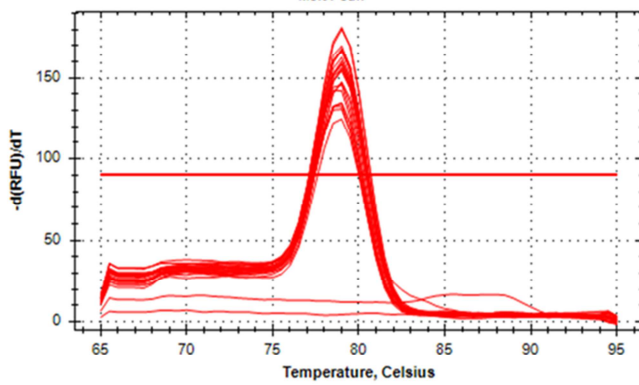
Melt Peak

*Pdia4*

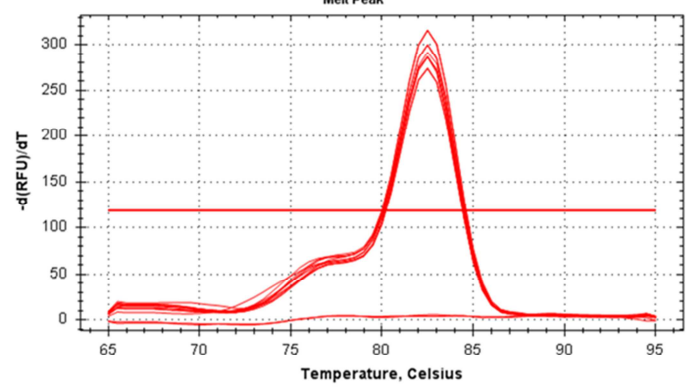
Melt Peak

*Spliced Xbp-1*

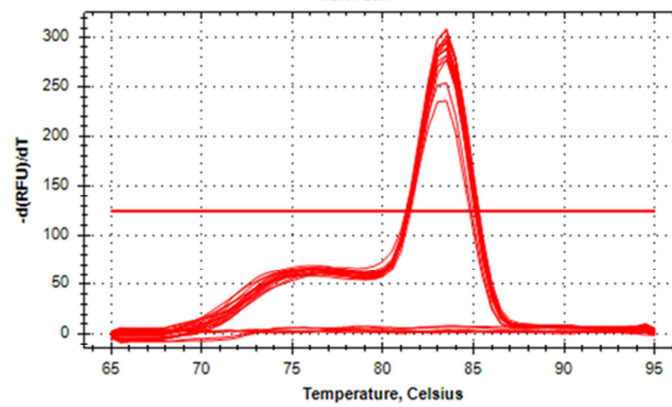
Melt Peak

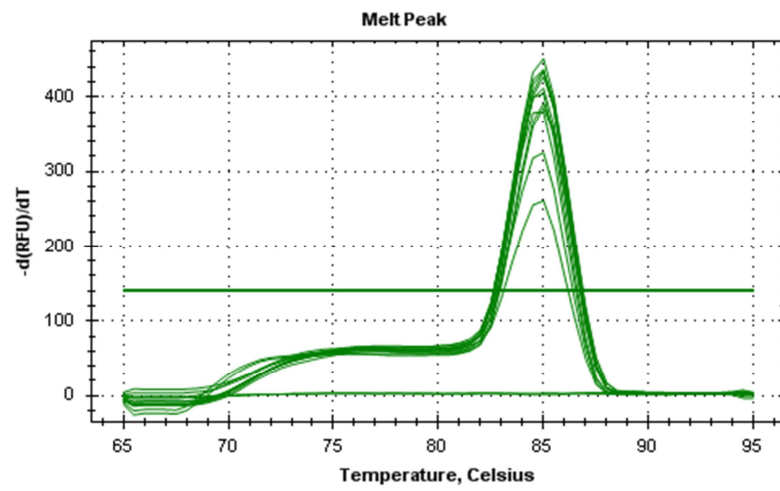
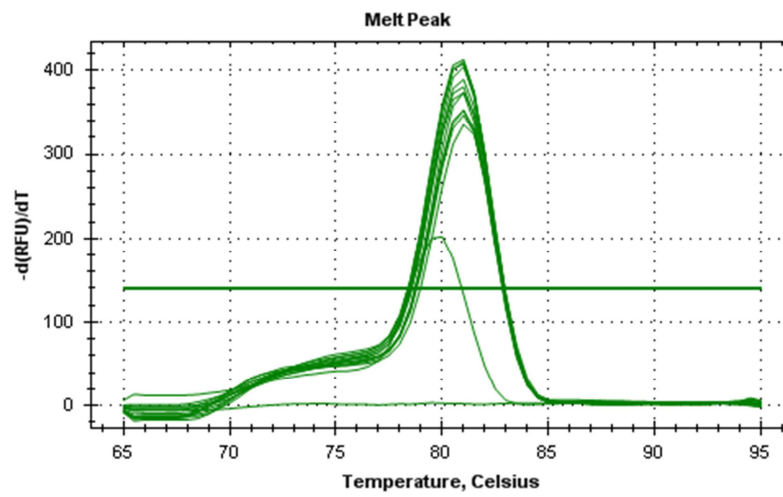
*Xbp-1 total*

Melt Peak

*Rpl32*

Melt Peak




HRD1 humano*RPL32* humano

Anexo B – Publicações

1. Mügge, FLB; Silva, AM (2017). Aspirin metabolite sodium salicylate selectively inhibits transcriptional activity of ATF6 α and downstream target genes. Scientific Reports 7: 9190 (published online).

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Aspirin metabolite sodium salicylate selectively inhibits transcriptional activity of ATF6 α and downstream target genes

Fernanda L. B. Mügge & Aristóblo M. Silva

In response to ER stress, activating transcription factor 6 (ATF6) traffics from ER to Golgi apparatus where it is activated by cleavage before being translocated as transcription factor to the cell nucleus. In this work we describe ATF6 α as a newly target of the aspirin metabolite sodium salicylate (NaSal). NaSal treatment of cells induces increases in ATF6 α mRNA and protein levels, but these events are not accompanied by ATF6 activation. Conversely, NaSal inhibited ATF6 transactivating activity elicited by various ER stress-inducing stimuli in different cell types. This resulted in reduced expression of a subset of ATF6 α target genes. Mechanistically, exposure of cells to NaSal results in ATF6 α trapping at the Golgi apparatus, thus preventing nuclear translocation. This study provides evidence that NaSal compound restrains the activity of ATF6 α , thereby preventing activation of a specific subset of ER-stress responsive genes implicated in different cellular responses.

Many studies have shown that various non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) target signaling pathways that are not related to their cyclo-oxygenase (COX) inhibitory mechanism, which was first described for acetylsalicylic acid (ASA, Aspirin)¹. Growing evidence demonstrate that these compounds exhibit remarkable effects on the unfolded protein response (UPR) (reviewed by ref. ²), which is triggered by the accumulation of unfolded proteins within the endoplasmic reticulum (ER), the event known as ER stress.

The UPR signaling is elicited within ER upon accumulation of malformed proteins, resulting in the activation of transmembrane sensors ATF6, IRE1 and PERK. These sensors remain inactive under unstressed conditions, a state which is maintained by the association of their luminal domains to the chaperone GRP78/BiP^{3,4}. The dissociation of BiP from their luminal domains had long been taken as the only mechanism responsible for ATF6, PERK and IRE-1 activation. Recent studies, however, have indicated that unfolded proteins can interact directly with the luminal domain of IRE1 and induce its dimerization and further activation^{5,6}. A third mechanism has provided evidence that modification of cellular lipid composition sensed by PERK and IRE1 can also lead to UPR activation. In this case, the increased dimerization of their transmembrane domains will eventually promote activation^{7,8}.

PERK is activated by acetyl salicylic acid (ASA) and sodium salicylate (NaSal), members of the salicylate class of NSAIDs, in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). However, treatment with ASA or NaSal does not affect IRE1-mediated XBP-1 mRNA processing⁹. Nonetheless, salicylates can induce many ER stress related genes, being *Gadd153/Chop* the most upregulated⁹⁻¹¹, indicating that NaSal affects the expression or activity of ER stress components.

ATF6 is a glycoprotein that has two isoforms (ATF6 α and ATF6 β), which are ubiquitously expressed¹². ATF6 activation depends on its translocation from the ER membrane to Golgi apparatus, where its cytosolic N-terminal portion is released by two-step proteolysis regulated by the proteases S1P and S2P¹³. The N-terminal fragments of ATF6 α and ATF6 β differ in a sequence of eight amino acids, which is responsible for the enhanced transcriptional activity of ATF6 α . Additionally, studies performed in MEFs deficient of ATF6 α or ATF6 β revealed that only the former is required for the transcriptional activation of ER chaperones^{14,15}.

Laboratory of Inflammatory Genes, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M.S. (email: aristobolo@ufmg.br)

Given that ATF6 α is implicated in stressful and illness conditions, the investigation of compounds targeting the events downstream of ATF6 α ER stress signaling arm is of great interest. Inhibitors of S1P and S2P proteases have been developed, but they also affect the activation of other S1P and S2P targets, such as sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)^{16–20}. Drugs that specifically target ATF6 activity, on the other hand, had been unreported until recently. Two studies have demonstrated that a new class of drugs displays specific inhibitory properties on ATF6 α activity by trapping of ATF6 α in the ER during the organelle stress^{21, 22}.

Here we show that salicylates also display inhibitory properties on ATF6 α activation; however, by a distinct mechanism. NaSal treatment induces an increase in ATF6 α mRNA and protein levels with no resulting translocation to the nucleus. Otherwise, NaSal treatment inhibited ATF6 α activity by likely blocking its proteolytic processing at the Golgi apparatus during ER stress. Additionally, the activation of ATF6-related transcription factors CREBH and OASIS, which are also cleaved by S1P and S2P proteases at the Golgi apparatus^{23–25}, is not inhibited by NaSal. Our findings presented here implicate ATF6 α as a novel target for the NaSal biological actions with potential implications in clinical settings.

Results

Sodium salicylate elicits the expression of Atf6 α in cells. To assess the expression of Atf6 α in response to sodium salicylate, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were treated with NaSal 20 mM at different time points as well as with increasing concentrations of NaSal for 12 hours. The increase in the mRNA levels of *Atf6 α* peaked at 12 hours after treatment (Fig. 1a). At this same time interval, the concentration of NaSal capable of inducing an increase in the mRNA levels of Atf6 α ranged significantly from 5 to 20 mM (Fig. 1b). Interestingly, the steady state mRNA levels of *Atf6 β* in cells were rather decreased upon treatment with NaSal (Fig. 1c). Because the expression of Atf6 can be regulated through PERK²⁶, we investigated Atf6 α expression in Perk-KO MEFs treated with NaSal and found that while tunicamycin-induced expression of ATF6 α was shown to be dependent on PERK, the increase in *Atf6a* mRNA and protein levels induced by NaSal was not affected in the absence of the kinase (Fig. 1d,e). Furthermore, analysis of Atf6 α protein levels indicates that the protein accumulates in cells treated with NaSal, but with no evident cleavage of the full ATF6 α to its cytosolic portion of 50 kDa. As expected, treatment of cells with tunicamycin led to the cleavage of endogenous ATF6 α (Fig. 1e) and EGFP-ATF6 in transfected cells (Fig. 1f), which was accompanied by formation of the full ATF6 doublet into two distinct bands, being the faster migrating the unglycosylated form as predicted¹² (Fig. 1e,f). In addition, gene reporter studies indicate that NaSal fails to induce any increase in the ATF6-mediated transcriptional activity (Fig. 1g).

ATF6 α -dependent genes are not induced upon sodium salicylate treatment. Intrigued by the result that ATF6 transcriptional activity is not induced in cells treated with NaSal, we next examined the expression of ER stress responsive genes in wild-type and ATF6 α knockout MEFs that were treated with NaSal or tunicamycin. The results show that the expression of all chosen target genes, except *Chop/Gadd153* and *p58^{ipk}*, was not induced by NaSal (Fig. 2a–h). Genes whose expression are partly dependent on ATF6 α during tunicamycin-induced ER stress, like *BiP/Grp78* (Fig. 2a), *Pdia4* (Fig. 2c) *Herpud-1* (Fig. 2d), *Hrd-1* (Fig. 2f) and *Xbp-1* (Fig. 2g) showed no significant changes in their steady state mRNA levels in NaSal-treated cells. These genes harbor ATF6-binding elements ERSE, ERSE-II, UPRE and/or UPRE-II^{27–29} in their promoter regions, thereby indicating that Atf6 α does not undergo activation in MEFs exposed to NaSal. In addition, the analysis of spliced *Xbp-1* mRNA levels in Fig. 2h confirmed previous observations that IRE1 activation is not induced by NaSal⁹.

Sodium salicylate inhibits downstream events of ER stress-mediated ATF6 α activation. We next examined if NaSal would affect ATF6 activation triggered by inducers of ER stress. Then, MEFs were transfected with p5xATF6-GL3 and further pre-treated with 20 mM NaSal for one hour, followed by treatment with DTT, thapsigargin (Tg), brefeldin A (BFA) or tunicamycin (Tm). Figure 3a shows that ATF6 α transcriptional activity is significantly induced upon treatment with any of the ER stress-triggering compounds. However, ATF6 activity was dramatically reduced, if not abolished, in cells that were previously exposed to NaSal and further treated with the ER stress compounds. Similar effect was observed in cells that were simultaneously treated with proteasome inhibitor bortezomib (Sup. Figure 1).

We observed that inhibition of transactivating activity of ATF6 by NaSal is not cell type specific, because similar results were obtained in HEK293, A549 and HepG2 cells treated with tunicamycin or thapsigargin (Fig. 3b,c,d). Such an effect was also seen in Atf6 α knock-out MEFs transfected with pEGFP-ATF6 that was expressed at similar levels in the different treatment conditions (Fig. 3e; Sup. Figure 2). At 10 mM, NaSal also inhibited ATF6 activation induced by DTT (Fig. 3f).

The analysis of the expression of ATF6 α itself and the downstream target genes revealed that the mRNA levels of *Chop/Gadd153*, total and spliced *Xbp-1* remained upregulated in cells that were exposed to NaSal and further treated with Tm (Fig. 4a–d). However, the increase in the mRNA levels of *Grp78/BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1*, *Hrd-1* and *p58^{ipk}* upon tunicamycin treatment was significantly impaired in the presence of NaSal (Fig. 4e–i).

The effects of NaSal on ATF6 α activity and its target genes are not affected by the absence of PERK. Because PERK is implicated in biological events triggered by NaSal⁹ we carried out experiments in MEFs devoid of Perk. The result of gene reporter study (Fig. 5a) indicates that ATF6 transcriptional activity remains significantly inhibited by NaSal even in the absence of Perk. Furthermore, the analysis of the expression of ATF6 α target genes *Hrd-1* and *Pdia4* revealed that Perk is dispensable for the inhibitory effects of NaSal (Fig. 5b,c).

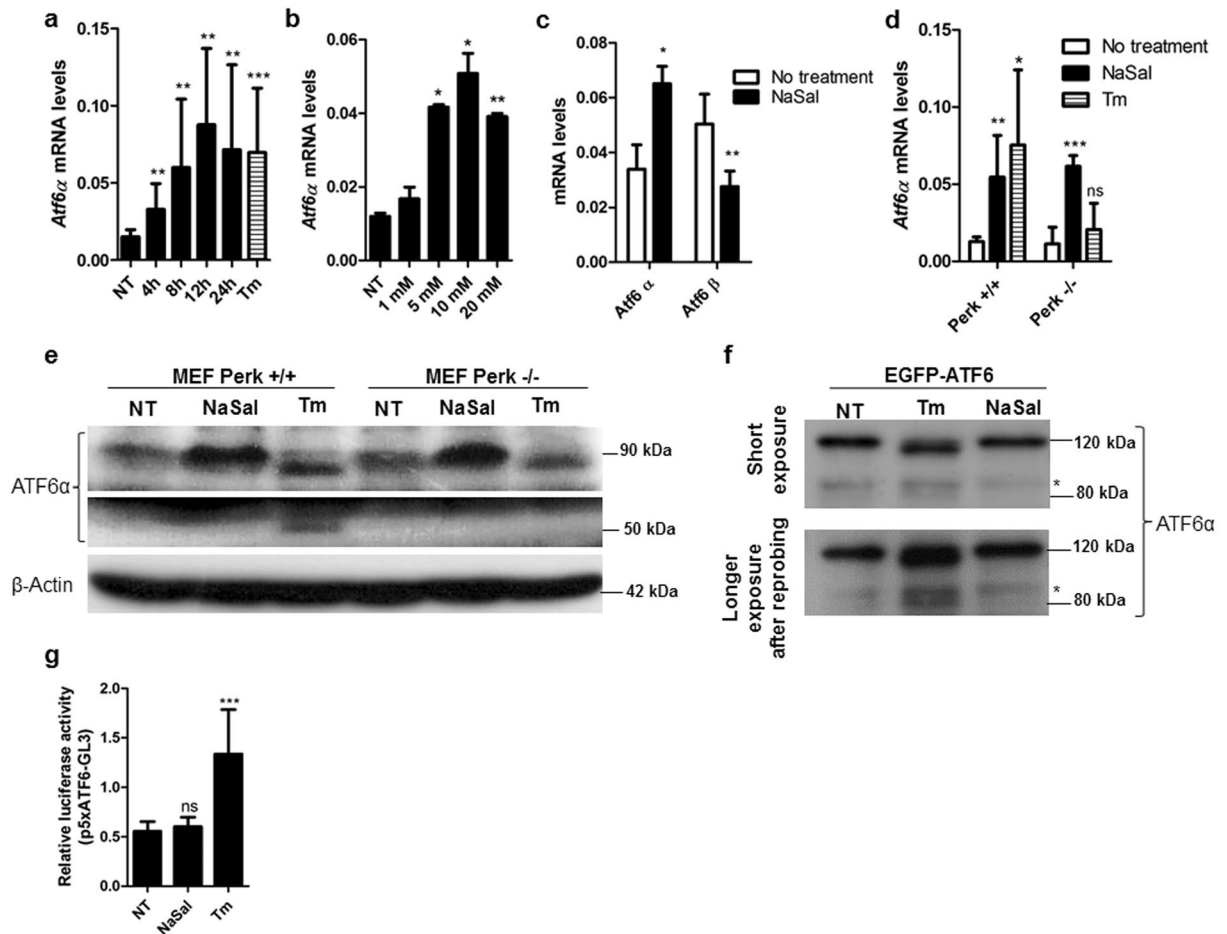


Figure 1. ATF6 α expression but not its cleavage is induced in sodium salicylate treated cells. **(a)** MEFs were treated with 20 mM NaSal for the indicated times or 3 μ g/mL tunicamycin (Tm) for 8 hours. Total RNA was extracted and RT-qPCR for ATF6 α expression was performed after cDNA synthesis. **(b)** MEFs were treated for 12 hours with the indicated concentrations of NaSal and ATF6 α expression levels were analysed through RT-qPCR. **(c)** cDNA samples from MEFs treated with 20 mM NaSal for 8 hours were analysed for the expression of ATF6 α and ATF6 β using specific primers. **(d)** Wild-type and Perk knockout MEFs were left untreated or treated with 20 mM NaSal or 3 μ g/mL Tm. Total RNA was extracted and RT-qPCR for ATF6 α expression was performed after cDNA synthesis. **(e)** Wild-type and Perk knockout MEFs were left untreated (NT) or treated with 20 mM NaSal or 5 μ g/mL Tm for eight hours. Cell lysates were fractionated in 10% polyacrylamid gel, blotted on a PVDF membrane and incubated with anti-ATF6 α and anti- β -actin antibodies. **(f)** MEFs were transfected with pEGFP-ATF6. Forty-eight hours after transfection, cells were treated with 20 mM NaSal or 5 μ g/mL tunicamycin for eight hours. Cell lysates were blotted and analysed with anti-ATF6 α antibody after western blotting. Asterisk indicates a nonspecific band. **(g)** MEFs were transfected with p5xATF6-GL3 and pRL-TK and treated with 20 mM NaSal or 3 μ g/mL Tm for 8 hours. Cell lysates were collected and assayed for Firefly and *Renilla* luciferase activities. *, ** and *** indicate statistically significant differences in relation to untreated cells ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$ respectively) as determined by unpaired two-tailed Student's T-test. ns indicates not significant differences. $n = 3$ for each experiment and results are plotted as mean \pm SD. Western Blots are representative of two independent experiments. Images of full-length western blots can be found in Supplementary Fig. 3.

NaSal selectively inhibits the protease-mediated cleavage and nuclear translocation of ATF6 α .

To further investigate whether the cellular localization of ATF6 α is affected in cells exposed to NaSal, we performed fluorescence microscopy studies where MEFs were transfected with the pCMVshort-EGFP-ATF6 plasmid³⁰ and further treated with DTT or NaSal. The result (Fig. 6a) shows that ATF6 α is translocated to the nucleus in cells that were treated with DTT for 1 hour. In cells treated with sodium salicylate and further treated with DTT, however, nuclear translocation of ATF6 α is completely abolished. Nonetheless, the protein seems to accumulate at punctate spots near nucleus. Similar observation can be made when cells were treated only with NaSal for 2 hours.

Likewise, flow cytometry studies reveal the absence of ATF6 α in the nuclei from HEK293 cells transfected with pEGFP-ATF6 and treated with NaSal plus DTT (Fig. 6b). While the counts of nuclei with higher fluorescence levels increased upon DTT treatment, this is not observed for the nuclei obtained from cells treated with NaSal

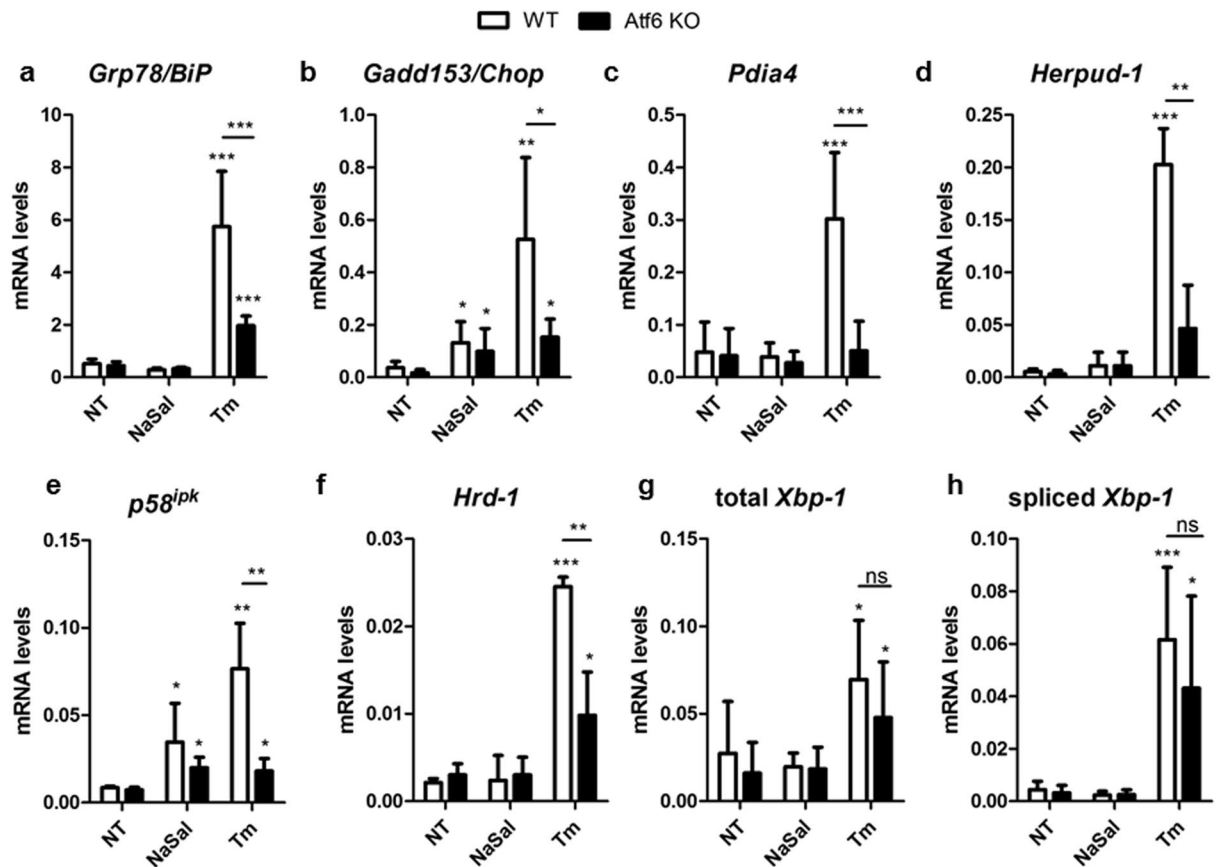


Figure 2. RT-qPCR analysis of ER stress and Atf6 α target genes expression in cells treated with sodium salicylate. Wild-type and Atf6 α knockout MEFs were treated with 20 mM NaSal or 3 μ g/mL tunicamycin for the indicated time. Total RNA was extracted and RT-qPCR analysis of relative mRNA content for BiP/*Grp78* (a), CHOP/*Gadd153* (b), *Pdia4* (c), *Herpud-1* (d), *p58^{ipk}* (e), *Hrd-1* (f), total *Xbp-1* (g) and spliced *Xbp-1* (h) were performed after cDNA synthesis. *, ** or *** indicate statistical significant differences between groups ($p < 0.05$; $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively) as determined by ANOVA followed by Bonferroni's test. ns indicates not significant differences. Data were collected from three independent experiments. Results are plotted as mean \pm SD.

in the presence or absence of DTT. The N-EGFP-ATF6 cleaved fragment was found in nuclear extracts obtained from tunicamycin treated cells, but not in cells treated with salicylate where the levels of N-EGFP-ATF6 α were as similar as in the untreated. This effect is remarkable when the endogenous N-ATF6 α (50 kDa) is analysed (Fig. 6c). Taken together, these results indicate that inhibition of ATF6 α activity by NaSal is due a likely mechanism that prevents ATF6 α from being cleaved, thus hampering its access to the nucleus.

ATF6 and ATF6-related bZIP transcription factors CREBH and OASIS share similar structure and mechanism of cleavage-mediated activation, as they are also ER-located and are activated at the Golgi apparatus by S1P and S2P-mediated cleavage^{23,24}. To investigate whether NaSal affects the cleavage of these transcription factors, HEK293 cells were transfected with the encoding plasmids, followed by pre-treatment with NaSal and further treatment with Brefeldin A (CREBH-transfected) or tunicamycin (OASIS-transfected), in the presence of proteasome inhibitor bortezomib. While the cleavage of CREBH induced by Brefeldin A remained unaffected in cells pre-treated with NaSal (Fig. 6d), the cleavage of OASIS induced by tunicamycin seemed to be enhanced in the presence of NaSal (Fig. 6e). These results indicate that NaSal selectively inhibits the proteolysis of ATF6 α . Furthermore, the unglycosylated status of ATF6 α induced by tunicamycin was found to be mostly unaffected by NaSal pretreatment, indicating that the lack of ATF6 α activation is probably not related to its glycosylation levels (Fig. 6f).

Because molecular events at the ER and Golgi apparatus during ER stress precede ATF6 α translocation to the nucleus, we determined its subcellular localization in these organelles in cells that were treated with NaSal, in the presence or not of ER stress stimulus. The result (Fig. 7) shows that ATF6 α is mostly localized at ER in both untreated and NaSal-treated cells. In cells that were treated with DTT in the absence or presence of NaSal, ATF6 α is localized at both ER and Golgi apparatus. This result indicates that in the presence of NaSal ATF6 α is retained at Golgi apparatus in ER-stressed cells.

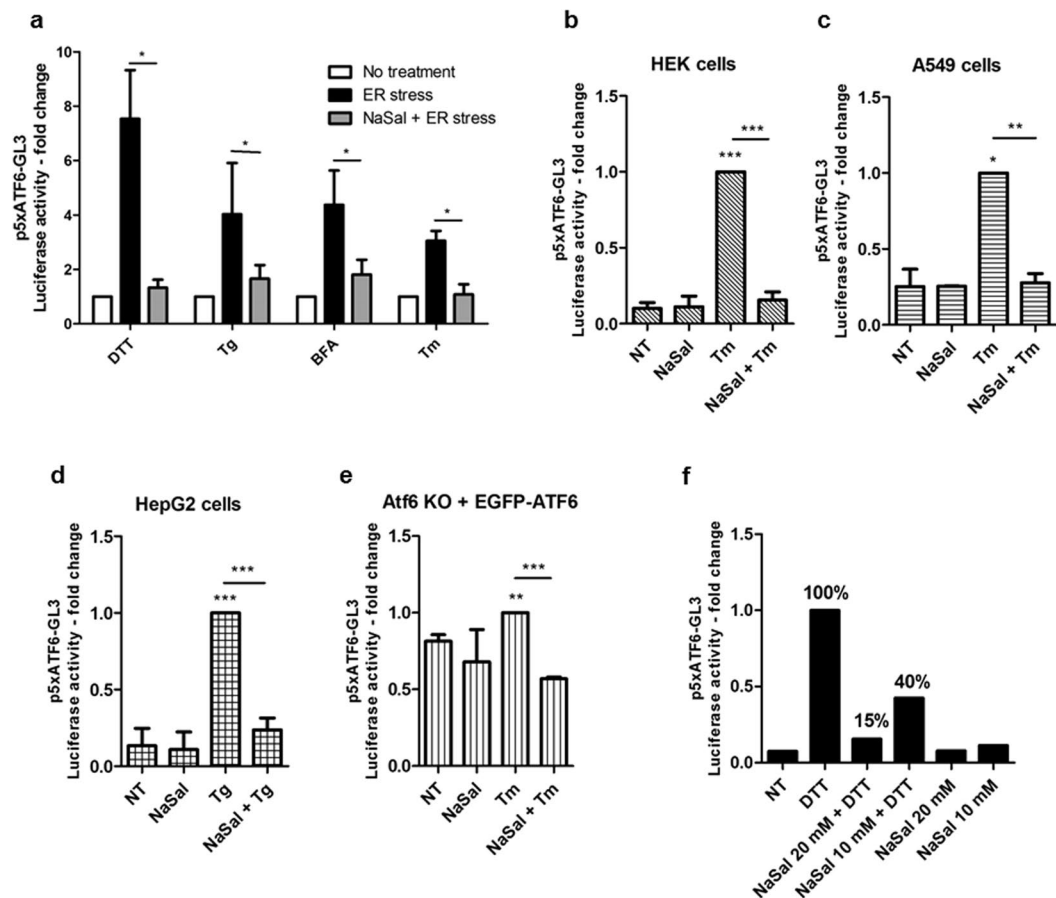


Figure 3. Salicylate inhibits ATF6-mediated ER stress. (a) Effect of NaSal on ATF6 α transcriptional activity induced by ER stress inducers. Twenty-four hours post-transfection with p5xATF6-GL3 and pRL-TK plasmids, MEFs were left untreated or pretreated for one hour with NaSal 20 mM, followed by treatment or not with tunicamycin (Tm, 3 μ g/mL), DTT (1 mM), brefeldin A (BFA, 5 μ g/mL) or thapsigargin (Tg, 1 μ M) for six hours. Cell lysates were harvested and assayed for Firefly and *Renilla* luciferase activities. Results are presented as the fold increase of luciferase activity in treated cells compared to not treated ones. HEK293 (b), A549 (c), HepG2 (d) cells, and pEGFP-ATF6 α -complemented Atf6 α knockout MEFs (e) were transfected and treated with Tm in the presence or absence of NaSal as described in a. As additional control, cells were also left in the presence of the NaSal 20 mM only over the full time of treatment, i.e., seven hours. The medium remained unchanged between treatments. *, ** or *** indicate statistical significant differences between groups ($p < 0.05$; $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively) as determined by unpaired two-tailed Student's T-test. $n = 3$ for each experiment and results are plotted as mean \pm SD. (f) HEK293 cells transfected with p5xATF6-GL3 and pRL-TK were treated with 20 or 10 mM NaSal and/or 1 mM DTT for identical time interval as in b.

Discussion

Our findings presented here show that sodium salicylate inhibits the activation of ATF6 α transcription factor at the latest events preceding its nuclear translocation triggered by different ER stress inducing stimuli. This led to specific inhibition of the expression of downstream target genes.

Salicylates and other classes of non-steroidal anti-inflammatory drugs have been shown to interfere with the UPR and related pathways². Salicylates can inhibit protein synthesis^{31,32}, which was later proved to be dependent on PERK kinase activation coupled to eIF2 α phosphorylation⁹. GCN2, another eIF2 α kinase, has also been implicated in salicylate-induced effects on ER stress components, as the expression of many ER stress related genes, including ATF6 α , was shown to be reduced in GCN2-deficient cells¹⁰. IRE1, on the other hand, is not activated in salicylate treated cells⁹. NaSal can alleviate ER stress through the reduction of the expression of ATF6, CHOP and BiP on primary human adipocytes exposed to a number of distinct treatment conditions³³. In hepatic cells, the simultaneous treatment with NaSal and tunicamycin decreased the phosphorylation of PERK and the expression of BiP and CHOP induced by tunicamycin alone³⁴.

As the effects of these drugs on ATF6 α were not yet fully studied, we investigated the expression and activation of ATF6 α on sodium salicylate-treated cells. Our results show that NaSal elicits the expression of *Atf6* α (but not *Atf6* β) in MEFs (Fig. 1a–c), but this is not accompanied by Atf6 activation (Fig. 1g). Also, NaSal treatment promotes Atf6 α protein accumulation but not its protease-mediated cleavage processing that occurs during ER stress (Fig. 1e,f). Further investigation revealed that, unlike for the response to tunicamycin treatment²⁶, the

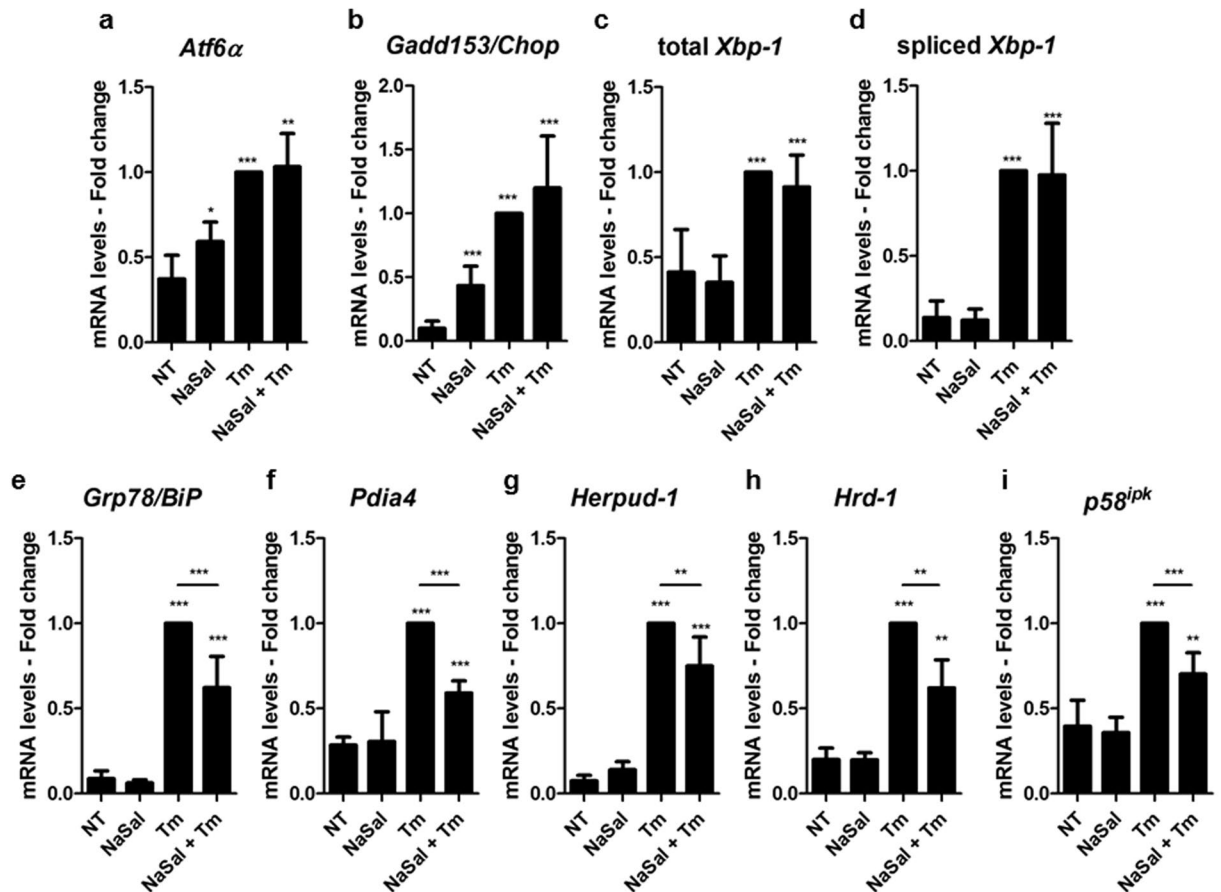


Figure 4. Inhibition of the expression of ATF6 α target genes by NaSal. (a to i) MEFs were left untreated (NT) or treated for one hour with NaSal 20 mM prior to addition of tunicamycin (Tm, 3 μ g/mL). After six hours of treatment or not with Tm, total RNA was isolated for cDNA synthesis. Cells were also left in the presence of NaSal 20 mM as described in Fig. 3. Expression of *Atf6 α* , *Chop*, total *Xbp-1*, spliced *Xbp-1*, *BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1*, *Hrd-1* or *p58^{ipk}* was analysed by RT-qPCR. *, ** or *** indicate statistical significant differences between groups ($p < 0.05$; $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively) as determined by unpaired two-tailed Student's T-test. $n = 3$ for each experiment. Results are plotted as mean \pm SD.

expression of *Atf6 α* induced by NaSal is not impaired in the absence of Perk (Fig. 1d,e). This indicates that an alternate pathway likely mediated through GCN2 kinase is involved in the ATF6 α expression in cells treated with NaSal¹⁰. Consistent with the observation that NaSal treatment induced neither the activation of ATF6-binding site nor the cleavage of full length ATF6 α , translocation of EGFP-ATF6 to the nucleus was not observed in NaSal-treated cells (Fig. 6a-c).

As a transcriptional regulator of UPR, ATF6 α drives the expression of genes that can increase the ER folding capacity or accelerate the degradation of unfolded proteins. Besides *Gadd153* and *p58^{ipk}*, whose expression is mostly regulated by the PERK/ATF4 arm of UPR in NaSal-treated cells, none of the other ATF6 α target genes studied in this work had their expression induced by salicylate (Fig. 2). This builds up additional evidence that ATF6 α activation is not elicited upon NaSal treatment of cells. We also observed that *Xbp1* mRNA processing is not induced by NaSal, confirming previous reported data that IRE1 remains unaffected in the presence of the compound⁹ (Fig. 2h).

In different cell types, ATF6 activation triggered by different ER stress inducing agents was remarkably inhibited by NaSal (Fig. 3a-d). Similar effect was also seen in *Atf6 α* knockout MEFs transfected with EGFP-ATF6, showing that this effect is not exclusive for endogenous ATF6 and is not related to the inhibition of ATF6 α mRNA transcription (Fig. 3e). Because the inhibitory effect was also demonstrated in Perk deficient cells (Fig. 5), we ruled out the possibility that the inhibition of ATF6 activation could be a result from salicylate-induced protein synthesis inhibition⁹. Previous studies had demonstrated reduction of the expression of ATF6 α , CHOP and BiP on primary human adipocytes exposed to NaSal and ER-stress inducing stimuli for 24 hours³³. In hepatic cells, the simultaneous treatment with 10 mM NaSal and tunicamycin decreased the phosphorylation of PERK and the expression of BiP and CHOP induced by tunicamycin alone³⁴. We found that expressions of *BiP*, *Pdia4*, *Herpud-1*, *Hrd-1* and *p58^{ipk}* were significantly but not completely inhibited in cells pre-treated with NaSal (Fig. 4e-i). Since the expression of *Atf6 α* itself, *Chop* and spliced *Xbp-1* remained unaffected by NaSal treatment (Fig. 4a-d), these evidence support that the activation of Perk/ATF4 and IRE1/XBP1 pathways induced by tunicamycin remain

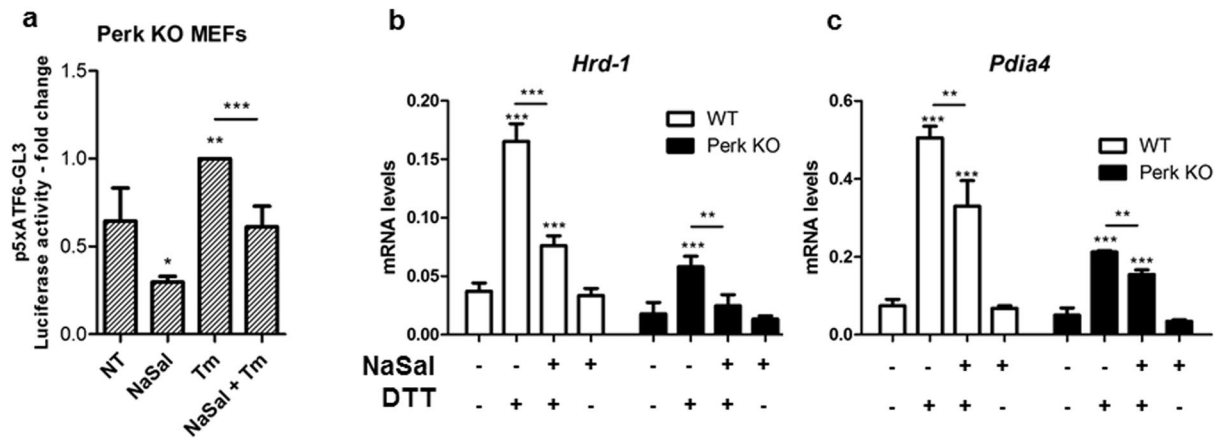


Figure 5. Perk is dispensable for the effects of NaSal on ATF6 α activity. **(a)** Effect of NaSal on the Tm-induced ATF6 α transcriptional activity in the absence of Perk. Twenty-four post-transfection with p5xATF6-GL3 and pRL-TK plasmids, Perk KO MEFs were left untreated or pretreated for one hour with NaSal 20 mM, followed by treatment or not with tunicamycin 3 μ g/mL for six hours. Cells were also left in the presence of NaSal 20 mM only for the additional time. **(b and c)** Effect of NaSal on DTT-induced expression of ATF6 α target genes in the absence of Perk. Wild type and Perk KO MEFs were treated as similar as in Fig. 4, except that DTT (1 mM) was used as the ER stress inducer. Total RNA was isolated for cDNA synthesis and further analyses of *Hrd-1* and *Pdia4* expression by RT-qPCR. *, ** or *** indicate statistical significant differences between groups ($p < 0.05$; $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively) as determined by unpaired two-tailed Student's T-test. $n = 3$ for each experiment and results are plotted as mean \pm SD.

intact in the presence of NaSal. The absence of PERK, on the other hand, has no impact on the inhibition of ATF6 α target genes expression by NaSal (Fig. 5b,c). Regarding these genes, some of the different observations made in other studies could result from variations on the NaSal concentration and time intervals, besides cell types used.

Additional data show that the nuclear translocation of ATF6 α induced by ER stress is inhibited by NaSal pre-treatment (Fig. 6a–c). Blockage of ATF6 α cleavage by NaSal could be a result of trapping of the protein in the ER, which is the proposed mechanism of action for the newly discovered drugs Ceapins²². Nonetheless, subcellular localization of ATF6 α in the presence of NaSal indicates accumulation in perinuclear punctae, which co-localize to mannosidase II (Fig. 7), supporting the idea that NaSal traps ATF6 α in the Golgi apparatus and inhibits the proteolytic processing mediated by S1P and S2P proteases. ATF6-related b-Zip transcription factors CREBH and OASIS are cleaved by the same proteases in response to brefeldin A and tunicamycin, respectively³⁵. However, NaSal did not inhibit the proteolytic processing of CREBH induced by brefeldin A and enhanced OASIS cleavage induced by tunicamycin (Fig. 6d,e), indicating that it does not inhibit S1P and S2P protease activities. We speculate that the selective inhibition of ATF6 α cleavage may result from a preceding post-translational modification (PTM) on ATF6 α caused by NaSal that would impair its processing by S1P and S2P proteases. S1P and S2P inhibitors, such as AEBSF and Nelfinavir have been previously described, but they do not specifically target ATF6 α , and therefore can have uncontrolled effects on other S1P and S2P substrates, like other ATF6-related bZip transcription factors and SREBP transcription factors^{16–20}.

Various studies have shown that ATF6 can undergo ubiquitylation^{36,37}, and phosphorylation^{38–40}, besides undergoing distinct levels of glycosylation^{12,41}. In principle, alteration of the glycosylation status of ATF6 by NaSal can be ruled out, as the unglycosylated form of ATF6 α induced by tunicamycin remains intact in cells that are pre-exposed to NaSal (Fig. 6f). Aspirin has been shown to inhibit non-enzymatic glycosylation (glycation)^{42,43}, but the mechanism is dependent on protein acetylation, which is unlikely to involve the salicylate compound. It is also unlikely that NaSal could somehow provoke phosphorylation of ATF6 as this PTM results not only in an increased ATF6 processing in the Golgi apparatus³⁸ but also in nuclear translocation³⁹. Finally, we found that the inhibition of ATF6 transactivating activity by NaSal also occurred when cells were simultaneously exposed to proteasome inhibitor bortezomib (Sup. Figure 1). Treatment of cells with proteasome inhibitors has been shown to stabilize N-ATF6³⁷. Therefore, if the inhibitory effect of NaSal was a result of accelerated degradation of N-ATF6 by the proteasome, one would expect this effect to be attenuated upon treatment with bortezomib. Gentz *et al.*¹⁰ showed that NaSal can induce the expression of several ubiquitination genes, including *Sel1l*, which is necessary for the proteasome mediated degradation of full ATF6 and seems to have a positive effect on ATF6 activation⁴⁴. Nonetheless, it could also be possible that NaSal could affect the oligomerization state of ATF6 α and therefore impair its activation. The transport to the Golgi apparatus has been shown to occur only for monomeric ATF6 α ⁴⁵.

Our findings reveal ATF6 α as a target for salicylate drugs in various cell types. By the results presented here we demonstrate that (1) NaSal induces ATF6 α expression and (2) inhibits the activation of ATF6 during ER stress. While the inhibition of ATF6 activity may result from direct effects of NaSal on the protein activity, the observed effects of NaSal on ATF6 α expression make it difficult to rule out indirect effects, that is, being mediated by other cellular components upstream to the transcriptional activation events. Indeed, we were able to previously

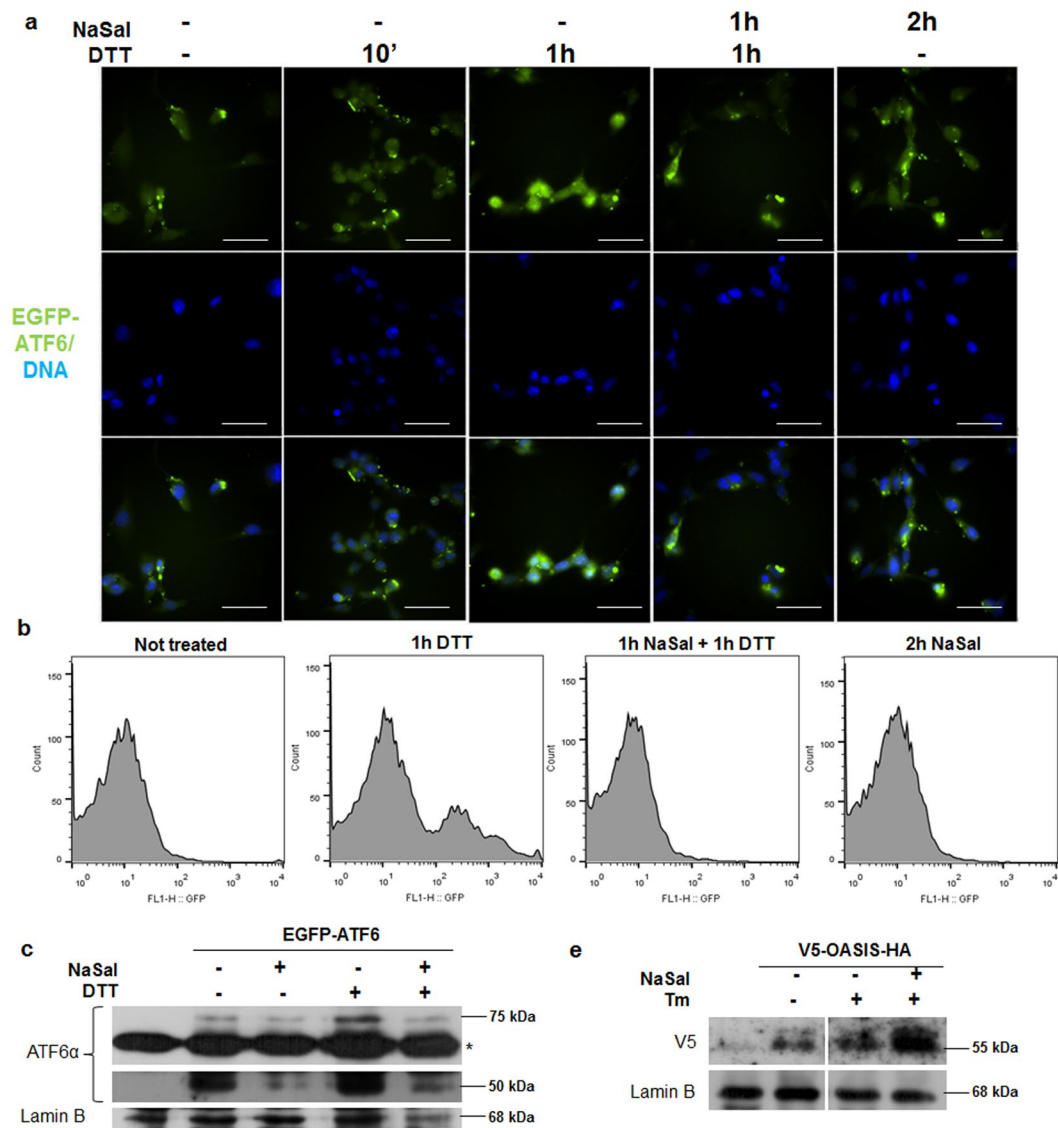


Figure 6. Salicylate inhibits ATF6 α translocation to the nucleus. **(a)** MEFs were plated on coverslips and transfected with 1 μ g of pCMVshortEGFP-ATF6. Eight hours after transfection cells were treated either with 20 mM NaSal, 1 mM DTT or a combination of both for the indicated times. Cells were then fixed with 4% PFA, counterstained with DAPI and the coverslips were mounted on glass slides. Cells were visualized under 600 x magnification in the fluorescence microscope. White scale bars indicate 50 μ m. **(b)** HEK293 cells were transfected with pEGFP-ATF6 treated either with 20 mM NaSal, 1 mM DTT or pre-treated with NaSal and later with DTT. Cells were carefully collected and lysed with nuclei flow cytometry buffer containing 1% Triton X-100. Nuclei obtained after centrifugation were washed and analysed for green fluorescence in a FACScan flow cytometer. 10,000 events were collected inside the gate determined for nuclei size and granularity and results were plotted as histograms for green fluorescence intensity versus cell counts. **(c)** Nuclei from HEK293 cells transfected pEGFP-ATF6 and treated with 20 mM NaSal and/or 1 mM DTT were collected following flow cytometry protocol and were lysed for nuclear extract obtaining. Extracts were analysed with anti-ATF6 α and anti-lamin B antibodies after western blotting. Asterisk indicates a nonspecific band. **(d)** HEK293 cells were transfected with V5-CREBH-HA for 24 hours where indicated. Cell culture medium was replaced with fresh medium containing 10 μ M bortezomib and cells were left untreated, treated with 5 μ g/mL brefeldin A (BFA) for six hours or pre-treated with 20 mM NaSal for one hour and later with BFA for six hours. Whole cell extracts were obtained after lysis with RIPA buffer and analysed with anti-V5 and anti- β -actin after western blotting. **(e)** HEK293 cells were transfected with V5-OASIS-HA where indicated. Twenty four hours after transfection, cell medium was replaced with medium containing 10 μ M bortezomib, followed by treatment with 5 μ g/mL tunicamycin (Tm) for six hours or pre-treated with 20 mM NaSal for one hour and later with Tm for six hours. Cell nuclei were collected and processed as described in (c) Samples were analysed using anti-V5 and anti-lamin B antibodies. **(f)** HEK293 cells transfected with pEGFP-ATF6 were treated with 20 mM for

the indicated times and/or with 5 µg/mL Tm for six hours. Cytoplasmic cell extract was collected after cell lysis and nuclei separation and analysed with anti-ATF6α and anti-β-actin antibodies after western blotting. Results are representative of two independent experiments. Images of full-length western blots can be found in Supplementary Fig. 3.

demonstrate that GCN2 kinase is implicated in mediating the effects of NaSal on the expression of ER stress responsive genes, including ATF6α¹⁰.

At this point, it is uncertain whether the mechanism by which NaSal inhibits ATF6α activity is direct. However, the evidence shown in Fig. 6c–e, where NaSal selectively inhibits ATF6 cleavage, but fails to inhibit the cleavage of two ATF6-related bZip transcription factors (CREB-H and OASIS) during ER stress, support this idea; especially because they are all targets for S1P and S2P proteases (before being translocated into the nucleus). As this is a very late event that leads to ATF6 activation, it is unlikely that those proteases are inhibited by NaSal. Moreover, NaSal pretreatment of cells did not exhibit inhibitory effects on the other two arms of the unfolded protein response (Fig. 4). It is also possible that in the presence of NaSal, ATF6 may undergo conformational changes that in turn will oligomerize in the Golgi apparatus, and thus prevent it from being cleaved by S1P protease.

It must be highlighted that salicylates are ancient drugs used therapeutically to treat inflammatory disorders as well as to prevent malignancies⁴⁶. Despite a number of reports, it remains unclear how salicylates affect carcinogenesis. Interestingly, activation of ATF6α-Rheb-mTOR pathway promotes survival of quiescent squamous carcinoma cells and subsequent adaptation to chemotherapy³⁹. This might be an interesting cellular model to test salicylates as chemopreventive agents in ATF6-mediated chemoresistance of tumor cells.

Materials and Methods

Cells, chemicals, plasmids and antibodies. Wild type and ATF6α knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were kindly provided by Dr. Randall Kaufman (Sanford-Burnham Institute, La Jolla, CA). Wild type and PERK knockout MEFs were a gift from Dr. David Ron (University of Cambridge, UK). MEFs, A549, HepG2 and HEK293 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin-Streptomycin solution at 37 °C with 5% CO₂. Sodium salicylate, tunicamycin and brefeldin A were purchased from Sigma. Dithiothreitol (DTT) was from Promega (WI, USA) and thapsigargin from Tocris Biosciences (UK). NaSal was prepared at 1 M in sterile deionized water and then passed through a 0.22 µm filter. Antibodies used in this study include rabbit anti-ATF6α (sc-22799, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), mouse anti-beta actin (Sigma-Aldrich, MO, USA), mouse anti-V5 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA), rabbit anti-Lamin B (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rabbit HRP (Cell Signalling Technology, MA, USA) and rabbit anti-mouse HRP (Sigma-Aldrich, MO, USA). Forced expression of EGFP-ATF6 in MEFs was achieved by transfection with pEGFP-ATF6 (purchased from Addgene, #32955⁴⁷) using polyethylenimine (PEI) (Polysciences, PA, USA). For fluorescence microscopy experiments, cells were transfected with pCMV-short-EGFP-ATF6, a kind gift from Dr. Mori (Kyoto University, Japan)³⁰. ATF6α transactivating activity luciferase reporter gene p5xATF6-GL3 (#11976⁴⁸) and the Golgi marker mRuby2-MannII (#55903) were purchased from Addgene. Plasmids for the expression of V5 tagged CREBH and OASIS⁴⁹ were a kind gift from Dr. Peter O'Hare (Imperial College London, UK).

Real time quantitative PCR (RT-qPCR). Total RNA was prepared from MEFs using TRIzol reagent (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, MA, USA) according to manufacturer's instructions. First strand cDNA was obtained with MML-V reverse transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA) following the product protocol. The expression of *Atf6α*, *Atf6β*, *Gadd153/Chop*, *Grp78/Bip*, *Pdia4*, total and spliced *Xbp1*, *Herpud1*, *Hrd1* and *p58^{ipk}* was analysed. Primers sequences in the 5'-3' direction used in this study are: *Atf6α* forward TCGCCTTTTAGTCCGTTCTT, reverse GGCTCCATAGGTCTGACTCC; *Atf6β* forward TGGAGCAGGATGTCCCGTT, reverse CTGTGAAAAGATGTGAGGACTC; *Herpud1* forward GCAGTTGGAGTGTGAGTCG, reverse TCTGTGGATTTCAGCACCCCTTT; *Hrd1* forward CGTGTGGACTTTATGGAACGC, reverse CGGGTCAGGATGCTGTGATAAG; *Pdia4* forward TCCCATTGCTGTAGCGAAGAT, reverse GGGGTAGCCACTCACATCAAAT; *p58^{ipk}* forward GGCGCTGAGTGTGGAGTAAAT, reverse GCGTGAACTGTGATAAGGCG; *Gadd153* forward TGCAGTCATGGCAGCTGAGTC, reverse TAGAACTCTGACTGGAATCTG; *Grp78* forward TGGTATTCTCCGAGTGACAGC, reverse AGTCTCAATGTCCGCA TCC; total *Xbp1* forward AAGAACACGCTTGGGAATGG, reverse ACTCCCCTTGGCCTCCAC; spliced *Xbp1* forward GAGTCCGCAGCAGGTG, reverse GTGTCAGAGTCCATGGGA. *Rpl32* (forward GCTGCCATCTGTTTACGG, reverse TGA CTGGTGCCTGATGAACT) was chosen by experimental validation as the adequate reference gene among various reference genes that included *Gapdh*, *Hprt*, *Atp5b* and *Cyc1*. Results are presented as mRNA levels calculated as 2 to the power of $-\Delta Ct$ (where ΔCt is the difference between Cts of the target gene and *Rpl32* reference gene). Where indicated, gene expression in ER stress-treated samples was used as calibrator.

Cell extracts and immunoblotting. For whole cell extract, cells were washed twice with ice-cold PBS. PBS-EDTA 1 mM was added to the plates and cells were collected in a centrifuge tube. After centrifugation at 600 × g for 5 min, supernatant was discarded and cell pellet was lysed using RIPA buffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 1 mM PMSE; 2 mM sodium orthovanadate; 1 µg/mL pepstatin; 2 mg/mL aprotinin; 1 µg/mL leupeptin). After incubation on ice for 30 min, cell extracts were clarified by centrifugation at 12,000 × g for 15 min. Where indicated, cell extracts were fractionated to cytoplasmic and nuclear fractions. Briefly, cells were washed twice with ice cold PBS and a buffer containing 20 mM Hepes pH 7.9; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.25% NP-40 and protease inhibitors as described

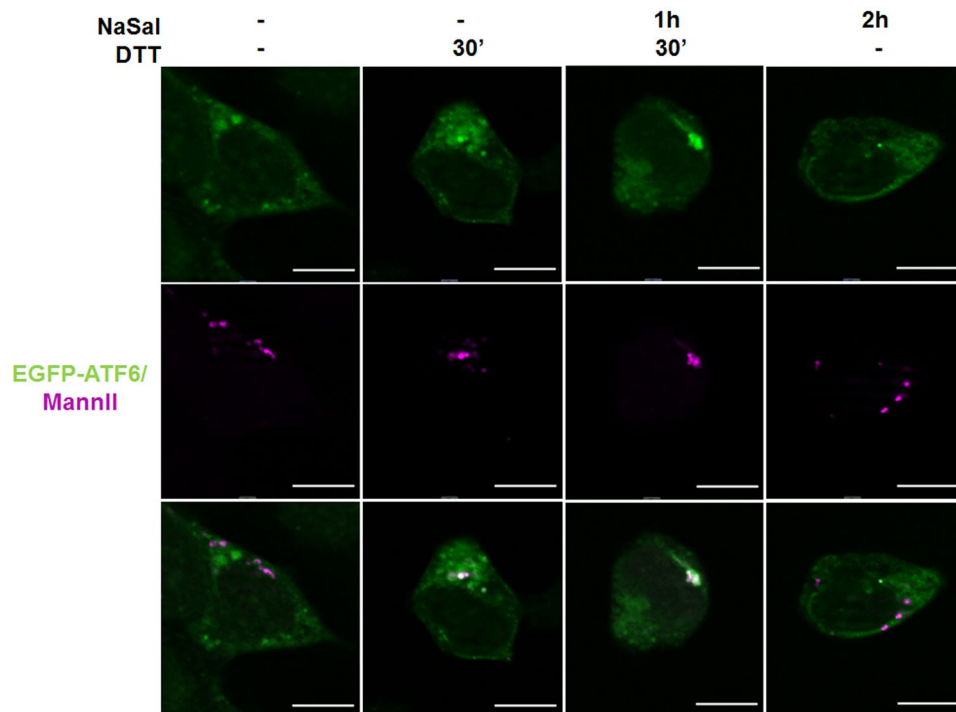


Figure 7. Salicylate treatment traps ATF6 α in the Golgi apparatus during ER stress. HEK293 cells were plated on glass coverslips and transfected with 500 ng pCMVshort-EGFP-ATF6 and 20 ng mRuby2-MannII. Twenty four hours after transfection cells were left untreated or treated with 20 mM NaSal and/or 1 mM DTT for the indicated times. Cells were then fixed with 4% PFA and mounted on glass slides. Cell visualization and image capturing were made using an 63 x immersion objective in an Apotome Fluorescence microscope. White scale bars indicate 20 μ m. Results are representative of two independent experiments.

above was added to the culture plates. After 10 minutes incubation on ice, extracts were centrifuged at $14,000 \times g$ for 1 min. Supernatant containing cytoplasmic fraction was collected into a new tube. For nuclei fractioning, cells were washed twice with ice cold PBS and scrapped with buffer containing 320 mM sucrose; 10 mM Hepes pH 7.4; 5 mM $MgCl_2$ and 1% Triton X-100. After incubation on ice for 10 min and centrifugation at $2,000 \times g$ for 5 min the pellet containing cell nuclei was lysed with 20 mM Hepes pH 7.9; 420 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 25% glycerol and protease inhibitors, as described, for 20 min on ice. Nuclear extract was collected after centrifugation at $14,000 \times g$ for 5 min. Proteins were quantified with Bradford reagent (Bio-Rad, CA, USA). Forty to 50 μ g of cell extracts were fractionated onto SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, MA, USA). After incubation with primary and secondary antibodies, immunoreactive bands were detected with Enhanced Chemiluminescence reagents (ECL) from Bio-Rad according to manufacturer's instructions.

Transient transfection and assay of ATF6 transactivating activity. MEFs, HEK293, HepG2 or A549 cells were plated 24 hours prior to transfection on 24 wells culture plates. Cells were transiently transfected with 400 ng of ATF6 activity reporter p5xATF6-GL3 and 100 ng of pRL-TK *Renilla* reporter using PEI as transfection reagent. Twenty-four hours after transfection, cells were treated either with NaSal, tunicamycin, DTT, brefeldin A or thapsigargin or pretreated for one hour with NaSal and then for additional 6 hours with tunicamycin, DTT, brefeldin A or thapsigargin, without changing the culture medium. Cells were washed once with ice cold PBS and lysed with 200 μ L of Passive Lysis Buffer (Promega). Lysates were assayed for firefly and *Renilla* luciferase using Dual-Luciferase reporter assay from Promega. Measurements were performed in a Lumicount-Packard luminometer, and the ratios between firefly and *Renilla* luciferase were calculated.

Fluorescence microscopy. MEFs were cultured on 13 mm glass coverslips for 24 hours and transfected with 1 μ g of pCMVshort-EGFP-ATF6 (provided by Dr. Mori, Japan³⁰) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. For the experiments where EGFP-ATF6 and Mannosidase II were transiently co-expressed, transfection of HEK293 cells was performed right after trypsinization and cell resuspension, followed by incubation with DMEM medium containing 500 ng of pCMVshort-EGFP-ATF6, 20 ng of mRuby2-MannII and Lipofectamine 2000. Cells were then plated on glass coverslips. Treatments with NaSal or DTT were performed 24 hours after cell plating or cell transfection, followed by cell fixation with 4% PFA. Cell nuclei were counterstained with DAPI using Vectashield (Vector Laboratories) on the coverslips mounted on glass slides. Fluorescence was visualized in a Nikon Eclipse Ti Fluorescence Microscope. For co-localization

experiments, fluorescence was visualized in a Zeiss Apotome Fluorescence Microscope. Both microscopes were used at Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI- ICB/UFMG).

Flow cytometry. HEK293 cells were transfected with pEGFP-ATF6 and treated with DTT or NaSal 24 hours after transfection. Cells were washed twice with ice cold PBS and scrapped with buffer containing 320 mM sucrose; 10 mM Hepes pH 7.4; 5 mM MgCl₂ and 1% Triton X-100. After incubation on ice for 10 min, nuclei were centrifuged at 2,000 × g for 5 min and resuspended in 320 mM sucrose; 10 mM Hepes pH 7.4; 5 mM MgCl₂ without Triton X-100, followed by shearing with a syringe. Nuclei integrity was confirmed by visualization under light microscope using Trypan Blue in a Neubauer chamber. Flow cytometry analysis were performed in a FACScan equipment.

Statistical analysis. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) of the indicated number of independent experiments. For statistical comparisons among groups, p values were calculated using two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Data availability. All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* **231**, 232–235 (1971).
- Mügge, F. & Silva, A. Endoplasmic reticulum stress response in the roadway for the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Endopl Ret Stress Dis.* **2**, 1–17 (2015).
- 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.* **2**, 326–332 (2000).
- 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.* **3**, 99–111 (2002).
- 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.* **5**, a013169 (2013).
- Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science.* **333**, 1891–1894 (2011).
- Volmer, R. & Ron, D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Curr Opin Cell Biol.* **33C**, 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 USA* **110**, 4628–4633 (2013).
- 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.* **282**, 10164–10171 (2007).
- Gentz, S. H., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M. & da Silva, A. M. Implication of eIF2 α kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate. *J Pharm Pharmacol.* **65**, 430–440 (2013).
- Nadanaciva, S. *et al.* Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **272**, 272–280 (2013).
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* **10**, 3787–3799 (1999).
- Ye, J. *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* **6**, 1355–1364 (2000).
- Thuerauf, D. J., Morrison, L. & Glembotski, C. C. Opposing roles for ATF6 α and ATF6 β in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem.* **279**, 21078–21084 (2004).
- Yamamoto, K. *et al.* Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell.* **13**, 365–376 (2007).
- Guan, M., Fousek, K. & Chow, W. A. Nelfinavir inhibits regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding protein-1 and activating transcription factor 6 in castration-resistant prostate cancer. *FEBS J.* **279**, 2399–2411 (2012).
- Guan, M. *et al.* Nelfinavir induces liposarcoma apoptosis through inhibition of regulated intramembrane proteolysis of SREBP-1 and ATF6. *Clin Cancer Res.* **17**, 1796–1806 (2011).
- Guan, M., Su, L., Yuan, Y. C., Li, H. & Chow, W. A. Nelfinavir and nelfinavir analogs block site-2 protease cleavage to inhibit castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep.* **5**, 9698 (2014).
- Hawkins, J. L. *et al.* Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *J Pharmacol Exp Therap.* **326**, 801–808 (2008).
- Okada, T. *et al.* A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* **278**, 31024–31032 (2003).
- Gallagher, C. M. *et al.* Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6 α branch. *eLife.* **5** (2016).
- Gallagher, C. M. & Walter, P. Ceapins inhibit ATF6 α signaling by selectively preventing transport of ATF6 α to the Golgi apparatus during ER stress. *eLife.* **5** (2016).
- Bailey, D., Barreca, C. & O'Hare, P. Trafficking of the bZIP transmembrane transcription factor CREB-H into alternate pathways of ERAD and stress-regulated intramembrane proteolysis. *Traffic.* **8**, 1796–1814 (2007).
- Murakami, T. *et al.* Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem.* **96**, 1090–1100 (2006).
- Omori, Y. *et al.* CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2154–2162 (2001).
- 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.* **22**, 4390–4405 (2011).
- 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.* **273**, 33741–33749 (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.* **107**, 881–891 (2001).

29. Yoshida, H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors Galpha and Gbeta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **21**, 1239–1248 (2001).
30. Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M. & Mori, K. Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* **15**, 2537–2548 (2004).
31. Kwon, G., Hill, J. R., Corbett, J. A. & McDaniel, M. L. Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINm5F cells and rat islets. *Mol Pharmacol.* **52**, 398–405 (1997).
32. Spohn, M. & McColl, I. *In vitro* studies on the effect of salicylates on the synthesis of proteins by guinea pig gastric mucosal tissue. *Biochim Biophys Acta.* **608**, 409–421 (1980).
33. 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.* **397**, 472–478 (2010).
34. Jeong, K. W. *et al.* Hydroxynaphthoic acids identified in a high throughput screening potentially ameliorate endoplasmic reticulum stress as novel chemical chaperones. *Chem Pharma Bull.* **61**, 740–746 (2013).
35. Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A. & Imaizumi, K. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J Biochem.* **149**, 507–518 (2011).
36. Hong, M., Li, M., Mao, C. & Lee, A. S. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. *J Cell Biochem.* **92**, 723–732 (2004).
37. Thuerauf, D. J., Morrison, L. E., Hoover, H. & Glembotski, C. C. Coordination of ATF6-mediated transcription and ATF6 degradation by a domain that is shared with the viral transcription factor, VP16. *J Biol Chem.* **277**, 20734–20739 (2002).
38. 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* **34**, 4033–4048 (2014).
39. Schewe, D. M. & Aguirre-Ghiso, J. A. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10519–10524 (2008).
40. 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.* **273**, 20636–20643 (1998).
41. Hong, M. *et al.* Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* **279**, 11354–11363 (2004).
42. Hadley, J., Malik, N. & Meek, K. Collagen as a model system to investigate the use of aspirin as an inhibitor of protein glycation and crosslinking. *Micron.* **32**, 307–315 (2001).
43. Malik, N. S. & Meek, K. M. The inhibition of sugar-induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochim Biophys Res Commun.* **199**, 683–686 (1994).
44. Horimoto, S. *et al.* The unfolded protein response transducer ATF6 represents a novel transmembrane-type endoplasmic reticulum-associated degradation substrate requiring both mannose trimming and SEL1L protein. *J Biol Chem.* **288**, 31517–31527 (2013).
45. 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* **27**, 1027–1043 (2007).
46. Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A. & Morgan, G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet.* **373**, 1301–1309 (2009).
47. Chen, X., Shen, J. & Prywes, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* **277**, 13045–13052 (2002).
48. Wang, Y. *et al.* Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* **275**, 27013–27020 (2000).
49. Stirling, J. & O'Hare, P. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell.* **17**, 413–426 (2006).

Acknowledgements

The authors thank the members of the lab for helpful suggestions and discussion. F.L.B.M. is a recipient of predoctoral fellowship of CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A.M.S. is a research fellow of CNPq. This study was supported by CNPq (National Council for Research and Development, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Brazil) and PRPq/UFGM (Pró-reitoria de Pesquisa/ Universidade Federal de Minas Gerais).

Author Contributions

F.L.B.M. designed and performed all experiments and analysed the results. A.M.S. conceived the study, helped to design the experiments and analyze the results. Both authors wrote and reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-09500-x

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

2. Mügge, FLB. and Silva, AM. (2015). "Endoplasmic reticulum stress response in the roadway for the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases **2**: 1-17.

Review article

Open Access

Fernanda L.B. Mügge, Aristóboło M. Silva*

Endoplasmic reticulum stress response in the roadway for the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs

Abstract: Over the past decade, a handful of evidence has been provided that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) display effects on the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER). Their uptake into cells will eventually lead to activation or inhibition of key molecules that mediate ER stress responses, raising not only a growing interest for a pharmacological target in ER stress responses but also important questions how the ER-stress mediated effects induced by NSAIDs could be therapeutically advantageous or not. We review here the toxicity effects and therapeutic applications of NSAIDs involving the three major ER stress arms namely PERK, IRE1, and ATF6. First, we provide brief introduction on the well-established and characterized downstream events mediated by these ER stress players, followed by presentation of the NSAIDs compounds and mode of action, and finally their effects on ER stress response. NSAIDs present promising drug agents targeting the components of ER stress in different aspects of cancer and other diseases, but a better comprehension of the mechanisms underlying their benefits and harms will certainly pave the road for several diseases' therapy.

Keywords: NSAIDs, PERK, IRE1, ATF6, CHOP, GRP78, XBP1, cancer cells

DOI 10.1515/ersc-2015-0001

Received August 30, 2014; Revised December 10, 2014; Accepted December 15, 2014

***Corresponding authors: Aristóboło M. Silva:** Laboratory of Inflammatory Genes, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais – Av. Antonio Carlos, 6627 – UFMG, ICB, Rm J3-243. CEP: 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone no. +55 31 3409 2802, Fax no. +55 31 3409 2771. E-mail: aristobolo@icb.ufmg.br

Fernanda L.B. Mügge: Laboratory of Inflammatory Genes, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

1 Introduction

1.1 Players in the ER stress response

Secretory and membrane protein synthesis and ultimate folding to their secondary and tertiary structures are the major functions of the endoplasmic reticulum (ER) in eukaryotic cells. These are critical and essential functions for cell survival and their proper execution is important for the maintenance of homeostasis. Normally, chaperones located in the ER and components from the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) are able to deal with unfolded or misfolded proteins, by assisting in the correct folding or by leading to protein degradation, respectively. However, certain stressful stimuli or environmental conditions, like viral infections, lowering in glucose levels, hypoxia, or loss of calcium regulation can result in an increase in unfolded proteins in the ER, the event known as ER stress.

In such perturbation of the ER homeostasis, the Unfolded Protein Response (UPR) is activated as a brisk attempt to restore the ER to its normal function. In this sense, three distinct proteins located in the ER membrane act as the key molecules of UPR signaling, from which downstream molecular events will take place. Activating transcription factor 6 (ATF6), inositol requiring enzyme 1 (IRE1), and protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) remain quite inactive under physiological ER functionality, a state that is conferred by the luminal domain binding of these molecules to a master chaperone, GRP78/BiP, abundantly expressed in cells. BiP transiently interacts with so many molecules, especially to newly synthesized proteins as they are translocated into the ER. Certainly, such a formidable, though seemingly promiscuous affinity by other proteins, is fundamental to maintain the ER client proteins in a state competent for subsequent folding and oligomerization. Under stress conditions that result in the accumulation of unfolded polypeptides in the ER, BiP dissociates from PERK, IRE1,

and ATF6 [1,2]. Oligomerization takes place in the case of PERK and IRE1, whereas ATF6 – that is found in monomer, dimer or in an oligomerized state even in unstressed ER [3] – is proteolytically cleaved by the sequential action of proteases.

Although dissociation of BiP from the luminal domains of ER stress sensors seems to be a common stereotype to sense perturbation in the ER, recent studies have provided evidence for a complementary process. This alternate molecular mechanism for sensing ER stress indicates that unfolded proteins may bind directly to luminal domain of Ire1 and favor its dimerization and downstream ER stress signaling [4].

In addition, recent evidence has shown that perturbation of cellular lipid composition is also a trigger for UPR, as PERK and IRE1 have the ability to sense perturbation of membrane aberrancy [5]. The activation mechanism of these ER sensors is independent of their luminal domains, but it is promoted by enhanced dimerization via their transmembrane domain. Such studies uncovered an important mechanistic luminal-independent component that resolved questions regarding the enhanced UPR signaling observed in cholesterol-loaded macrophages and insulin-producing beta cells [6,7].

IRE1 is present in all eukaryotes, being the most evolutionary ancient and conserved of the three arms. Mechanistically, after oligomerization and autophosphorylation IRE1 is activated, which is characteristically evidenced by its kinase and endonuclease (RNase) activities. The endonuclease activity promotes the post-transcriptional processing of the mRNA of X-box binding protein 1 (XBP1), where a cleavage of a residual intron of 26 nucleotides takes place, which will be further degraded. The remaining 5'-PO₄ and 3'-OH free extremities of the mRNA are reconnected and generate a frameshift of the coding sequence in the mRNA by continuing the protein-coding region into the former 3' untranslated region. Upon translation, a new active and more stable transcription factor, spliced XBP1 (sXBP1), is generated [8]. Once bound to elements in the promoter region of genes that are responsive to ER stress, the transcription is then turned on.

The second arm is mediated by ATF6, a 670 amino acids that gives rise to a 90 kDa protein. Two isoforms, ATF6alpha and ATF6beta are constitutively expressed in various mammalian cell types. After dissociating from BiP, ATF6 is translocated to the Golgi apparatus and is then cleaved by two proteases (S1P and S2P), generating an amino terminal fragment (p50ATF6) that functions as a transcription factor [9-11]. p50ATF6 is translocated into

the cell nucleus and activates the transcription of target genes through binding to specific sites, such as ER stress responsive *cis*-acting elements ERSE (CCAAT-N9-CCACG), ERSE II (ATTGG-N-CCACG), and UPRE [GATGACGTG(T/G)NNN(A/T)T] [12-15]. Studies with murine embryonic fibroblasts (MEFs) deficient for ATF6alpha or ATF6beta revealed that only ATF6alpha is necessary to the transcriptional activation of ER chaperones and ERAD components [16].

The transmembrane serine/threonine kinase PERK is present in most mammalian cells and has a predominant expression in pancreatic cells [17]. After activation dependent upon oligomerization, PERK phosphorylates the alpha subunit of mRNA translation initiation factor 2 (eIF2alpha) that leads to the inhibition of mRNA translation in cells. The phosphorylation of eIF2alpha coincides with a clear decline in total cellular protein synthesis [18]. The molecular mechanism as how phosphorylated eIF2alpha provokes protein synthesis inhibition is well established as the reduction in the level of eIF2.GTP.tRNA_{Met} ternary complexes in cells limits its availability for the initiation of mRNA translation. In stress conditions such as ER stress, this will adaptively favor cell survival by giving the cell the opportunity to deal with the accumulated misfolded proteins without increasing the loading in the ER. The translation initiation rates for many mRNAs are quite reduced by those events, but exquisitely it can also enhance translation of other mRNAs. This is the case of activating transcription factor (ATF4) in the PERK-mediated pathway where ATF4 mRNA is selectively translated to the extent that eIF2alpha undergoes phosphorylation over cell stress [18]. Thus, PERK-eIF2alpha-ATF4 module contributes to the UPR transcriptional activation, where multiple target genes are transcriptionally activated in a PERK-dependent manner [19-21].

As noted, each of the three aforementioned transcription factors, products of each ER stress branch, is transported to the nucleus and promotes the UPR transcriptional activation. Their targets can be many genes encoding chaperones or ERAD components, intended to alleviate the ER stress. On the other hand, ATF4 and ATF6 might also promote transcription of pro-apoptotic factors like C/EBP homologous protein, CHOP (GADD 153), which is directly related to induced cell death.

The switch of the UPR from a pro-survival strategy to a pro-apoptotic response will depend on the ability of the cell to resolve the ER stress. When the increase in chaperones and ERAD components synthesis is capable of reducing the load of unfolded proteins in the ER lumen, the cell survives. When all strategies fail to do so, the synthesis of pro-apoptotic factors is stimulated and apoptosis is eventually initiated.

Apoptosis induced by prolonged ER stress also depends on the mitochondrial pathway, which is regulated by members of the Bcl-2 family. The activation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak is a key event to caspases activation. CHOP is important in the induction of apoptosis because of the negative regulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [22]. Additional mechanisms, such as calcium release from the ER and other caspase activation pathways have been implicated in the apoptosis after unresolved ER stress.

2 Non-steroidal anti-inflammatory drugs and modulation of ER stress

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely prescribed or bought as over-the-counter (OTC) medicines and commonly used to treat fever, pain, and inflammation. Their classical mechanism of action is the reversible inhibition of cyclo-oxygenase (COX) enzymes, blocking prostaglandins (PG) production from arachidonic acid (a membrane phospholipid). Arachidonic acid is converted to PGG₂ by COX, which also catalyzes the generation of PGH₂ from PGG₂. PGH₂ can be converted later to other PGs or thromboxane A₂ (TXA₂) by specific enzymes. As an exception, acetyl salicylic acid is the only NSAID that causes an irreversible inactivation of COX after its acetylation [23].

Two different isoforms of COX can be modulated by NSAIDs. Inhibition of COX-2 is related to the analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory actions, since it is induced by the inflammatory process. Because of its constitutive expression, inhibition of COX-1 causes, but not exclusively, the most common NSAIDs adverse effects, mainly related to the gastrointestinal tract. The majority of the available drugs are non-selective COX inhibitors, thereby acting on both enzymes [24].

The different classes of NSAIDs (shown in Table 1) are not chemically related and even inside the same group some molecular modifications generate drugs with different pharmacological profiles. Also, they may differ on toxicity profiles and COX-1/COX-2 selectivity.

The pharmaceutical industry focused for some time on the development of specific COX-2 inhibitors (Coxibs) as a strategy to reduce or avoid the occurrence of adverse effects. Coxibs are a class of selective COX-2 inhibitors displaying lower gastrointestinal toxicity with comparable anti-inflammatory action to other classes. A few years after their release, some coxibs were withdrawn from the market (Rofecoxib and Valdecoxib) because of the induction of higher cardiovascular risks and low safety

during prolonged use. Others drugs of this class, however, are still commercialized in many countries, including the US (celecoxib), but are not prescribed as first choice drugs [25].

Acetaminophen, also known as paracetamol, lacks anti-inflammatory actions, and sometimes is not considered to be a NSAID [23]. Its exact mechanism of action is not yet elucidated, but many hypotheses have been made regarding its central or peripheral actions. It has been shown to inhibit a third COX isoform, COX-3 in canine cerebral cortex [26], but a functional COX-3 has not been found in rodents or humans [27]. Based on its similar pharmacological profile to selective COX-2 inhibitors, like lower gastrointestinal toxicity and no platelet inhibition, more recent studies have demonstrated selective actions on COX-2 in clinically relevant models. In one of these studies, the investigators showed an up-regulation of the COX-2 gene and suppression of PGE₂ in inflammatory transudate collected from sites of acute inflammation after 1 g acetaminophen intake by patients [28]. In another study, COX-2 was inhibited by 80% in peripheral blood

Table 1: Classes of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

Class	Members
Salicylates	Acetyl salicylic acid Sodium salicylate Diflunisal Mesalazine/Mesalamine
Acetic acid derivatives	Indometacin Sulindac Diclofenac Etodolac
Propionic acid derivatives	Ibuprofen Flurbiprofen Ketoprofen
Anthranilic acid (Fenamate)	Mefenamic acid Niflumic acid
Enolic acids (Oxicams)	Piroxicam Meloxicam
Sulfonanilide	Nimesulide
p-Aminofenol derivatives	Paracetamol/Acetaminophen
Diarylheterocycles (Coxibs)	Celecoxib Parecoxib Rofecoxib Valdecoxib

Adapted from [23]

monocytes after 1 g acetaminophen administration to volunteers [29].

In spite of several proposed mechanisms of action, there is accumulated evidence that acetaminophen exerts remarkable effects on ER stress response, and is clearly associated with tissue injury, especially in the liver and kidney, provoked by this compound. Such ER stress-mediated harm effects of acetaminophen will be properly discussed in the section of NSAIDs toxicity.

Since the clinical studies reported by Edmund Stone in 1763 on the effects of willow-bark powder used to treat patients suffering from ague [30] and subsequent numerous studies for purification and synthesis, salicylates have long been used in an impressive effective manner for several disease conditions and disorders. Besides their common use as anti-inflammatory, anti-pyretic and analgesic, they have also been used for the prevention of cardiovascular diseases and cancer [31,32]. The prototype salicylate is acetylsalicylic acid, the popular aspirin. The effects of salicylates on ER stress components have revealed that these compounds affect the activity and expression of several molecules related to ER stress [33,34], and triggering fundamental cellular processes, including transcriptional activation of ER stress responsive genes [35].

Various other studies that have exploited the effects of NSAIDs on ER stress are largely descriptive, but the demonstration of several common targets that have their activity affected by different classes of NSAIDs can pave the road for further mechanistic studies on how ER stress response is affected (Table 2). These compounds and their effects on ER stress will now be discussed.

2.1 NSAIDs toxicity

2.1.1 Gastrointestinal toxicity

2.1.1.1 COX inhibition

As mentioned previously, NSAIDs use is commonly associated with gastric toxicity, partially because of their acidic characteristics and the inhibition of COX-1. This enzyme is responsible for the production of cytoprotective PGs by the cells, which contribute to the maintenance of mucosal integrity through bicarbonate and mucus production stimulation. The decrease of these protective substances leads to higher cell permeability and promotes direct contact of the cells with the acidic gastric secretion, causing injuries [23].

Patients with increased sensitivity to NSAIDs or those who make a long-term use of high doses of NSAIDs usually show more severe lesions that can result in

ulcers, bleeding and sometimes perforations, often aggravated by platelet inhibition due to reduced TXA₂ production from PGH₂ as a result of COX-1 inhibition (reviewed in [36]).

The mechanisms of NSAID-induced enteropathy have some similarities to those related to gastric injuries, and a “multiple hits” effect is currently accepted. The combination of reduced PGE₂ levels by COX inhibition and topical effects resulting in mitochondrial dysfunction and stress responses would be the “first hit”, while the subsequent inflammatory response would be responsible for the second stage of NSAID-induced small intestine injuries (reviewed in [37]).

As reported by several studies, COX-1 inhibition does not entirely explain the occurrence of NSAID induced gastrointestinal lesions. It has been shown that a selective COX-1 inhibitor did not cause any gastric injury even in high dosage, which only happened when this drug was associated with celecoxib, a COX-2 selective inhibitor [38]. Additionally, COX-1 knockout (KO) mice have no gastric pathology and are also more resistant to indomethacin induced gastric lesions than wild type (WT) mice [39].

2.1.1.2 Cytotoxic mechanisms

In two studies, Tomisato *et al.* [40,41] have provided evidence of the induction of necrosis and apoptosis by NSAIDs in the gastric mucosa. They showed in the first study that exposure of primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells to indomethacin can cause either necrosis, when the cells were treated with a high dose (2.5 mM) for a short period of time (1 hour), or apoptosis, when cells were treated with lower doses (between 0.5 and 1 mM) for a longer period of time (16 hours). Necrosis was evidenced by propidium iodide (PI) staining of cell nucleus, while apoptosis was characterized by DNA/nucleus fragmentation and also by examining the activation of caspases 3, 8 and 9. Treatment of cells with caspase inhibitor z-VAD-fmk did not alter cell viability in conditions that led to necrosis, but inhibited DNA fragmentation in lower doses and higher time of exposure to indomethacin. Interestingly, pre-treatment of cells with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, led to increased cell viability in the conditions shown to induce apoptosis. In the second study, the authors suggest that induction of necrosis or apoptosis is a COX independent mechanism, being the result of the direct cytotoxicity of NSAIDs on gastric cells, and that gastric lesions may be the result of both COX inhibiting activities and cytotoxicity of NSAIDs.

Table 2: Summary of NSAIDs actions on ER stress components

NSAID	Cell/Tissue/Organ	Effect on ER stress	References
Indomethacin	Primary gastric mucosal cells	↑CHOP ↑GRP78 ATF6 activation ↑ATF4 mRNA ↑XBP1 mRNA expression and splicing ERSE activation	[42]
	Hepatoma cell line	↑GRP78 mRNA (slight) ATF6 activation XBP1 splicing (partially) eIF2α phosphorylation ↑CHOP	[54]
	Renal carcinoma cells	↑CHOP ↑GRP78 ↑GRP94 ATF6 activation	[74]
Diclofenac	Primary gastric mucosal cells	↑CHOP ↑GRP78	[42,43]
	Rat hepatocytes	↑CHOP	[53]
	Hepatoma cell line	↑GRP78 mRNA (slight) ↓p90 ATF6 ATF6 activation eIF2α phosphorylation ↑CHOP	[54]
Acetaminophen	Liver from CD-1 mice after intraperitoneal injection	↑CHOP ATF6 activation	[56]
	Liver from C57BL/6j mice after oral administration	↑ATF4 ↑ATF3 ↑CHOP ↑XBP1 XBP1 splicing ATF6 activation IRE1α phosphorylation eIF2α phosphorylation	[58]
	Tubular epithelial cells	↑CHOP expression and translocation to the nucleus	[59]
	Organ of Corti cell line	↑eIF2α phosphorylation ↑CHOP expression and nuclear translocation	[60]
Ibuprofen	Primary gastric mucosal cells	↑CHOP	[42]
	Neuroblastoma cell line	↑ATF4 ↑ATF6 ↑XBP1	[73]
Pranoprofen	Primary glial cells	↓GRP78 ↓CHOP eIF2α phosphorylation ↓XBP1 splicing	[90]
Flurbiprofen	Neuroblastoma cell line	↓XBP1 splicing ↓CHOP expression ↓HERP expression	[86]

continued **Table 2:** Summary of NSAIDs actions on ER stress components

NSAID	Cell/Tissue/Organ	Effect on ER stress	References
Celecoxib	Primary gastric mucosal cells	↑CHOP	[42]
	Glioblastoma cell lines	↑CHOP	[47,64,68]
		↑GRP78 eIF2α phosphorylation	
	Raji Burkitt's lymphoma cells	↑CHOP	[65,68]
	Breast carcinoma cells	↑CHOP	[68]
	Pancreatic carcinoma cells	↑CHOP	[68]
	Multiple myeloma cells	↑CHOP	[68]
	Gastric carcinoma cells	↑GRP78	[48,50,72]
		eIF2α phosphorylation PERK phosphorylation ↑ATF4 ↑ATF6 mRNA ATF6 activation ↑ORP150	
		Colorectal cancer cells	
Urothelial carcinoma cells	↑GRP78	[70]	
	Hypopharyngeal squamous cancer cell line	↑CHOP	[67]
		↑GRP78 ↑XBP1	
Celecoxib + bortezomib	Glioblastoma cell line	↑CHOP ↑GRP78	[78]
Celecoxib + MG132	Urothelial carcinoma cells	↑CHOP ↑GRP78	[70]
	Liver tumor cells	↑CHOP ↑ATF4 ↑XBP1 splicing	[79]
Celecoxib + PDE5 inhibitor	Multiple tumor cells	eIF2α phosphorylation	[81]
2,5-dimethyl-celecoxib (DMC)	Glioblastoma cell lines	↑CHOP	[47,64,68]
		eIF2α phosphorylation	
	Raji Burkitt's lymphoma cells	↑CHOP	[65,68]
	Breast carcinoma cells	↑CHOP	[68]
	Pancreatic carcinoma cells	↑CHOP	[68]
Multiple myeloma cells	↑CHOP	[68]	
DMC + nelfinavir	Breast cancer cells	↑CHOP ↑GRP78	[80]
DMC + nelfinavir + chloroquine or mefloquine		↑↑CHOP ↑↑GRP78	[84]
Parecoxib	Rat brains after ischemic injury	↑GRP78 ↑ORP150 ↓CHOP expression and nuclear translocation	[92]
Sulindac sulfide	Intestinal cancer cells	↑GRP78	[76]
		↑CHOP ↑GADD34 ↑ATF4 ↑ATF3	
Glioma cells		↑GRP78	

continued **Table 2:** Summary of NSAIDs actions on ER stress components

NSAID	Cell/Tissue/Organ	Effect on ER stress	References
Meloxicam	Rat brains after ischemic injury	↓CHOP mRNA ↓GRP78 mRNA and protein ↓GRP94 mRNA	[91]
	Cerebral cortex	↑GRP78	[91]
Oxicams (meloxicam, sudoxicam, piroxicam)	Rat hepatocytes	↑CHOP	[53]
Nimesulide	Rat hepatocytes	↑CHOP	[53]
Fenamic acids (flufenamic, tolfenamic and mefenamic acids)	Rat hepatocytes	↑CHOP	[53]
Diflunisal	Rat hepatocytes	↑CHOP	[53]
Tolfenamic acid	Colorectal cancer cells	↑ATF6 activity ↑CHOP ↑ATF4 ↑XBP1 splicing	[71]
Aspirin	Immortalized mouse embryonic fibroblast	eIF2α phosphorylation PERK phosphorylation no XBP1 splicing	[34]
Sodium salicylate	Immortalized mouse embryonic fibroblast	eIF2α phosphorylation ↑CHOP caspase-12 degradation no XBP1 splicing ↑34 ER-stress related genes ↑ATF6 ERSE activation	[34] [35]
	Human adipocytes	↓ATF6 ↓CHOP ↓GRP78	[33]

↑: increased expression; ↓: decreased expression; ↑↑: higher increased expression. ATF, activating transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2, eukaryotic translation initiation factor; ERSE, ER stress response element; GRP, glucose regulated protein; IRE1, Inositol-requiring endonuclease; ORP150, 150-KDa oxygen regulated protein; PERK, protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; XBP1, X-box binding protein.

2.1.1.3 ER stress in NSAIDs-induced effects of cytotoxicity

Further investigations revealed that NSAIDs exposure of cells could disturb the homeostasis of the ER by modulating the ER stress response, and that could be an upstream mechanism responsible for apoptosis and gastrointestinal injuries elicited by these drugs. One of the first studies in this front was carried out by Tsutsumi and colleagues [42]. In primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells, indomethacin (1 mM) was shown to induce CHOP mRNA and protein levels in greater extent than thapsigargin, a well-known ER stress inducer agent that disrupts calcium regulation in the ER. Diclofenac

(1 mM), ibuprofen (2 mM), and celecoxib (80 μM) also displayed effects on those cells such as reduced cell viability, increased DNA fragmentation, and an increase in CHOP protein levels in a COX independent manner. Other stress agents that cause apoptosis, such as ethanol, hydrogen peroxide, and hydrochloric acid lack the ability to induce an increase in CHOP mRNA levels, showing that this event is specific for NSAID-induced apoptosis. In the same study, levels of GRP78 were slightly increased after indomethacin treatment [42].

In a toxicoproteomic approach, an increase in GRP78 levels induced by a NSAID was also reported by Ohyama *et al.* [43] in a study carried out in mice treated with

diclofenac indicating that the ER stress response takes place. Such finding corroborates the notion that NSAID-induced gastrointestinal toxicity is mediated by ER stress components. Back to study of Tsutsumi and colleagues, ATF6 was activated by indomethacin, since p90ATF6 levels decreased in whole cell extracts and p50ATF6 levels increased in nuclear extracts. Both ATF4 and XBP1 mRNA expression, including the spliced sXBP1 and JNK1/2 phosphorylation were induced by indomethacin. Accordingly, transfection of cells with ERSE or CHOP binding-site luciferase reporter plasmids showed transcriptional activation and luciferase activity after indomethacin or thapsigargin treatment, at comparable extensions. These results indicate that ATF6, ATF4 and XBP1 might be responsible for the expression of CHOP induced by indomethacin, and also that downstream events to ASK1, which results in JNK phosphorylation, seem to be activated by indomethacin. Additionally, experiments with a dominant-negative form of CHOP or in macrophages derived from CHOP-deficient mice indicated that apoptosis induced by NSAIDs involves other components than CHOP, as suppression of apoptosis was only partially dependent on this transcription factor [42].

In a proposed mechanism for NSAID induced apoptosis, NSAIDs would promote cell membrane permeabilization, due to their ability to interact with membranes and cause alterations in hydrophobicity, fluidity, biochemical properties, and stability (reviewed in [44]). Higher permeability would stimulate calcium influx, leading to increased calcium levels in the cytoplasm, which then could culminate in ER stress. Indomethacin, diclofenac, etodolac, ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, celecoxib, mefenamic acid, and nimesulide were shown to increase membrane permeability and intracellular calcium levels and to decrease cell viability in guinea pig gastric mucosal cells. These events were partially inhibited when a chelating agent was added before to celecoxib treatment [45]. As described, NSAID-induced ER stress promotes significant increase in the CHOP mRNA and protein expression, which is an alternate route to apoptosis. A molecular link between CHOP and mitochondrial dysfunction after NSAID exposure was suggested to be the pro-apoptotic modulator PUMA, as its silencing mediated by siRNA led to reduction in the celecoxib-induced activation and translocation of Bax that is a critical protein that regulates mitochondrial outer membrane permeabilization. Silencing of ATF4 but not ATF6 was shown to decrease PUMA mRNA expression when cells were treated with celecoxib. In similar conditions, CHOP mRNA expression was slightly reduced by ATF6 silencing but more extensively reduced

when ATF4 was silenced [46]. From described above and additional studies, it is clear that celecoxib preferentially targets PERK-eIF2alpha-ATF4 module [47,48].

2.1.1.4 Exacerbation of NSAIDs-induced gastric effects through chaperones suppression

Helicobacter pylori infection, another major cause of gastric ulcers, can also be a predisposition factor for NSAID-induced gastric injuries. These bacteria can produce irritating substances or down regulate the production of protective factors by gastric cells. Namba *et al.* [49] demonstrated that *H. pylori* exacerbates NSAID-induced gastric lesions by suppression of ER chaperones expression. An increase in the expression of GRP78 and ORP150 (150-KDa oxygen regulated protein) was previously shown to reduce CHOP triggered apoptosis in cells after celecoxib treatment [48,50], indicating a protective role for these chaperones against NSAIDs-induced apoptosis. Co-culture of human gastric carcinoma cells with *H. pylori* decreased GRP78 and ORP150 levels in a time-dependent manner, and strongly reduced p50ATF6 and p90ATF6 expression after 24 or 48 hours, respectively. Levels of ATF4 remained unaltered and XBP1 splicing did not take place. Yet, silencing of ATF6 with siRNA resulted in decreased expression of GRP78 and ORP150, but not CHOP. Expression of ATF6 mRNA was not regulated by *H. pylori*, but a pulse-chase experiment indicated that degradation of ATF6 is accelerated in the presence of *H. pylori*, suggesting a post-translational mechanism for the regulation of ATF6, probably by proteasome and/or lysosome degradation. In mice pre-inoculated with *H. pylori*, the indomethacin-induced gastric lesions were aggravated, accompanied by an increase in TUNEL-positive cells compared to indomethacin treatment alone. Furthermore, ORP150-/+ heterozygous mice showed more apparent gastric mucosal cell death, providing genetic evidence for the protective role of ER chaperones in indomethacin-induced gastric lesions [49]. This suggests that molecules capable of inducing ER chaperones may offer therapeutic advantage against NSAIDs-induced gastric lesions.

2.1.2 NSAIDs-induced ER stress to hepatotoxicity

Another concern for individuals who make use of NSAIDs is the hepatotoxicity effects caused by some of these drugs. Although seeming to be a rare complication, some severe reactions were the cause for the withdrawal of some NSAIDs. Aspirin, celecoxib, diclofenac, ibuprofen,

indomethacin, naproxen, nimesulide, piroxicam, and sulindac have been reported to cause hepatotoxicity with different characteristics, varying from elevation of transaminases, cholestasis and hepatitis, to acute liver failure in some cases (reviewed in [51]). Bromfenac, only four months after its availability to patients, was reported to cause acute liver failure requiring transplantation and even leading to death, which resulted in its withdrawal less than one year after its approval. Lumiracoxib, a selective COX-2 inhibitor chemically related to diclofenac, was never approved by the FDA in the US and was withdrawn from the market because of its association with severe drug induced liver injury [52].

In a toxicity assessment of various NSAIDs, rat hepatocytes were used as one of the models to evaluate the hepatotoxicity of different chemical classes: three fenamic acids (flufenamic, tolfenamic, and mefenamic acid), three oxicams (meloxicam, sudoxicam, piroxicam), two salicylates (aspirin and diflunisal), two acetic acid derivatives (diclofenac and sulindac), and the sulfonanilide, nimesulide. Except for acetyl salicylic acid and sulindac, all of the other aforementioned NSAIDs induced CHOP expression in these cells [53].

In a hepatoma cell line, diclofenac and indomethacin were shown to trigger the activation of the different branches of the UPR. Semi quantitative RT-PCR indicated a slight induction of GRP78 mRNA, after 8 hours of treatment, but less pronounced than that observed for thapsigargin. Full-length p90ATF6 and cleaved p50ATF6 were present in cells treated with indomethacin in a similar profile in response to thapsigargin. Regarding diclofenac, however, the expression of p90ATF6 was decreased and even lower than in control untreated cells, while p50ATF6 was present in cell extracts but in a lower intensity than indomethacin or thapsigargin treatments. Only indomethacin was shown to partially promote XBP1 splicing after 45-60 minutes of treatment, as evidenced by the RT-PCR analysis of sXBP1 amplicons in agarose gels. On the other hand, diclofenac, but not indomethacin or thapsigargin, induced JNK phosphorylation after 16 h, indicating different actions of these drugs on IRE1. Phosphorylation of eIF2 α was also evidenced in cells treated with indomethacin or diclofenac, likely indicating PERK activation. Moreover, CHOP expression was induced by both drugs, but with higher intensity for indomethacin than for diclofenac or thapsigargin after 8 hours of treatment. Finally, flow cytometry analysis revealed that diclofenac and indomethacin induce cell death as similar as thapsigargin [54].

Acetaminophen, which is widely used to treat fever and pain, is a major cause of acute liver failure. Its exact

mechanism of hepatotoxicity is not known, but it clearly involves necrosis and evidence suggest that apoptosis is also involved. Caspase-dependent Bid cleavage and caspase-independent Bax translocation to mitochondria and cytochrome c release were reported after 6 h of acetaminophen administration to BALB/c mice, but caspases 3 and 7 were not activated. Caspase inhibitors, however, protected mice from acetaminophen-induced liver injury, suggesting that apoptosis would be the initial cell death response to acetaminophen treatment, but later it would turn to degeneration and necrosis [55].

The ER is the primary site of acetaminophen metabolism that is dependent on its oxidative biotransformation to NAPQI, which leads to glutathione (GSH) depletion, an event supposed to be related to its toxicity. Perturbations of the redox homeostasis can impair the oxidative folding of proteins in the ER, which may result in ER stress. Nagy *et al.* [56] demonstrated CHOP induction and ATF6 activation after intraperitoneal administration of acetaminophen (450 mg/Kg) to male CD-1 mice. On the other hand, Hur *et al.* [57] did not observe PERK or ATF6 activation in the liver of mice that received intraperitoneal administration of acetaminophen (500 mg/Kg). In this same study, genetic ablation of XBP1 was found to protect mice from acetaminophen-induced liver injury through IRE1 α activation via a feedback mechanism not related to UPR activation [57]. Divergent observations by these studies may reflect the use of different mice backgrounds or gene targeting strategies.

Because intraperitoneal injection of acetaminophen does not reproduce the actual route of administration in patients, a third study evaluated the induction of UPR after oral administration (gavage) of acetaminophen 500 mg/Kg to mice. Gene expression analysis revealed induction of ATF4 and its targets, ATF3 and CHOP, and of XBP1 and its targets, ERdj4 and p58^{ipk}, in animals treated with acetaminophen. XBP1 mRNA splicing, p90ATF6 cleavage, IRE1 α , eIF2 α phosphorylation, and CHOP protein expression were only observed at 12 hours after acetaminophen administration. Additionally, CHOP KO mice were shown to be more resistant to necrosis progression after acetaminophen gavage, having ten-fold lower necrosis areas than wild-type mice after 24 hours of drug administration. CHOP-deficient mice had also improved survival, manifested with 100% survival with a dose of 1 g/Kg acetaminophen, which led to death within 24 hours of all wild-type animals administered with the same dose. Levels of GSH and JNK phosphorylation, which occurs downstream of GSH depletion, were similar in both groups, indicating that the protection observed in CHOP deficient mice was not a result from

the reduced acetaminophen metabolism. Furthermore, it was demonstrated that CHOP deficiency was beneficial for recovery from ER stress, since knock-out animals presented lower levels of ER stress markers than controls, and displayed increased capacity of regeneration at the sites of damage [58].

2.1.3 NSAIDs-induced ER stress to nephrotoxicity

Besides hepatotoxicity, acute acetaminophen overdose can cause nephrotoxicity through molecular mechanisms still to be fully elucidated. In culture mouse tubular epithelial cells, acetaminophen was shown to induce apoptosis, which was dose and time dependent. Despite increase on Fas receptor expression on cell surface, this pathway did not seem to be activated, as blocking of the receptor caused no alterations in the rate of apoptosis induction. Also, there was neither cytochrome c nor Smac/DIABLO release from mitochondria nor loss of mitochondria membrane potential. However, acetaminophen induced the activation of caspase 3, 9 and 12, and CHOP expression and its consequent translocation to the nucleus. The authors suggest that the mechanism of acetaminophen-induced nephrotoxicity is caspase dependent. In addition, caspase 12 that is highly expressed in the kidneys and present in the ER membrane could be a link between ER stress and apoptosis caused by acetaminophen in tubular cells [59].

2.1.4 NSAIDs-induced ER stress to ototoxicity

Authors of a recent study refer to the ototoxicity of acetaminophen and its metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) as a relevant side effect of these drugs. They suggest that ototoxicity is masked by the hepatotoxicity because the latter leads to death before any hearing loss can be perceived. Using a cell line derived from the organ of Corti (HEI-OC1), these authors demonstrated that the ototoxic effect involves oxidative and ER stress pathways, through overproduction of ROS, alterations in ER morphology and modulation of the eIF2 α pathway. CHOP expression and nuclear translocation were demonstrated through immunofluorescence microscopy. Acetaminophen treatment of cells led to an increase in eIF2 α phosphorylation while NAPQI led to decreased phosphorylation. Silencing of ATF4 with shRNA, or through pharmacological inhibition of ATF6 activation in the Golgi (using 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride) caused no alterations in cell viability after

acetaminophen or NAPQI treatment. XBP1 splicing was not induced by treatment with these drugs [60].

2.2 Therapeutic applications

2.2.1 Cancer treatment

Epidemiological studies have indicated a role for NSAIDs in the prevention of cancer, while selective COX-2 inhibitors have been shown to inhibit tumor growth and metastasis in different animal models of solid tumors. Indeed, COX-2 is overexpressed in some tumors and the final products of the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, namely PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂ α and TXA₂, promote cell proliferation, metastasis and angiogenesis, and inhibit apoptosis. Therefore, inhibition of COX-2 could have beneficial effects in the prevention and treatment of cancer (reviewed in [61,62]).

It is now known that, in a similar way to adverse effects described for NSAIDs, both COX-dependent and COX-independent pathways play roles in the induction of apoptosis in cancer cells. The underlying mechanisms are not completely understood, but increasing evidence suggest modulation of different intracellular components related to cell cycle, apoptosis, inflammation and also ER stress [61,63].

2,5-dimethyl-celecoxib (DMC), a celecoxib analog that possesses no COX inhibitory activity, has been shown to have more potent tumor suppression properties than celecoxib, while unmethylated celecoxib (UMC), which has slightly higher COX-2 inhibitory activity, possesses lower antitumor effect in glioblastoma cell lines [64] and in Raji Burkitt's lymphoma cells [65]. DMC concentrations starting at 50 μ M decreased cell viability in a proportion that was only observed at 70 μ M celecoxib and that was not achieved by UMC. CHOP expression and caspase activation after celecoxib or DMC correlates with reduced cell survival in both cell types and is not induced by UMC treatment [64,65].

An increase in cellular protein synthesis can be associated with an increase in cell proliferation, thus making translational machinery a potential target for tumor therapy. In this sense, anti-proliferative effects of NSAIDs via ER stress components could have PERK-eIF2 α module as target. Celecoxib was found to transiently inhibit protein synthesis in glioblastoma cells in a dose-dependent manner. In this study carried out by Pyrko *et al.* (2008), celecoxib at roughly 80 μ M concentration inhibited protein synthesis from 2 to 8 hours of treatment, a time when protein synthesis began to recover, being reestablished after 24 hours treatment.

Phosphorylation of eIF2 α was observed in the same doses and treatment periods demonstrated to induce translation inhibition. In mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that express a mutant eIF2 α , which cannot be phosphorylated (serine 51 is exchanged for alanine), protein synthesis inhibition by celecoxib was reduced in relation to control cells. Interestingly, other NSAIDs (rofecoxib, valdecoxib, indomethacin, and flurbiprofen) in 100 μ M doses were unable to inhibit protein synthesis, cell growth survival, or induce eIF2 α phosphorylation. DMC, on the other hand, induced more pronounced eIF2 α phosphorylation than celecoxib. These latter results indicate that inhibition of mRNA translation by celecoxib is another COX-independent mechanism of this drug and provide a strong evidence of the involvement of PERK in the celecoxib-induced cell effects [47]. Moreover, increased GRP78 expression was evidenced by immunoprecipitation study from extract of cells that were treated with 75 μ M celecoxib for 12 hours, indicating another ER stress related event induced by celecoxib.

Aspirin and sodium salicylate have also been shown to inhibit protein synthesis in a mechanism dependent on PERK activation and eIF2 α phosphorylation, which was demonstrated using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking PERK. In addition, aspirin and sodium salicylate induced significant CHOP protein expression, which was attenuated in PERK $^{-/-}$ cells. These two drugs also induced caspase-12 degradation but had no effect on XBP1 splicing [34]. Hence, it is likely that PERK is a critical ER stress component in cell responses to salicylates.

In PC-3 cells, a prostate cancer cell line, celecoxib induces an increase in calcium intracellular levels in a dose-dependent manner. Although not shown in their paper, the authors mentioned that the same increase in intracellular calcium levels was observed in another prostate cancer cell line (LNCaP), in smooth muscle cells (A7r5), in NIH-3T3 fibroblasts, MCF-7 breast cancer cells, Jurkat T cells, and HepG2 hepatoma cells. According to them, this could be a possible link between celecoxib anti-cancer activities and increased cardiovascular risks [66]. A recent report has also supported the notion of ER stress-mediated antiproliferative effects of celecoxib. In that work, the authors demonstrate that by knocking-down CHOP hinders the inhibition of cell proliferation by celecoxib in a well established human hypopharyngeal squamous cancer cell line [67].

In different cancer cell types, such as glioblastoma, breast carcinoma, pancreatic carcinoma, Burkitt's lymphoma, and multiple myeloma, celecoxib and DMC were shown to induce CHOP protein expression, with a clear effect that was dependent on the cell type. In

glioblastoma cells, the induction of CHOP was determined to be specific to these two drugs, since it was not evidenced after valdecoxib or rofecoxib treatments. Also, in glioblastoma cells that had been implanted into nude mice, CHOP expression as well as the number of TUNEL positive cells were increased by celecoxib and DMC, but not by rofecoxib. Since both celecoxib and DMC led to an increase in calcium intracellular levels and inhibition of DMC-induced CHOP expression in the presence of chelating agents, calcium was again suggested to be an important trigger to the induction of ER stress by these two drugs [68]. However, other NSAIDs including valdecoxib, rofecoxib, indomethacin, flurbiprofen, and sulindac did not induce any increase in calcium intracellular levels. Discrepancy effects seen for some NSAIDs [45] may be due to the cell types used [45].

In the previous study by Pyrko *et al.* [68] and in studies by Tsutsumi *et al.* [48], Du *et al.* [69], and Huang *et al.* [70], where glioblastoma, gastric carcinoma, colorectal cancer, and urothelial carcinoma cells were used, respectively, GRP78 was implicated as a protective molecule against celecoxib induced apoptosis. In all three studies celecoxib was shown to increase GRP78 expression, but its knock-down with siRNA led to enhancement of glioblastoma cell killing [68] and increased caspase 3, 7, 8 and 9 cleavage in urothelial carcinoma cells [70] after celecoxib treatment. In the colorectal cancer cells, overexpression of GRP78 significantly reduced the rate of apoptosis induced by celecoxib [69]. Interestingly, tolfenamic acid also exerts remarkable effects in colorectal cancer cell growth both *in vitro* and *in vivo* by repressing cyclin D1 expression in a PERK-eIF2 α -ATF4-dependent manner. In these cells, tolfenamic acid was also shown to induce higher ATF6 activity, XBP1 splicing and higher expression of CHOP and ATF4 [71]. At least in the gastric carcinoma cells, celecoxib induces eIF2 α and PERK phosphorylation, which results in ATF4 expression. Because ATF4 silencing using siRNA partially reversed the overexpression of GRP78 induced by celecoxib, this seems to be one of the UPR arms responsible for GRP78 up regulation after celecoxib treatment [48].

Together with ATF4, ATF6 was also linked to the celecoxib-induced up regulation of another ER chaperone, ORP150, in gastric carcinoma cells. Silencing of both transcription factors using siRNA inhibited ORP150 overexpression by celecoxib [72]. ATF6 expression and activation was shown to be induced with 80 μ M or 100 μ M celecoxib in these cells, as demonstrated by the increase in ATF6 mRNA relative expression [50,72] and by p90ATF6 decrease, but accompanied by accumulation of p50ATF6 in nuclear extracts [48,72]. The increase in intracellular

levels of calcium induced upon celecoxib treatment is most likely a trigger to ATF4 and ATF6 expression and GRP78 and ORP150 upregulation, since the addition of a chelating agent at least partially inhibited these celecoxib-induced events [48,72].

Besides celecoxib, other NSAIDs are able to modulate ER stress elements in cancer cells. S(+)-ibuprofen, the active stereoisomer of ibuprofen, was shown to up regulate various UPR related genes (like ATF4, ATF6 and XBP1) in a neuroblastoma cell line [73]. In 786-O renal carcinoma cells, indomethacin (200 μM) induced GRP78, GRP94, and CHOP protein expression and also ATF6 activation [74]. Niflumic acid (100 μM) was shown to induce eIF2 α and PERK phosphorylation and CHOP expression in non-small cell lung cancer cell lines A549 and H460, effects that were intensified when this NSAID was combined with ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand that has anti-tumor activity [75]. Intestinal cancer cells HCT-116 treated with 25 μM sulindac sulfide, the active metabolite of sulindac, presented increases in GRP78, CHOP, GADD34, ATF4 and ATF3 mRNA expression [76]. In C6 and glioma cells, 100 μM sulindac sulfide induced an increase in intracellular calcium concentration related to the release of calcium from intracellular stores, in a similar way to that observed for 100 μM celecoxib. Induction of GRP78 protein expression was observed in other glioma cell line, U87-MG, treated with sulindac sulfide or celecoxib, but CHOP protein expression was not induced by sulindac sulfide in these cells. The authors indicated with other experiments that the difference in CHOP expression can be related to the effect of each drug on different intracellular calcium stores: sulindac sulfide would only act on the ER, while celecoxib would induce calcium release from the ER and from mitochondria. Mitochondrial perturbation together with ER stress would then be necessary to induce CHOP expression in these cells [77].

2.2.1.1 Combined effects of NSAIDs and other compounds

Combination of celecoxib with other anti-cancer drugs might lead to ER stress aggravation, which can result in enhanced cell death because of the inability of cells to deal with the misfolded or unfolded proteins. Simultaneous treatment of glioblastoma cells with the proteasome inhibitor bortezomib and celecoxib, or bortezomib and DMC, resulted in increased cell death, in higher protein levels of CHOP and GRP78 than with each drug alone, and in the activation of JNK1/2 and caspases 3, 4, 7 and 9. Additionally, *in vivo* experiments with tumor-bearing mice

showed that the combination of bortezomib and DMC resulted not only in higher CHOP expression, evidenced by immunohistochemistry studies, but also in increased apoptosis, demonstrated by a higher number of TUNEL positive cells [78].

MG132, another proteasome inhibitor, in combination with celecoxib led to decreased viability of urothelial carcinoma cells NTUB1 and T24 [70] and human liver tumor cells HepG2 and HA22T/VGH [79]. Moreover, in the urothelial carcinoma cells the combination of drugs induced higher caspases 3, 7, 8 and 9 activation, PARP cleavage, and increased expression of CHOP and GRP78 [70]. In the liver tumor cells, PARP cleavage was also present and higher expression of CHOP (in both cell lines) and ATF4 (only in HepG2 cells) mRNA and XBP1 mRNA processing were also induced by simultaneous treatment with MG132 and celecoxib [79].

In human breast carcinoma cell lines, in a combined therapy of a NSAID with nelfinavir (15-30 μM), an HIV protease inhibitor that acts as an ER stress aggravator through proteasome proteases inhibition, it was shown a reduction in cell survival and an increase in apoptosis. Interestingly, this was achieved by the combination with either celecoxib (40-50 μM) or DMC (30-40 μM), even in cells that are resistant to doxorubicin or taxol, or to other anti-cancer drugs that display different mechanisms of action. Combined treatment with DMC and nelfinavir also induced higher GRP78 and CHOP expression, caspase 7 activation and PARP cleavage and reduced colony formation. Silencing either of GRP78 or CHOP resulted in significantly altered chemosensitivity of tumor cells to the combined use of the compounds, as the blockage of GRP78 was associated with increased chemosensitization to the extent to that CHOP knock-down resulted in increased survival, thus establishing ER stress as a determinant event in this process [80].

Various critical intracellular signaling pathways were investigated in a study where a combination of celecoxib with phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors was tested for the ability to kill multiple tumor cells [81]. The drug combination elicited ER stress response where eIF2 α , ATF4 and CHOP seemed to be critical components to mediate tumor killing. However, IRE1 and XBP1 seemed to play a resistance role in the killing effects induced by the combination, as their knock down led to enhanced tumor killing. This data demonstrates that combination of celecoxib and specific PDE5 inhibitors such as sildenafil, at clinical relevant concentrations, have the potential to be a new therapeutic approach for cancer.

Autophagy is a cellular response that can be activated to generate ATP during starvation but that also functions

as a quality control mechanism for proteins and organelles in order to keep cell homeostasis. Autophagy has been implicated as a survival mechanism for cancer cells and new autophagy inhibitors are currently being studied [82,83]. Because of the protein quality control property, inhibition of autophagy can result in ER stress aggravation in a similar way to proteasome inhibitors. Indeed, in triple negative breast cancer cells the combination of chloroquine (20 μM) or mefloquine (10 μM) with DMC (20 μM) and nelfinavir (25 μM) induced higher GRP78 and CHOP expression, apoptosis, and lower colony formation than as reported for DMC and nelfinavir combination discussed above [84].

2.2.2 Metabolic diseases

An important study by Ozcan *et al.* suggested a link between obesity and ER stress, which could then lead to insulin resistance. This is especially important because in adipose tissue, and also in the liver from mice fed a high-fat diet, PERK and IRE1 are significantly phosphorylated [85]. Therefore, investigating the effects of NSAIDs as compounds with the ability to reduce ER stress in metabolic diseases can provide potential alternative therapy.

Flurbiprofen, but not aspirin, meloxicam, or ibuprofen, was shown to have strong chaperone activity, which resulted in lowering of protein aggregation *in vitro*. Further investigations demonstrated that flurbiprofen possesses the ability to attenuate the activation of all three ER stress branches, through lowering of XBP1 processing and CHOP and HERP expression induced by tunicamycin in a neuroblastoma cell line. Also, in a model of obese mice, the authors demonstrated that flurbiprofen attenuated leptin resistance and reduced body weight gain and visceral fat, effects that were not observed in aspirin, meloxicam or ibuprofen treated mice [86].

In an *in vitro* study, sodium salicylate, the metabolite of aspirin, has been shown to alleviate the ER stress by decreasing the expression of ER stress markers such as ATF6, CHOP, and GRP78 in cultured primary human adipocytes treated with lipopolysaccharide (LPS), high glucose concentration, saturated fatty acids, or the ER stress inducer tunicamycin [33]. Taken together, these studies indicate that some NSAIDs can display beneficial effects in metabolic diseases by relieving ER stress response.

2.2.3 Neuroprotection

Neurodegenerative protein misfolding disorders (PMDs), such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and prion related diseases involve the accumulation of misfolded proteins, but each of them has different clinical manifestations. In animal models of PMDs and in brain tissue from patients with PMD the accumulation of abnormal proteins has been linked to alterations in ER stress markers (reviewed in [87]). Increasing evidence suggests that the UPR could play a role in normal neuronal function as well as in the development of neurodegenerative diseases. Therefore, depending on the context specific for each disease, the same ER stress component could even have opposite roles (recently reviewed in [88]).

Yamazaki *et al.* [89] demonstrated that various NSAIDs (diclofenac, indomethacin, ibuprofen, aspirin, and ketoprofen) inhibit ER stress-induced cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were pre-treated with each drug for 2 hours and then thapsigargin or tunicamycin was added to the culture medium for 24 hours. Except for aspirin, that only inhibited tunicamycin-induced cell death, all other drugs inhibited cell death in different proportions, and diclofenac was the one with higher inhibition for both stressors.

In primary culture of glial cells, pranoprofen reduced GRP78 and CHOP mRNA and more slightly protein expression, when cells were pre-treated for 1 hour with this drug and later challenged with tunicamycin. Pranoprofen pre-treatment also induced eIF2 α phosphorylation and inhibited XBP1 splicing, but did not affect IRE1 phosphorylation induced by tunicamycin [90].

In the context of cerebral ischemia, subcutaneous meloxicam (0,5 mg/Kg) reduced mRNA levels of CHOP, GRP78 and GRP94, which were highly increased after the induction of ischemic injury (carotid occlusion) followed by 48 hours reperfusion in various rat brain areas. Meloxicam also induced higher GRP78 protein expression in the cerebral cortex of control animals, but reduced GRP78 protein expression in two hippocampal regions of injured animals. In the other areas no differences in expression were observed [91]. Intraperitoneal parecoxib (10 mg/Kg or 30 mg/Kg) induced GRP78 and ORP150 protein expression in ischemic areas of rat brains in relation to vehicle treated animals. On the other hand, CHOP protein expression and nuclear translocation were suppressed by parecoxib [92].

3 Concluding remarks

From the evidence provided in the published articles, NSAIDs perturb ER homeostasis by eliciting hallmark events including mostly the expression of GRP78 and CHOP, and the activation of PERK and ATF6. Although XBP1 was demonstrated in many articles to have the expression induced by NSAIDs, only a few demonstrated NSAIDs to cause the activation of IRE-1. These observations implicate that two ER stress branches largely mediate the ER stress-mediated effects of NSAIDs in cells.

It is noteworthy that a handful of evidence is provided regarding either the activation or inhibition of ER stress components upon *in vitro* exposure of cells or *in vivo* administration of NSAIDs. Certainly, the effects of NSAIDs on the activity, expression or repression of ER stress components may present broad effects beyond cytotoxic and therapeutic ones, as we have addressed in this review. Therefore, the interpretation of these data must take into account that various cell types and tissues, mice background, drugs' biodistribution, and a range of distinct class of NSAIDs and concentrations have been used. Nonetheless, despite what we currently know about the ER stress components that are affected by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and how these drugs modulate the activity of those components, more detailed mechanistic studies are in need to provide solid knowledge on how such effects are initially triggered upon exposure of cells to these drugs, being one of the major challenges in this field. While is unclear whether NSAIDs cause unfolded protein accumulation in ER, it is known that these compounds can cause membrane aberrancy, therefore opening up important questions whether the mechanisms underlying the effects of NSAIDs on UPR signaling involves lipid perturbation. Finally, prevention and effective therapy for diseases such as cancer where NSAIDs can be a choice will likely require the combined use of anti-proliferative agents, and much likely yet, the modulation of more than one ER stress target molecule.

Acknowledgments: FLBM is recipient of fellowship of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. AMS is research fellow of CNPq and member of the National Institute of Science and Technology in Vaccines (INCTV), Brazil.

Conflict of interest statement: Authors state no conflict of interest

References

- [1] 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*, 2000, 2(6), 326-32.
- [2] 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*, 2002, 3(1), 99-111.
- [3] Nakanaka 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*, 2007, 27(3), 1027-43.
- [4] Gardner B.M., Walter P., Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response, *Science*, 2011, 333(6051), 1891-4.
- [5] 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*, 2013, 110(12), 4628-33.
- [6] Cunha D.A., Hekerman P., Ladriere L., Bazarra-Castro A., Ortis F., Wakeham M.C., et al., Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells, *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 14), 2308-18.
- [7] Feng B., Yao P.M., Li Y., Devlin C.M., Zhang D., Harding H.P., et al., The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages, *Nat Cell Biol*, 2003, 5(9), 781-92.
- [8] Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J.H., Hubbard S.R., Harding H.P., et al., IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature*, 2002, 415(6867), 92-6.
- [9] Chen X., Shen J., Prywes R., The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi, *J Biol Chem*, 2002, 277(15), 13045-52.
- [10] Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K., Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *Mol Biol Cell*, 1999, 10(11), 3787-99.
- [11] Ye J., Rawson R.B., Komuro R., Chen X., Dave U.P., Prywes R., et al., ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Mol Cell*, 2000, 6(6), 1355-64.
- [12] Kokame K., Kato H., Miyata T., Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response, *J Biol Chem*, 2001, 276(12), 9199-205.
- [13] 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*, 1998, 273(50), 33741-9.
- [14] 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*, 2001, 107(7), 881-91.
- [15] Yoshida H., Okada T., Haze K., Yanagi H., Yura T., Negishi M., 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*, 2001, 21(4), 1239-48.
- [16] 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*, 2011, 36(1), 35-47.
- [17] Harding H.P., Zeng H., Zhang Y., Jungries R., Chung P., Plesken H., et al., Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival, *Mol Cell*, 2001, 7(6), 1153-63.
- [18] Harding H.P., Zhang Y., Ron D., Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature*, 1999, 397(6716), 271-4.
- [19] 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*, 2000, 5(5), 897-904.
- [20] Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calton M., et al., An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell*, 2003, 11(3), 619-33.
- [21] Vattem K.M., Wek R.C., Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(31), 11269-74.
- [22] McCullough K.D., Martindale J.L., Klotz L.O., Aw T.Y., Holbrook N.J., Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state, *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4), 1249-59.
- [23] Brunton L.L., Chabner B.A., Knollman B.C., Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 2011, 1808p.
- [24] Bacchi S., Palumbo P., Sponta A., Coppolino M.F., Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review, *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2012, 11(1), 52-64.
- [25] Abdel-Tawab M., Zettl H., Schubert-Zsilavecz M., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a critical review on current concepts applied to reduce gastrointestinal toxicity, *Curr Med Chem*, 2009, 16(16), 2042-63.
- [26] Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21), 13926-31.
- [27] Kis B., Snipes J.A., Busija D.W., Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties, *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(1), 1-7.
- [28] Lee Y.S., Kim H., Brahim J.S., Rowan J., Lee G., Dionne R.A., Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation, *Pain*, 2007, 129(3), 279-86.
- [29] Hinz B., Cheremina O., Brune K., Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man, *Faseb J*, 2008, 22(2), 383-90.
- [30] 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*, 1763, 53.
- [31] Amann R., Peskar B.A., Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate, *Eur J Pharmacol*, 2002, 447(1), 1-9.
- [32] Vainio H., Morgan G., Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug, *Pharmacol Toxicol*, 1997, 81(4), 151-2.
- [33] Alhusaini S., McGee K., Schisano B., Harte A., McTernan P., Kumar 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*, 2010, 397(3), 472-8.
- [34] 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*, 2007, 282(14), 10164-71.
- [35] 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*, 2013, 65(3), 430-40.
- [36] Mehta D., Bhargava D.K., Non-steroidal anti inflammatory drugs and gastrointestinal toxicity, *Apollo Medicine*, 2010, 7(4), 251-62.
- [37] Boelsterli U.A., Redinbo M.R., Saitta K.S., Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies, *Toxicol Sci*, 2012, 131(2), 654-67.
- [38] Wallace J.L., McKnight W., Reuter B.K., Vergnolle N., NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2, *Gastroenterology*, 2000, 119(3), 706-14.
- [39] Langenbach R., Morham S.G., Tian H.F., Loftin C.D., Ghanayem B.I., Chulada P.C., et al., Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration, *Cell*, 1995, 83(3), 483-92.
- [40] Tomisato W., Tsutsumi S., Hoshino T., Hwang H.J., Mio M., Tsuchiya T., et al., Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions, *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(3), 575-85.
- [41] Tomisato W., Tsutsumi S., Rokutan K., Tsuchiya T., Mizushima T., NSAIDs induce both necrosis and apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(4), G1092-100.
- [42] Tsutsumi S., Gotoh T., Tomisato W., Mima S., Hoshino T., Hwang H.J., et al., Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis, *Cell Death Differ*, 2004, 11(9), 1009-16.
- [43] Ohyama K., Shiokawa A., Ito K., Masuyama R., Ichibangase T., Kishikawa N., et al., Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(1), 210-5.
- [44] Pereira-Leite C., Nunes C., Reis S., Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: in vitro assessment and relevance for their biological actions, *Prog Lipid Res*, 2013, 52(4), 571-84.
- [45] Tanaka K., Tomisato W., Hoshino T., Ishihara T., Namba T., Aburaya M., et al., Involvement of intracellular Ca²⁺ levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis, *J Biol Chem*, 2005, 280(35), 31059-67.
- [46] Ishihara T., Hoshino T., Namba T., Tanaka K., Mizushima T., Involvement of up-regulation of PUMA in non-steroidal

- anti-inflammatory drug-induced apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(3), 711-7.
- [47] Pyrko P., Kardosh A., Schonthal A.H., Celecoxib transiently inhibits cellular protein synthesis, *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(2), 395-404.
- [48] Tsutsumi S., Namba T., Tanaka K.I., Arai Y., Ishihara T., Aburaya M., et al., Celecoxib upregulates endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells, *Oncogene*, 2006, 25(7), 1018-29.
- [49] Namba T., Hoshino T., Suemasu S., Takarada-Iemata M., Hori O., Nakagata N., et al., Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by *Helicobacter pylori* and its role in exacerbation of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric lesions, *J Biol Chem*, 2010, 285(48), 37302-13.
- [50] Namba T., Hoshino T., Tanaka K., Tsutsumi S., Ishihara T., Mima S., et al., Up-regulation of 150-kDa oxygen-regulated protein by celecoxib in human gastric carcinoma cells, *Mol Pharmacol*, 2007, 71(3), 860-70.
- [51] Teoh N.C., Farrell G.C., Hepatotoxicity associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Clin Liver Dis*, 2003, 7(2), 401-13.
- [52] Unzueta A., Vargas H.E., Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity, *Clin Liver Dis*, 2013, 17(4), 643-56, ix.
- [53] Nadanaciva S., Aleo M.D., Strock C.J., Stedman D.B., Wang H., Will Y., Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(2), 272-80.
- [54] Franceschelli S., Moltedo O., Amodio G., Tajana G., Remondelli P., In the Huh7 Hepatoma Cells Diclofenac and Indomethacin Activate Differently the Unfolded Protein Response and Induce ER Stress Apoptosis, *Open Biochem J*, 2011, 5, 45-51.
- [55] El-Hassan H., Anwar K., Macanas-Pirard P., Crabtree M., Chow S.C., Johnson V.L., et al., Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury: roles of cytochrome c, Bax, Bid, and caspases, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 191(2), 118-29.
- [56] Nagy G., Kardon T., Wunderlich L., Szarka A., Kiss A., Schaff Z., et al., Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver, *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459(2), 273-9.
- [57] Hur K.Y., So J.S., Ruda V., Frank-Kamenetsky M., Fitzgerald K., Koteliensky V., et al., IRE1 α activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J Exp Med*, 2012, 209(2), 307-18.
- [58] Uzi D., Barda L., Scaiewicz V., Mills M., Mueller T., Gonzalez-Rodriguez A., et al., CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J Hepatol*, 2013, 59(3), 495-503.
- [59] Lorz C., Justo P., Sanz A., Subira D., Egido J., Ortiz A., Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress, *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(2), 380-9.
- [60] Kalinec G.M., Thein P., Parsa A., Yorgason J., Luxford W., Urrutia R., et al., Acetaminophen and NAPQI are toxic to auditory cells via oxidative and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways, *Hear Res*, 2014, 313, 26-37.
- [61] Grosch S., Maier T.J., Schiffmann S., Geisslinger G., Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors, *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(11), 736-47.
- [62] Koki A.T., Masferrer J.L., Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties, *Cancer Control*, 2002, 9(2 Suppl), 28-35.
- [63] Liggett J.L., Zhang X., Eling T.E., Baek S.J., Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-independent targets, *Cancer Lett*, 2014, 346(2), 217-24.
- [64] Chuang H.C., Kardosh A., Gaffney K.J., Petasis N.A., Schonthal A.H., COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro, *Mol Cancer*, 2008, 7, 38.
- [65] Chen S.T., Thomas S., Gaffney K.J., Louie S.G., Petasis N.A., Schonthal A.H., Cytotoxic effects of celecoxib on Raji lymphoma cells correlate with aggravated endoplasmic reticulum stress but not with inhibition of cyclooxygenase-2, *Leuk Res*, 2010, 34(2), 250-3.
- [66] Johnson A.J., Hsu A.L., Lin H.P., Song X., Chen C.S., The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks, *Biochem J*, 2002, 366(Pt 3), 831-7.
- [67] Cha W., Park S.W., Kwon T.K., Hah J.H., Sung M.W., Endoplasmic reticulum stress response as a possible mechanism of cyclooxygenase-2-independent anticancer effect of celecoxib, *Anticancer Res*, 2014, 34(4), 1731-5.
- [68] Pyrko P., Kardosh A., Liu Y.T., Soriano N., Xiong W., Chow R.H., et al., Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib, *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4), 1262-75.
- [69] Du H., Li W., Wang Y., Chen S., Zhang Y., Celecoxib induces cell apoptosis coupled with up-regulation of the expression of VEGF by a mechanism involving ER stress in human colorectal cancer cells, *Oncol Rep*, 2011, 26(2), 495-502.
- [70] Huang K.H., Kuo K.L., Chen S.C., Weng T.I., Chuang Y.T., Tsai Y.C., et al., Down-regulation of glucose-regulated protein (GRP) 78 potentiates cytotoxic effect of celecoxib in human urothelial carcinoma cells, *PLoS One*, 2012, 7(3), e33615.
- [71] Zhang X., Lee S.H., Min K.W., McEntee M.F., Jeong J.B., Li Q., et al., The involvement of endoplasmic reticulum stress in the suppression of colorectal tumorigenesis by tolfenamic acid, *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(12), 1337-47.
- [72] Namba T., Ishihara T., Tanaka K., Hoshino T., Mizushima T., Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(2), 543-8.
- [73] Ikegaki N., Hicks S.L., Regan P.L., Jacobs J., Jumbo A.S., Leonhardt P., et al., S(+)-ibuprofen destabilizes MYC/MYCN and AKT, increases p53 expression, and induces unfolded protein response and favorable phenotype in neuroblastoma cell lines, *Int J Oncol*, 2014, 44(1), 35-43.
- [74] Ou Y.C., Yang C.R., Cheng C.L., Raung S.L., Hung Y.Y., Chen C.J., Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT, *Eur J Pharmacol*, 2007, 563(1-3), 49-60.
- [75] Kim B.M., Maeng K., Lee K.H., Hong S.H., Combined treatment with the Cox-2 inhibitor niflumic acid and PPAR γ ligand ciglitazone induces ER stress/caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer cells, *Cancer Lett*, 2011, 300(2), 134-44.
- [76] Yang H., Park S.H., Choi H.J., Moon Y.L., The integrated stress response-associated signals modulates intestinal tumor cell

- growth by NSAID-activated gene 1 (NAG-1/MIC-1/PTGF-beta), *Carcinogenesis*, 2010, 31(4), 703-11.
- [77] White M.C., Johnson G.G., Zhang W., Hobrath J.V., Piazza G.A., Grimaldi M., Sulindac sulfide inhibits sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, induces endoplasmic reticulum stress response, and exerts toxicity in glioma cells: relevant similarities to and important differences from celecoxib, *J Neurosci Res*, 2013, 91(3), 393-406.
- [78] Kardosh A., Golden E.B., Pyrko P., Uddin J., Hofman F.M., Chen T.C., et al., Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib, *Cancer Res*, 2008, 68(3), 843-51.
- [79] Cusimano A., Azzolina A., Iovanna J.L., Bachvarov D., McCubrey J.A., D'Alessandro N., et al., Novel combination of celecoxib and proteasome inhibitor MG132 provides synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in human liver tumor cells, *Cell Cycle*, 2010, 9(7), 1399-410.
- [80] Cho H.Y., Thomas S., Golden E.B., Gaffney K.J., Hofman F.M., Chen T.C., et al., Enhanced killing of chemo-resistant breast cancer cells via controlled aggravation of ER stress, *Cancer Lett*, 2009, 282(1), 87-97.
- [81] Booth L., Roberts J.L., Cruickshanks N., Tavallai S., Webb T., Samuel P., et al., PDE5 inhibitors enhance Celecoxib killing in multiple tumor types, *J Cell Physiol*, 2014.
- [82] Amaravadi R.K., Thompson C.B., The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment, *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24), 7271-9.
- [83] Jin S., White E., Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress, *Autophagy*, 2007, 3(1), 28-31.
- [84] Thomas S., Sharma N., Golden E.B., Cho H., Agarwal P., Gaffney K.J., et al., Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors, *Cancer Lett*, 2012, 325(1), 63-71.
- [85] Ozcan U., Cao Q., Yilmaz E., Lee A.H., Iwakoshi N.N., Ozdelen E., et al., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, 2004, 306(5695), 457-61.
- [86] Hosoi T., Yamaguchi R., Noji K., Matsuo S., Baba S., Toyoda K., et al., Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress, *EMBO Mol Med*, 2014, 6(3), 335-46.
- [87] Matus S., Glimcher L.H., Hetz C., Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER, *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2), 239-52.
- [88] Hetz C., Mollereau B., Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases, *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(4), 233-49.
- [89] Yamazaki T., Muramoto M., Oe T., Morikawa N., Okitsu O., Nagashima T., et al., Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling, *Neuropharmacology*, 2006, 50(5), 558-67.
- [90] Hosoi T., Sasaki M., Baba S., Ozawa K., Effect of pranoprofen on endoplasmic reticulum stress in the primary cultured glial cells, *Neurochem Int*, 2009, 54(1), 1-6.
- [91] Llorente I.L., Burgin T.C., Perez-Rodríguez D., Martínez-Villayandre B., Perez-García C.C., Fernández-López A., Unfolded protein response to global ischemia following 48 h of reperfusion in the rat brain: the effect of age and meloxicam, *J Neurochem*, 2013, 127(5), 701-10.
- [92] Ye Z., Wang N., Xia P., Wang E., Liao J., Guo Q., Parecoxib suppresses CHOP and Foxo1 nuclear translocation, but increases GRP78 levels in a rat model of focal ischemia, *Neurochem Res*, 2013, 38(4), 686-93.