

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

SOLANGE HENSCHKE LIMA GENTZ

**A APOPTOSE INDUZIDA PELO ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTERÓIDE
SALICILATO DE SÓDIO REQUER A PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE
GCN2 E O ENVOLVIMENTO DE VIAS DO ESTRESSE DO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO**

BELO HORIZONTE

Dezembro/2011

SOLANGE HENSCHKE LIMA GENTZ

**A APOPTOSE INDUZIDA PELO ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTERÓIDE
SALICILATO DE SÓDIO REQUER A PARTICIPAÇÃO DA PROTÉINA CINASE
GCN2 E O ENVOLVIMENTO DE VIAS DO ESTRESSE DO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO**

*Tese apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Biologia
Celular do Instituto de
Ciências Biológicas,
Universidade Federal de
Minas Gerais, como
requisito parcial para
obtenção do título de
Doutor em Biologia
Celular*

Orientador: Prof. Dr. Aristóboło Mendes da Silva

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genes Inflamatórios, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva.

APOIO FINANCEIRO:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

COLABORADORES:

- Depto. de Fisiologia e Biofísica – ICB – UFMG

Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes

- Fundação Hemominas – Setor de Pesquisa - Belo Horizonte

Dra. Marina Lobato Martins

*“ A Ciência sem Religião é aleijada
a Religião sem a Ciência é cega.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar incondicionalmente ao meu lado me dando sempre muito Amor, Saúde e Coragem para seguir a minha caminhada.

A minha mãe por todo o amor, apoio e confiança em mim e por sempre acreditar que eu seria capaz de atingir mais este importante objetivo de minha vida.

Ao meu marido, Reiner Gentz por estar sempre ao meu lado e por ser sempre o meu grande companheiro por todos estes anos. Pelo seu amor e carinho e grande estímulo para esta conquista e por estar sempre próximo de nossas filhas nos meus inúmeros momentos de ausência do nosso lar. Ao imenso apoio e pelo aprendizado com sua experiência de um grande e respeitado pesquisador. Ich liebe Dich!

As minhas queridas filhas Renata, Melissa e Monique por todo o amor, carinho e principalmente pela compreensão dos meus momentos de ausência devido aos meus compromissos com meus estudos. Obrigada por tudo. Amo vocês.

A minha grande e querida amiga Profa. Edel Stancioli do Depto. de Microbiologia da UFMG, pela sua preciosa amizade, amor e imensa ajuda durante todo o meu doutorado, pelo apoio científico e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. Um especial agradecimento ao Cioli, esposo de Edel, pela grande amizade e estímulo.

Aos meus irmãos Sanger e Sandro que sempre compartilharam dos meus momentos de conquistas e também de desafios. Agradeço pela torcida positiva ainda que não sejam cruzeirenses.

A toda minha família: tios/tias (Eladir, Eny, Eunice, Heli, Hélia e Elaine), primos/primas por ser a família mais divertida e unida de todo o mundo. Mesmo que alguns nem sequer entendiam bem a loucura que sempre estava me propondo a fazer.

As minhas cadelas Nellie e Laila por estarem horas a fio ao meu lado me incentivando a terminar esta tese.

As minhas amigas do Laboratório de Genes Inflamatórios, Paula (a grande e especial Paulete), Kátia (Katita), Thalita (Thalitex), Carolina (Carole) e todos alunos de IC por todos os momentos felizes e pela força nos momentos estressantes. Por toda a ajuda e apoio nos momentos mais complicados, daqueles resultados de jogar no lixo e começar tudo de novo. Valeu de coração!

Ao meu Orientador Prof. Aristóbolo Mendes da Silva por ter me recebido como aluna de doutorado e acreditar na minha capacidade e pela paciência nos momentos mais difíceis durante o desenrolar do meu projeto de doutorado.

Aos colegas do Departamento de Morfologia/Pós-Graduação em Biologia Celular e a ex-secretária Sibebe o meu sincero agradecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, aos Professores, Funcionários, a secretária Diana pela sua boa vontade sempre que precisei e em especial a Coordenação e a Profa. Denise Carmona Cara Machado, por todo o suporte e compreensão nos momentos mais desafiantes do meu doutorado.

A todos os colaboradores deste projeto, em especial: Profa. Elaine de Souza Fagundes, Dra. Marina Lobato Martins e Dra. Caryne Margotto Bertollo, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e grande ajuda nos experimentos que certamente contribuíram muito para o sucesso do meu projeto. Agradeço também a Rafaela Gomes Andrade pela sua imensa ajuda e boa vontade em todos os experimentos que realizei na Fundação Hemominas.

Aos colegas de todos os laboratórios que frequentei, que colaboraram muito para tantos e tantos experimentos.

A todos outros amigos e amigas que não mencionei especificamente mas que sempre me deram todo o incentivo e coragem para nunca desistir do meu objetivo.

Aos animais que eventualmente fizeram parte de meus experimentos.

As agências financiadoras, CNPq e FAPEMIG por tornarem este projeto viável.

RESUMO

Salicilatos são fármacos anti-inflamatórios não esteróides com ação conhecida na inibição da atividade da cicloxigenase, uma enzima chave na biosíntese de prostaglandina. Os salicilatos possuem também a capacidade de induzir a fosforilação da subunidade alfa do fator de iniciação da tradução (eIF2 alfa). Sob diferentes condições de estresse, cinases como PERK e GCN2 podem fosforilar eIF2-alfa e levar a ativação de vias de sinalização tais como a da resposta de proteínas mal enoveladas (UPR) induzida no retículo endoplasmático. Além de suas atividades anti-inflamatórias, já foi relatado que os salicilatos induzem a apoptose em vários tipos de células através da regulação de múltiplas moléculas. Neste estudo, nós almejam identificar genes relacionados a UPR que são ativados após o tratamento com salicilato de sódio (NaSal) e determinar uma possível função da eIF2-alfa cinase GCN2 na morte celular induzida pelo tratamento com NaSal. O perfil transcricional foi avaliado por um arranjo de PCR contendo 84 mRNAs, comparando-se fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens e deficientes de GCN2, tratados ou não com NaSal. O tratamento com NaSal levou a indução de vários genes responsivos a UPR, especialmente envolvidos na apoptose, regulação da transcrição e no metabolismo. A ativação transcricional do fator de transcrição pró-apoptótico CHOP/GADD153, o gene de expressão mais induzida após tratamento com NaSal, foi dependente de GCN2. A perda de GCN2 nas células faz com que estas se tornem resistentes a apoptose induzida pelos salicilatos. Nós concluímos que a cinase GCN2 tem papel central na morte induzida pelo tratamento com NaSal através da regulação de vários genes da via da UPR.

Palavras chave: GCN2, apoptose, salicilatos, UPR, retículo endoplasmático

ABSTRACT

Salicylates are non-steroidal anti-inflammatory drugs with the well-known ability to inhibit cyclooxygenase activity, the key enzyme in prostaglandin biosynthesis. The salicylates also induce the phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor (eIF2 alpha). Under different stress conditions, kinases such as PERK and GCN2 can phosphorylate eIF2 alpha and trigger the activation of signaling pathways such as the unfolded protein response (UPR) elicited in the endoplasmic reticulum. In addition to their anti-inflammatory actions, salicylates have been reported to induce apoptosis in a number of cell types by regulating multiple molecules. In this study we wanted to identify genes related to the UPR that are activated upon sodium salicylate (NaSal) treatment and determine the possible role of the eIF2 alpha kinase GCN2 in the cell death induced by NaSal. Transcriptional profiling by PCR array was used to compare 84 mRNAs in untreated and NaSal treated wild type and GCN2^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We found that NaSal treatment strongly induces apoptosis of wild-type, but to a much less extent in GCN2^{-/-}-MEFs. NaSal treatment led to the induction of several UPR responsive genes, especially involved in apoptosis, transcriptional regulation and metabolism. The transcriptional activation of the pro-apoptotic transcription factor CHOP/GADD153, the most highly expressed gene induced upon NaSal treatment, was dependent on GCN2. GCN2 loss in cells renders them resistant to apoptosis induced by salicylates. We conclude that the GCN2 kinase plays a key role in cell death induced by NaSal treatment by regulating a number of genes in the UPR pathway.

Keywords: GCN2, apoptosis, salicylates, UPR, endoplasmic reticulum

Sumário

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	12
<i>LISTA DE TABELAS</i>	13
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	14
1 Introdução	18
1.1 O Retículo Endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular	18
1.2 Os três sensores da resposta ao estresse do RE.....	21
1.2.1 IRE-1.....	21
1.2.2 PERK.....	24
1.2.3 ATF6.....	27
1.3 As cinases da subunidade alfa do fator de iniciação da tradução eIF2:.....	29
1.3.1 PERK.....	30
1.3.2 GCN2.....	30
1.3.3 PKR.....	34
1.3.4 HRI.....	35
1.4 O envolvimento do RE na morte celular programada.....	36
1.4.1 Apoptose.....	36
1.4.2 Autofagia.....	43
1.4.3 Necrose.....	45
1.5 Os Salicilatos.....	47
1.5.1 O potencial terapêutico dos salicilatos em diversas doenças e suas ações sobre as vias de sinalização celular.....	49
2 Justificativa	53
3 Objetivos	55
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos Específicos.....	55
4 Metodologia	57
4.1 Cultura de Fibroblastos Embrionários Murinos (MEFs) selvagens e deficientes de PERK e GCN2.....	57
4.2 Obtenção de extratos celulares totais.....	57
4.3 Western Blot.....	58
4.3.1 Fracionamento eletroforético e transferência.....	58
Imunoensaio e revelação.....	58

4.3.2	Anticorpos.....	59
4.4	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT).....	59
4.5	Deteção do processo de apoptose por citometria de fluxo.....	61
4.5.1	Determinação do conteúdo de DNA subdiplóide por citometria de fluxo.....	61
4.5.2	Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo.....	63
4.6	Análise da expressão diferencial de genes: arranjos de PCR quantitativa em tempo real (<i>Quantitative Real Time – PCR array</i>).....	64
4.6.1	Extração do RNA total de MEFs estimulados por NaSal e obtenção da 1ª fita de cDNA.....	64
4.6.2	Arranjos de qRT-PCR (PCR Quantitativa em Tempo Real) de 84 genes da via de proteínas mal enoveladas (UPR) – SABiosciences.....	65
4.7	Ensaio de gene repórter luciferase.....	67
4.8	Transfecções de siRNA para GCN2 e de células HEK 293T.....	69
5	Resultados.....	71
5.1	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização celular de metiltiazoltetrazólio (MTT).....	71
5.2	Efeito das diferentes concentrações de NaSal na proliferação de células MEF WT e GCN2 KO após tratamento com NaSal.....	71
5.3	Apoptose induzida pelo tratamento com NaSal em MEFs.....	74
5.3.1	Análise da fragmentação do DNA de células MEF WT e GCN2 KO após o tratamento com NaSal.....	74
5.3.2	Análise da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal.....	76
5.4	Análise da expressão de genes relacionados a resposta de proteínas mal enoveladas (UPR) em células MEF WT e GCN2 KO após estimulação com NaSal.....	77
5.5	Análise da atividade do elemento de resposta ao estresse do RE (ERSE) presente no promotor de CHOP após tratamento com NaSal.....	85
5.6	Efeito do tratamento com NaSal sobre a fosforilação de GCN2.....	88
5.7	Requerimento de PERK e GCN2 na fosforilação de eIF2-alfa induzida por NaSal.....	89
5.8	A inibição da síntese proteica em MEFs tratados com NaSal.....	90
5.9	O silenciamento de GCN2 por siRNAs.....	92
5.10	A fosforilação de JNK induzida por NaSal.....	93
6	Discussão.....	96
7	Conclusão.....	104
8	Anexo.....	105
9	Referências Bibliográficas.....	109

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática das três vias da resposta de proteínas mal enoveladas (UPR)
- Figura 2:** Integração das vias de apoptose no estresse do RE
- Figura 3:** Representação esquemática das vias apoptóticas de IRE1 sob estresse prolongado do retículo endoplasmático
- Figura 4:** Representação esquemática das vias apoptóticas de CHOP sob estresse prolongado do retículo endoplasmático
- Figura 5:** Histograma representativo da análise do conteúdo de DNA subdiploide
- Figura 6:** Amostras de RNA total em gel desnaturante de agarose a 2%
- Figura 7:** Mapa da placa de 96 poços mostrando os 84 genes associados à via da resposta de proteínas mal enoveladas (UPR)
- Figura 8:** Representação esquemática do ensaio de luciferase
- Figura 9:** Ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT
- Figura 10:** Efeito das diferentes concentrações de NaSal na proliferação celular
- Figura 11:** Análise comparativa entre a fragmentação de DNA de células MEF WT e GCN2 KO
- Figura 12:** Análise comparativa para dupla marcação com PI/Anexina V de MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal
- Figura 13:** Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal, de acordo com seu enquadramento em grupos funcionais
- Figura 14:** Análise da ativação dos elementos responsivos ao estresse do RE (ERSE) em células WT e GCN2 KO tratadas com NaSal
- Figura 15:** A fosforilação de GCN2 em células MEF WT e GCN2 KO tratadas com NaSal
- Figura 16:** Requerimento parcial de GCN2, porém total de PERK para a fosforilação de eIF2-alfa induzida por NaSal
- Figura 17:** NaSal inibe a síntese protéica com a participação de GCN2
- Figura 18:** O silenciamento de GCN2 em células HEK 293T
- Figura 19:** PERK é requerida para a fosforilação de JNK por NaSal
- Figura 20:** Representação esquemática de genes da UPR induzidos por NaSal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise da expressão gênica em células WT e GCN2-KO tratadas com NaSal

Tabela 2: Genes de expressão elevada em células GCN2-KO em comparação com células WT

LISTA DE ABREVIATURAS

ASK1	Cinase reguladora de sinais apoptóticos (<i>Apoptosis signaling-regulating kinase 1</i>)
ATF4	Fator ativador da transcrição 4 (<i>Activating transcription factor 4</i>)
ATF6	Fator ativador da transcrição 6 (<i>Activating transcription factor 6</i>)
BAK	Proteína-killer antagonista homóloga a Bcl-2 (<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>)
BAX	Proteína X associada a Bcl-2 (<i>Bcl-2 associated X protein</i>)
BCL	Proteína de leucemia de célula B (<i>B cell leukemia protein</i>)
BID	Proteína Agonista de Morte Celular de Domínio Interatuante com BH3 (<i>BH3 domain-only death agonist protein</i>)
BiP/GRP78	Proteína de ligação a cadeia pesada da imunoglobulina (<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>)
BSA	Soroalbumina bovina (<i>bovine serum albumine</i>)
CEBP/B	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
CHOP	Transcrito 3 induzido pelo dano ao DNA (<i>DNA damage inducible transcript 3 - Ddit3</i>)
DMEM	Meio mínimo de Eagle modificado (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DTT	Ditiotreitol
eIF2-alfa	Subunidade alfa do fator 2 de iniciação da tradução em eucariotos (<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha</i>)
ERAD	Degradação associada ao retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic reticulum associated degradation</i>)
ERO1LB	Membro da família oxidase do retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic Reticulum Oxidase family member ERO1-like beta</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GADD34	Protéina induzida por dano ao DNA e parada de crescimento (<i>Growth Arrest And DNA-Damage Inducible Protein</i>)

GCN2	(<i>General control non-derepressible 2</i>)
HFS	Solução fluorocrômica hipotônica
HR1	Inibidor 1 regulado por heme (<i>Heme-regulated inhibitor 1</i>)
HSP	Proteína do choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
JNK	Cinase N-terminal <i>c-jun</i> (<i>c-jun N-terminal kinase</i>)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein Kinase</i>)
MEF WT	Fibroblasto embrionário murino selvagem (<i>murine embryonic fibroblast wild type</i>)
IRE1	Enzima 1 sequestradora de Inositol (<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>)
MTT	Metiltiazoltetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NaSal	Salicilato de Sódio (<i>Sodium Salicylate</i>)
PBS	Tampão salina fosfato
PKR	Proteína cinase dependente de RNA de fita-dupla (<i>Double-stranded RNA dependent protein kinase</i>)
Ppp1r15b	Proteína fosfatase 1 inibidora da subunidade 15 (<i>Protein phosphatase 1, regulatory inhibitor subunit 15</i>)
PERK	Proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático (<i>RNA dependent protein kinase-related endoplasmic reticulum kinase</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
RIDD	Decaimento regulador dependente de IRE1 (<i>Regulated IRE1 dependent decay</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAF2	Fator 2 associado ao fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis associated factor 2</i>)

TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
XBP1	Proteína 1 ligante do domínio X (<i>X-box binding protein 1</i>)
Zvad	Z-Val-Ala-Asp(OCH ₃)-fluorometilcetona

Introdução

1- Introdução

1.1- O Retículo Endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela presente em eucariotos com a função de prover um ambiente ótimo e único para o enovelamento de proteínas, montagem e formação de pontes dissulfeto além de ser uma organela responsável pela síntese de lipídeos e esteróis e pelo estoque de cálcio intracelular. Várias condições fisiopatológicas tais como: a depleção de cálcio, o estresse oxidativo, a hipoglicemia, a expressão de proteínas mutadas e a hipóxia, podem interferir no processo de enovelamento de proteínas levando a um acúmulo dessas proteínas no lúmen do RE. Este acúmulo referido como proteotoxicidade contribui para a etiologia de várias doenças que incluem o diabetes, o câncer e distúrbios neurológicos (Schroder e Kaufman, 2005; Marciniak e Ron, 2006; Ron e Walter, 2007; Wek e Cavener, 2007; Hotamisligil, 2010; Asada, Kanemoto *et al.*, 2011). A concentração de proteínas no lúmen do RE é extremamente alta, aproximadamente 100 mg/ml (Stevens e Argon, 1999). Em células com alta atividade secretora como os hepatócitos e as células pancreáticas, ocorre a síntese de aproximadamente 1,3 e 2,6 milhões, respectivamente, de proteínas secretadas por minuto (Snapp, 2005).

Para ser capaz de suportar tamanha demanda, a homeostase no lúmen do RE é meticolosamente monitorada e elegantemente mantida. Esse controle homeostático é mantido através da ação de vias de transdução de sinal que possuem sensores no lúmen do RE e proteínas efetoras que transmitem a mensagem a outros compartimentos da célula (Wu, Tan *et al.*, 2004; Ron e Walter, 2007). A primeira evidência para a existência desses eventos de sinalização intracelular no RE surgiu através da observação de manipulações genéticas e farmacológicas que levaram ao aumento da produção de proteínas mal formadas no RE, culminando na ativação da expressão de genes que codificam chaperonas residentes no RE (Kozutsumi, Segal *et al.*, 1988).

As vias de sinalização intracelular que medeiam a regulação da expressão de proteínas no RE foi denominada de resposta a proteínas mal enoveladas (*unfolded protein response* - UPR). A UPR ativa a expressão de genes que capacitam a célula a se adaptar e sobreviver ao estresse incluindo: chaperonas residentes no RE (Kozutsumi, Segal *et al.*, 1988), enzimas chave na biosíntese de lipídeos (Cox, Chapman *et al.*, 1997), membros da maquinaria de degradação associada ao RE, ERAD (*Endoplasmic Reticulum-associated degradation machinery*) e outros componentes do sistema secretório (Ng, Spear *et al.*, 2000; Travers, Patil *et al.*, 2000; Urano, Wang *et al.*, 2000a; Leber, Bernales *et al.*, 2004). Os princípios da UPR estão relativamente bem definidos. A perda do balanço entre a carga de proteínas mal formadas que entra no RE e a capacidade da maquinaria celular em lidar com essa carga, ou seja, estresse do RE, levam a três importantes respostas. Na primeira resposta, ocorre uma redução da quantidade de proteínas que são segregadas para o RE, através da diminuição da síntese de polipeptídeos e da translocação de proteínas no RE. Na segunda resposta, ocorre um aumento na capacidade do RE em lidar com as proteínas mal formadas, através da ativação transcricional de genes alvo da UPR, incluindo os que têm função na maquinaria de dobramento que ocorre no RE e também da ativação do ERAD para eliminar proteínas irreparavelmente mal enoveladas. E, finalmente, se a homeostase celular não puder ser restabelecida, então uma terceira resposta se instala, a qual é caracterizada pelo aumento da morte celular de modo a impedir que o organismo mantenha células que possuam uma carga elevada de proteínas mal formadas (Wu, Ohmori *et al.*, 1994; Ron e Walter, 2007).

A incapacidade da célula de ativar essas respostas está associada a várias disfunções celulares e a diversas patologias (Kaufman, 2002). Uma série de estímulos levam à má formação de proteínas no RE, entre os estão incluídos: privação de nutrientes, alterações no balanço de oxidação e redução, mudanças na concentração de cálcio, falhas nas modificações pós-traducionais ou um aumento na síntese de proteínas secretadas (Rutkowski e Kaufman, 2004). Processos fisiológicos, como por exemplo, o envelhecimento também podem influenciar o dobramento de proteínas devido ao declínio de atividade de importantes chaperonas e enzimas de dobramento, levando assim a um comprometimento da resposta adaptativa da UPR (Naidoo, 2009).

Três diferentes proteínas transdutoras de sinais do estresse do RE foram identificadas e bem caracterizadas, sendo que cada um define uma via distinta da UPR. São elas: IRE-1 (*inositol-requiring protein-1*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) e PERK (*protein kinase RNA (PKR)- like ER kinase*) (Schroder e Kaufman, 2005; Bernales, Papa *et al.*, 2006; Ron e Walter, 2007). Todas essas três proteínas são proteínas transmembranas que apresentam a) um domínio sensor voltado para o lúmen do RE que detecta as proteínas mal formadas, b) um domínio transmembrana (na membrana do RE), e, c) um domínio citosólico que transmite o sinal para a maquinaria de transcrição e tradução de mRNAs (Zhang e Kaufman, 2008a). Em condições normais PERK, ATF6 e IRE-1 estão associados à chaperona BiP/GRP78 (*immunoglobulin heavy chain binding protein*). Entretanto, em resposta ao estresse no RE, BiP é rapidamente liberada de cada sensor, resultando assim na ativação da UPR (Bertolotti, Zhang *et al.*, 2000; Okamura, Kimata *et al.*, 2000; Shen, Chen *et al.*, 2002). Uma descrição mais detalhada de cada um desses três sensores do RE compreenderão os próximos itens desta introdução.

1.2– Os três sensores da resposta ao estresse do RE

1.2.1 – IRE-1

IRE1 codifica uma proteína transmembrana do tipo 1 de 100 kDa, localizada no RE com um domínio serina/treonina cinase na porção citoplasmática (Cox, Shamu *et al.*, 1993; Mori, Ma *et al.*, 1993; Kaufman, Scheuner *et al.*, 2002). Em condições de estresse do RE, IRE1 pode iniciar tanto programas de sobrevivência quanto apoptóticos. Através da interação de sua porção amino terminal com a chaperona BiP/GRP78, IRE1 apresenta a habilidade de detectar proteínas não enoveladas ou mal enoveladas (Cox, Shamu *et al.*, 1993; Shamu e Walter, 1996). Em resposta a esses eventos IRE1 dimeriza-se resultando em auto-transfosforilação, que ocorre através dos seus domínios cinase justapostos. Essa dimerização pode ser devido à ligação de proteínas mal formadas no domínio luminal de IRE1 ou pode envolver a liberação de chaperonas repressoras como BiP/GRP78 ou ambos (Bertolotti, Zhang *et al.*, 2000). A sinalização de IRE1 não se caracteriza por uma ativação de cascatas sequenciais efetuadas por proteínas cinases, entretanto, a auto-transfosforilação de IRE1, ativa a função efetora de IRE1 causando a clivagem endonucleásica precisa de seu substrato conhecido: um RNA mensageiro que codifica o fator de transcrição Hac1 (*homologous to ATF/CREB1*) na levedura *S.cerevisae* (Cox e Walter, 1996; Mori, Kawahara *et al.*, 1996) ou de XBP-1 (*X-box binding protein-1*) em metazoários (Yoshida, Matsui *et al.*, 2001; Calfon, Zeng *et al.*, 2002). IRE1 é, na verdade, uma enzima bifuncional que possui tanto a porção cinase quanto a porção endoribonucleásica sítio específica. A base para o acoplamento da auto-transfosforilação com a clivagem endoribonucleásica em sítios específicos permanece por ser esclarecida (Ron e Hubbard, 2008). As consequências da clivagem dependente de IRE1 diferem em leveduras e nos metazoários. Na levedura o intron de 252 nucleotídeos do RNA mensageiro de HAC1 reprime a tradução. Esta repressão, mediada pela remoção do intron é o evento chave na ativação da UPR (Ruegsegger, Leber *et al.*, 2001). Em constraste, nos metazoários tanto o precursor (não processado) quanto a forma clivada (processada) do mRNA de XBP-1 são traduzidas. A forma clivada é mais estável e é um potente ativador de genes alvos da UPR, ao passo que a forma codificada pelo mRNA precursor (não clivada) é pouco estável e reprime genes alvos da UPR (Yoshida, Matsui *et al.*, 2001; Calfon, Zeng *et al.*, 2002). Além da regulação pós-transcricional por IRE1, os mRNAs de HAC1 e XBP1 são também alvos transcricionais da UPR (Ron e

Walter, 2007). Em levedura, a síntese do mRNA de HAC1 é induzida sob altas concentrações de proteínas mal enoveladas no RE, resultando no aumento da transcrição do fator de transcrição Hac1 que coordena um programa de transcrição qualitativamente diferente, chamado de super-UPR (Leber, Bernales *et al.*, 2004). Nos metazoários, os níveis do mRNA de XBP-1 também aumentam na indução da UPR e continuam elevados mesmo com a diminuição do estresse do RE e inativação de IRE1 e, por esta razão, este novo mRNA de XBP1 permanece na sua forma precursora, não processada, funcionando assim como um inibidor da sinalização de XBP1 (Yoshida, Oku *et al.*, 2006).

Em células de *Drosophila melanogaster* Ire1 medeia independentemente a clivagem e degradação de mRNAs que codificam proteínas que atravessam a via de secreção protéica sendo esta nova via denominada de RIDD (*regulated Ire1-dependent decay*) (Hollien e Weissman, 2006). Esta nova via da UPR tem o potencial de aliviar seletivamente a sobrecarga no RE, liberando a maquinaria de tradução e translocação celular para o influxo de novas proteínas induzidas pela UPR. Estudos da regulação de mensageiros específicos sugerem que a via RIDD também opera em células de mamíferos (Tirasophon, Lee *et al.*, 2000; Iwawaki, Hosoda *et al.*, 2001; Oikawa, Tokuda *et al.*, 2007; Iqbal, Dai *et al.*, 2008; Lipson, Ghosh *et al.*, 2008). Os mamíferos expressam duas isoformas de Ire-1: Ire1- α com expressão ubíqua e Ire1- β expresso nas células epiteliais intestinais (Hollien, Lin *et al.*, 2009). Ire1- α também parece mediar a degradação de transcritos de insulina em células pancreáticas β em condições crônicas de glicose alta, talvez permitindo a sobrevivência celular durante o estresse crônico extremo (Lipson, Ghosh *et al.*, 2008). Ire1- β parece ter também alvos alternativos pela mediação da clivagem do RNA ribossomal 28-S (Iwawaki, Hosoda *et al.*, 2001), do mensageiro da proteína microsomal de transferência de triglicerídeos, além de uma chaperona do RE importante para a montagem de vesículas de transporte lipídicas (Iqbal, Dai *et al.*, 2008). Os exemplos acima citados podem explicar as observações feitas de que Ire1 em metazoários tem funções mais amplas do que a clivagem de XBP-1 (Zhang, Wong *et al.*, 2005). O fato de que as duas atividades nucleásicas de Ire1, RIDD e o processamento de XBP-1, podem ser diferencialmente ativadas, revelam a complexidade da UPR (Hollien, Lin *et al.*, 2009).

Uma função pró-apoptótica foi determinada para IRE1. O domínio citosólico ativado de IRE1 α liga-se a proteína adaptadora TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*),

levando a ativação de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) e da via de *cjun-N terminal kinase* (JNK) (Urano, Wang *et al.*, 2000b; Nishitoh, Matsuzawa *et al.*, 2002). Esta ativação de JNK leva a interação de componentes da maquinaria de morte celular como TRAF2, Caspase 12, Bax e Bak sendo este evento independente da atividade RNase de IRE1 (Yoneda, Imaizumi *et al.*, 2001; Hollien e Weissman, 2006). Entretanto, a sinalização de JNK pode disparar respostas que promovem a sobrevivência celular ou a morte celular dependendo do tipo de estímulo, duração, intensidade e/ou duração da ativação (Barr e Bogoyevitch, 2001; Sakurai, Maeda *et al.*, 2006; Ventura, Hubner *et al.*, 2006). IRE1 também modula a ativação de outras cinases como ERKs (*extracellular signal regulated kinases*) e também da via de NF- κ B (Nguyen, Kebache *et al.*, 2004; Hu, Han *et al.*, 2006)entretanto, a função destes efetores na UPR por IRE1 não é bem compreendida (Chakrabarti, Chen *et al.*, 2011). Existem mais indícios de possíveis ligações de IRE1 e apoptose induzida pelo estresse do RE; como exemplo, experimentos de co-precipitação sugerem que IRE1 α de mamíferos liga-se às proteínas Bak e Bax que estão envolvidas na via apoptótica mitocondrial e estas interações parecem ser importantes para a ativação de IRE1 α (Hetz, Bernasconi *et al.*, 2006).

Por outro lado, outros estudos demonstraram em cultura de células e em estudos animais, que a progressão para a morte celular sob estresse crônico do RE, envolve atenuação da sinalização de IRE1 e manutenção da atividade de PERK resultando na queda da viabilidade celular, contribuindo assim para a morte celular. A sinalização de PERK que culmina com a redução da síntese protéica e ativação do fator de transcrição pro-apoptótico CHOP é mantida enquanto que a manutenção artificial da atividade de IRE1 leva ao aumento da sobrevivência celular. A extensão da sinalização de PERK e IRE1 tem efeitos opostos na viabilidade celular. A ativação diferencial de PERK e IRE1 pode determinar a decisão de vida ou morte após o estresse do RE (Lin, Li *et al.*, 2007; Lin, Li *et al.*, 2009).

1.2.2 – PERK

PERK é uma serina-treonina cinase transmembrana do tipo I que está presente na maioria das células. Em sua forma monomérica inativa, o domínio luminal encontra-se associado à chaperona BiP/GRP78. Quando essa associação é rompida em decorrência de diferentes estresses celulares, PERK homodimeriza-se e autofosforila-se promovendo a fosforilação da subunidade alfa, no resíduo de serina 51, do fator de iniciação da tradução eIF2, responsável por carrear a metionina inicial, levando a uma diminuição global da síntese de proteínas (Harding, Zeng *et al.*, 2001). Essa fosforilação inibe o fator eIF2B, um complexo pentamérico que recicla eIF2 a sua forma ativa pela ligação de GTP. Baixos níveis de eIF2 ativo resultam na diminuição da iniciação da tradução do mRNA, reduzindo globalmente a nova síntese protéica as quais estariam destinadas ao lúmen do RE sob condições de estresse (Harding, Zhang *et al.*, 1999). PERK transmite tanto sinais pró-sobrevivência como pró-apoptóticos, resultantes do acúmulo de proteínas mal formadas e mal enoveladas no RE. Para impedir uma atenuação exacerbada da tradução de mRNAs, a fosfatase GADD34 (*growth arrest and DNA damage*) (Hollander, Zhan *et al.*, 1997) é também induzida pela via de sinalização mediada por PERK, promovendo a desfosforilação de eIF2-alfa e, portanto, restaurando a tradução (Novoa, Zeng *et al.*, 2001). Outro mecanismo para controlar a atividade de PERK sobre a tradução de mRNAs é através de P58^{IPK}, um membro da família de chaperonas DNAJ que se liga ao domínio cinase de PERK inibindo, assim, a atividade de PERK, que conseqüentemente não fosforila mais eIF2 (Van Huizen, Martindale *et al.*, 2003). Interessantemente a indução do mRNA de P58^{IPK} ocorre muitas horas após a ativação de PERK e fosforilação de eIF2-alfa. Essa indução tardia pode determinar o fim adaptativo da UPR e o início do alarme para a fase de apoptose (Szegezdi, Logue *et al.*, 2006), além disso, a interação PERK-P58^{IPK} está também envolvida com a degradação de proteínas (Oyadomari, Yun *et al.*, 2006; Chakrabarti, Chen *et al.*, 2011).

Análises comparativas do perfil de expressão gênica em células selvagens e células deficientes de PERK sob condições de estresse celular revelaram uma indução alterada em vários mRNAs responsáveis pela UPR (Harding, Zhang *et al.*, 2003). Efeito similar também foi evidenciado em células com mutação no resíduo Ser51 de eIF2-alfa (Scheuner, Song *et al.*, 2001).

Além de reduzir a síntese de proteínas e reduzir a carga do RE, o módulo PERK-eIF2-alfa também contribui para ativação transcricional da UPR. Genes que contêm sítios de entrada interna do ribossomo (IRES, *internal ribosome entry sites*) na região 5' não traduzida, sofrem um desvio do bloqueio da tradução mediado por eIF2-alfa fosforilado (Schroder e Kaufman, 2005). A tradução de mRNAs específicos como, por exemplo, o mRNA de ATF4, que codifica um fator de transcrição que ativa genes envolvidos no metabolismo celular, chaperonas e na regulação da apoptose, ocorre devido à presença de uORFs (*upstream open reading frames*) que contribuem para a tradução diferencial de ATF4 (Harding, Zhang *et al.*, 2003; Vattem e Wek, 2004; Wek e Cavener, 2007).

A via de eIF2-alfa-P/ATF4 tem sido referida como resposta de sinal integrado (ISR, *integrated stress response*) (Harding, Novoa *et al.*, 2000). A via ISR é um programa de resposta citoprotetora de expressão gênica designada a limitar ou reverter o dano celular causado pelo estresse. Alternativamente, se o estresse não for controlado a resposta resultará em programação da morte celular (Harding, Zhang *et al.*, 2003; Haynes, Titus *et al.*, 2004). Fibroblastos obtidos de camundongos deficientes de ATF4 possuem maior suscetibilidade aos estresses hipóxico, oxidativo, de privação de aminoácidos e glicose o que são todos característicos de microambientes de tumores sólidos (Harding, Zhang *et al.*, 2003; Rzymiski, Milani *et al.*, 2009). Em contraste, a resposta pró-sobrevivência ativada por PERK e ATF4 podem ser importantes na manutenção de tumores sólidos (Harding, Zhang *et al.*, 2000). Devido a isto, o papel de PERK e ATF4 na morte celular sob condições de estresse crônico no RE e hipóxia, não está completamente elucidado. A hipóxia moderada tipicamente não induz a apoptose e a hipóxia severa pode levar a uma pressão seletiva promovendo assim a expansão de células com perfil apoptótico como, por exemplo, as células com mutações no gene de p53 (Graeber, Osmanian *et al.*, 1996).

Dentre os genes alvo de ATF4 há o fator de transcrição CHOP (GADD153/DDIT3) que serve para ampliar a ativação transcricional para lidar com o estresse ou destinar a célula a programar apoptose (Fawcett, Martindale *et al.*, 1999; Harding, Zhang *et al.*, 2000; Marciniak, Yun *et al.*, 2004; Marciniak e Ron, 2006). CHOP é uma proteína de 29 kDa composta por um domínio amino-terminal de ativação transcricional e um domínio terminal carboxila com zipper básico de leucina e normalmente está presente em baixos níveis nas células (Ron e Habener, 1992). O

domínio de ativação transcricional é regulado positivamente nos resíduos S78 e S81 por membros da família de cinases p38 MAPK (Wang e Ron, 1996; Maytin, Ubeda *et al.*, 2001), enquanto que o domínio bZIP tem papel importante na homodimerização de CHOP (Matsumoto, Minami *et al.*, 1996; Maytin, Ubeda *et al.*, 2001; Chakrabarti, Chen *et al.*, 2011). Foi demonstrado que CHOP tem função importante na regulação da morte celular em resposta ao estresse do RE. A super expressão de CHOP é capaz de interromper o ciclo de celular durante o crescimento (Zhan, Lord *et al.*, 1994). CHOP pode também induzir a morte celular através do aumento dos níveis da fosfatase GADD34 restaurando a tradução e também aumentando o estresse oxidativo (Zinszner, Kuroda *et al.*, 1998; Marciniak, Yun *et al.*, 2004). A indução da apoptose mediada pela atividade de CHOP ocorre primariamente pela indução de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e pela sensibilização de células a agentes indutores de estresse (Gotoh, Terada *et al.*, 2001; Mccullough, Martindale *et al.*, 2001; Koumenis, 2006).

1.2.3 – ATF6

ATF6 é uma proteína de 90 kDa, do tipo bZIP (*basic leucine zipper*). A ativação de ATF6 por proteínas mal formadas envolve uma série de eventos que incluem a translocação e o processamento proteolítico, que culminam com a regulação de um programa transcricional pró-sobrevivência (Hai, Liu *et al.*, 1989; Haze, Yoshida *et al.*, 1999a). ATF6 é também regulada pela interação com BiP no lúmen do RE (Shen, Chen *et al.*, 2002) todavia, o mecanismo de interação com BiP e os fatores que controlam a translocação de ATF6 para o Golgi permanecem incertos .

Existem dois tipos de ATF6, α e β , que são sintetizadas como proteínas transmembrana do tipo II no RE designadas pATF6 α/β (P), com os seus domínios bZIP voltados para o citoplasma (Haze, Yoshida *et al.*, 1999a; Haze, Okada *et al.*, 2001). ATF6 α/β detectam o estresse do RE, dissociam de BiP e translocam para o Complexo de Golgi em vesículas COPII onde são clivadas pelas proteases (S1P) sítio 1 protease e (S2P) sítio 2 protease para liberação da porção citosólica de ligação ao DNA (Haze, Yoshida *et al.*, 1999b; Ye, Rawson *et al.*, 2000; Chen, Shen *et al.*, 2002; Okada, Haze *et al.*, 2003). Os fragmentos N-terminais de ligação ao DNA liberados da membrana, designados de pATF6 α/β (N), vão para o núcleo e ativam a transcrição de genes alvo através da ligação à elementos responsivos ao estresse do RE como: ERSE (*ER stress responsive cis-acting elements*) e ERSE II, UPRÉ (*UPR element*) e UPRÉ II (Yoshida, Haze *et al.*, 1998; Yoshida, Matsui *et al.*, 2001; Yoshida, Okada *et al.*, 2001). O homodímero de ATF6 α ou ATF6 β coopera com o fator de transcrição NF-Y para se ligar a ERSE ou ERSE II e quando ATF6 heterodimeriza com XBP-1, podem se ligar a ERSE II, UPRÉ e UPRÉ II (Yoshida, Matsui *et al.*, 2001; Yamamoto, Yoshida *et al.*, 2004; Yamamoto, Sato *et al.*, 2007). ATF6 clivado e XBP-1 funcionam em vias paralelas induzindo a transcrição de genes que codificam as chaperonas do RE e as enzimas que promovem o dobramento, maturação e secreção, e as proteínas do RE associadas à degradação (Wu, Rutkowski *et al.*, 2007; Yamamoto, Sato *et al.*, 2007).

ATF6 aumenta a expressão de BiP, PDI (*protein disulfide isomerase*) e de EDEM (*ER degradation-enhancing alpha-mannosidase like protein 1*) além de induzir também a expressão

de XBP1 (Yoshida, Matsui *et al.*, 2001). Análise de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) deficientes de ATF6 α e ATF6 β , revelou que ATF6 α , mas não ATF6 β , é necessário para indução transcricional de chaperonas do RE e de componentes do ERAD (Sato, Nakanaka *et al.*, 2011). Embora camundongos deficientes de ATF6 α ou ATF6 β sejam viáveis e férteis sob condições normais de crescimento, o nocaute duplo de ATF6 α/β resulta em letalidade embrionária sugerindo um função de sobreposição entre as isoformas (Yamamoto, Sato *et al.*, 2007). O programa de expressão gênica induzido por ATF6 tem um perfil mais citoprotetor. exemplo disto, inclui a indução de RCAN1 (*regulator of calcineurin 1*) (Belmont, Tadimalla *et al.*, 2008). RCAN1 sequestra calcineurina, que é uma fosfatase-B ativada por cálcio, a qual desfosforila BAD (*Bcl2-antagonist of cell death*), inibindo assim a atividade pró-apoptótica de BAD (Wang, Pathan *et al.*, 1999).

Em contrapartida, outros estudos demonstram que ATF6 parece ter também um papel pro-apoptótico. Em células mioblásticas murinas (C2C12) induzidas a diferenciarem-se, a ativação de ATF6 foi observada em células em processo de morte, ao passo que a inibição de ATF6 aumentou a sobrevivência celular. As vias de PERK e IRE1 não estavam ativadas nas células em processo de morte (Nakanishi, Sudo *et al.*, 2005).

Experimentos mais recentes de super-expressão de ATF6 e de seu dominante negativo em células C2C12, sugerem que ATF6 medeia a apoptose através da inibição específica de Mcl-1 (um fator anti-apoptótico) via ativação de WBP1 (*WW domain binding protein 1*), fazendo com que as células fiquem vulneráveis à apoptose. Estes resultados sugerem que ATF6 pode ter papel importante na transição celular de defesa-própria para destruição-própria durante o estresse do RE causado por transfecção de plasmídeos pGFP-ATF6. Níveis baixos de ATF6 parecem ativar a UPR para a sobrevivência e níveis mais elevados de ATF6 levam a apoptose, caracterizando assim um duplo papel de ATF6 (Morishima, Nakanishi *et al.*, 2011). A indução da apoptose por ATF6 não tem sido amplamente reconhecida e isto pode ser devido ao fato de que ATF6 não induz a apoptose em linhagens mais comumente utilizadas em pesquisas médicas e biológicas (Morishima, Nakanishi *et al.*, 2011).

A (Figura 1) mostra as vias do três sensores da UPR.

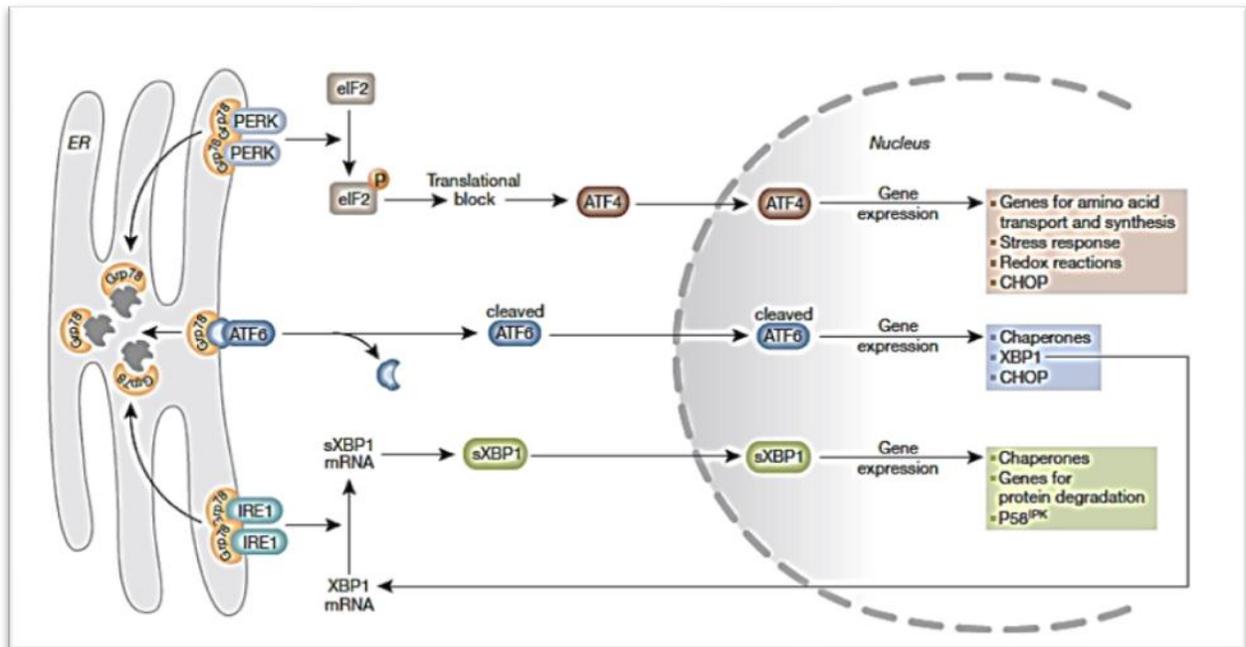


Figura 1: Representação esquemática das três vias da resposta de proteínas mal enoveladas (UPR), Szegezdi et al., 2006.

1.3 – As cinases da subunidade alfa do fator de iniciação da tradução eIF2

Existe uma família de proteínas cinases que fosforilam a subunidade alfa do fator eIF2 em resposta a diferentes condições de estresse celular. Quatro diferentes eIF2- alfa cinases são conhecidas: a GCN2 (*general control non-derepressible-2*) é ativada por tRNA não carregado com a metionina, durante a carência de aminoácidos, resultando na indução de genes relacionados a biossíntese de aminoácidos (Hinnebusch, 1994a; Wek, 1994; Kimball, 2001). PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) é ativada em resposta ao acúmulo de proteínas mal formadas no RE resultando na atenuação da síntese global de proteínas (Shi, Vattem *et al.*, 1998; Ron, 2002). PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*) é ativada por RNA de dupla fita com papel central na resposta imune antiviral induzida pelos interferons (IFNs) resultando na inibição da síntese de proteínas virais e do hospedeiro (Proud, 1995; Clemens,

1996; Liu, Wilkie *et al.*, 1996; Kaufman, 2002). E, por fim, a HRI (*heme-regulated inhibitor*) de expressão predominante em células de linhagem eritrocitária, sobretudo os reticulócitos, é ativada para controlar a síntese de globina em relação à disponibilidade de íons ferro e pelo estresse oxidativo (Chen e London, 1995; Lu, Han *et al.*, 2001; Chen, Benureau *et al.*, 2007).

1.3.1– PERK

A cinase PERK já foi previamente descrita no item 1.2.2 desta introdução.

1.3.2– GCN2

A cinase GCN2 foi originalmente caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae* como uma proteína requerida para o controle das vias de biossíntese aminoácidos e para a tradução do mRNA de GCN4. O tamanho de GCN2 é de aproximadamente 190 kDa e inclui os domínios regulatórios requeridos para atividade catalítica e para o acoplamento de GCN2 a eIF2-alfa (Wek, Ramirez *et al.*, 1990). GCN2 é ativada em condições de deficiência de aminoácidos através da ligação do RNA transportador não carregado com a metionina, a uma região homóloga a histidil-tRNA sintetase (HisRS) localizada na porção carboxi-terminal no domínio cinase da proteína (Wek, Jackson *et al.*, 1989; Hinnebusch, 1994b). Narasimhan e colaboradores (Narasimhan, Staschke *et al.*, 2004), demonstraram em *S.cerevisiae*, que entre os resíduos 1498 e 1659 da extremidade carboxi-terminal de GCN2p ocorre a dimerização entre os polipeptídeos de GCN2 e que esta interação é requerida para a indução da fosforilação de eIF2-alfa e para a tradução de GCN4 em resposta a diferentes condições de estresse.

Um homólogo de GCN2 foi identificado em mamíferos (Berlenga, Santoyo *et al.*, 1999; Sood, Porter, Olsen *et al.*, 2000) sendo também ativado sob condições de carência de aminoácidos (Harding, Novoa *et al.*, 2000). Foram clonados três diferentes cDNAs que codificam isoformas de GCN2 murino derivados de um único gene e apenas variando a sequência na parte amino-terminal. Assim como a GCN2 de leveduras, também foram identificadas as sequências

relacionadas ao domínio HisRS, justapostas ao domínio catalítico da cinase. Além disto, demonstrou-se que a atividade cinase *in vivo* como *in vitro* de GCN2 murina também atua sobre a fosforilação da serina-51 de eIF2-alfa (Sood, Porter, Olsen *et al.*, 2000). O mecanismo de ativação transcricional descrito acima para leveduras parece ser conservado durante a evolução de eucariotos. Em decorrência da deficiência nutricional de aminoácidos, a GCN2 de mamíferos estimula a tradução do mRNA do fator de transcrição ATF4, o qual ativa a transcrição do fator de transcrição CHOP que, por sua vez, controla a expressão de uma série de genes induzidos por estresse (Harding, Novoa *et al.*, 2000). Embora o gene de GCN2 não seja essencial para a viabilidade celular, camundongos deficientes do gene de GCN2 não se adaptam com eficiência em condições de carência de aminoácidos (Zhang, Mcgrath *et al.*, 2002). A carência de aminoácidos em mamíferos é particularmente problemática porque alguns aminoácidos não podem ser sintetizados e conseqüentemente algumas proteínas são degradadas para suprir os aminoácidos essenciais de modo que haja a síntese de novas proteínas essenciais para a sobrevivência. A reciclagem de proteínas não essenciais na musculatura esquelética e em alguns órgãos como o fígado resulta numa perda geral no peso corporal (Adibi, 1976; Kerr, Stevens *et al.*, 1978). A GCN2 de mamíferos regula tanto a função de aumentar a síntese de aminoácidos não essenciais e também um complexo arranjo para lidar e adaptar com a perda de aminoácidos essenciais (Berlanga, Santoyo *et al.*, 1999; Sood, Porter, Ma *et al.*, 2000; Zhang, Mcgrath *et al.*, 2002; Anthony, Mcdaniel *et al.*, 2004; Maurin, Jousse *et al.*, 2005). O fato que a GCN2 de mamíferos é também ativada por outros tipos de estresse como na carência de soro, (Berlanga, Santoyo *et al.*, 1999), irradiação por luz ultravioleta, mediação da sinalização de NF-kB (Deng, Harding *et al.*, 2002), regulação da plasticidade sináptica e memória (Costa-Mattioli, Gobert *et al.*, 2005) sugere fortemente que GCN2 tenha funções importantes nas vias induzidas por diferentes estresses (Berlanga, Ventoso *et al.*, 2006).

Em camundongos selvagens condicionados à deficiência de leucina, a síntese de lipídeos foi reprimida no fígado durante a prolongada carência de leucina, ao passo que a síntese de lipídeos em camundongos nocaute não foi afetada, resultando em esteatose hepática. A incapacidade de reprimir a síntese de lipídeos foi devida à expressão persistente de SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*) e de seus alvos envolvidos na síntese de ácidos

graxos e síntese de triglicérides como a enzima FAS (*fatty acid synthase*) dentre outros (Guo e Cavener, 2007)

Em microambientes de tumor, o desenvolvimento anormal da vasculatura resulta num suprimento de sangue insuficiente o que constitui a principal causa para o desenvolvimento de hipóxia crônica e aguda associado à baixa de glicose e outros nutrientes. Estudos prévios dos autores (Bi, Naczki *et al.*, 2005) mostraram que a ativação de PERK e concomitante fosforilação de eIF2-alfa aumentam a habilidade de células transformadas em sobreviver sob hipóxia tanto *in vitro* como *in vivo*. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que ativação de ATF4 por PERK confere resistência à hipóxia em MEFs (fibroblastos embrionários murinos). Entretanto, a ativação da via GCN2-ATF4-ASNS (*asparagine synthetase*) é que promove a sobrevivência do tumor sob condições de carência de aminoácidos e de glicose. Esta via é ativada em vários tecidos tumorais de camundongos como em humanos sendo que a deficiência desta via, inibe severamente o crescimento do tumor *in vivo* (Ye, Kumanova *et al.*, 2010). A enzima asparagina sintetase catalisa a formação de asparagina através do ácido aspártico sendo que a adição de asparagina ou uma super expressão da enzima reverte a letalidade associada a depleção de ATF4 em células tumorais. (Ye, Kumanova *et al.*, 2010). Os resultados obtidos por estes autores tem grande importância para novas terapias para o câncer. O entendimento das vias de estresse e da regulação destas vias pode contribuir para o tratamento com uma combinação de drogas que são mais efetivas para o combate ao câncer. Regimes quimioterápicos que induzem uma limitação nutritiva ou estresse do retículo, combinado a outros que inibem especificamente componentes da via ISR (*integrated stress response*) podem ser bastantes promissores e efetivos no combate ao câncer (Wek e Staschke, 2010).

Um importante estudo no contexto de hipóxia em MEFs selvagens e nocautes de PERK e GCN2, demonstrou que tanto GCN2 como PERK participam da adaptação ao estresse hipóxico. Altos níveis da fosforilação de eIF2-alfa levam a uma parada no ciclo celular na fase G1 protegendo as células de indução da apoptose devido a hipóxia. Entretanto, a redução da fosforilação de eIF2-alfa pela deleção de PERK ou GCN2 leva a supressão da parada no ciclo na fase G1 bem como a indução da apoptose e consequente ativação da cascata de sinalização de p53. O bloqueio de eIF2-alfa inibe a parada do ciclo em G1 mas não promove a apoptose, o

que leva a uma proposta de que os níveis de fosforilação de eIF2-alfa podem regular a parada em G1 ou ocasionar a apoptose sob condições de hipóxia (Liu, Laszlo *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que em MEFs deficientes de GCN2 ou que apresentam uma mutação no sítio de fosforilação de eIF2-alfa (Ser51Ala) não ocorre a ativação de NF-κB induzida por luz UV. A ausência da fosforilação de eIF2-alfa por GCN2 não levará à diminuição da síntese protéica global, incluindo a síntese de IκB-alfa (repressor de NF-κB). A diminuição na tradução do mRNA de IκB-alfa contribui para a ativação de NF-κB, (Jiang e Wek, 2005). MEFs deficientes de GCN2 e expostos a luz UV programam a apoptose de maneira similar às células com deleção da subunidade RelA/p65 de NF-κB. Isto demonstra que GCN2 tem papel central no reconhecimento ao estresse causado por UV e que a fosforilação de eIF2-alfa promove a resistência a apoptose em resposta a irradiação por luz UV (Jiang e Wek, 2005).

Vários estudos têm evidenciado o papel de GCN2 como um mediador inicial da resposta celular a vírus de RNA. Apesar da cinase PKR desempenhar um papel chave na resposta do hospedeiro mediada pela ativação de interferon contra vários vírus (Balachandran, Roberts *et al.*, 2000; Stojdl, Abraham *et al.*, 2000), um número crescente de estudos tem demonstrado que PKR não é a única cinase que antagoniza infecções virais (Abraham, Stojdl *et al.*, 1999; Zhou, Paranjape *et al.*, 1999). Utilizando fibroblastos murinos e deficientes de GCN2, Berlanga e colaboradores demonstraram que GCN2 inibe a tradução inicial do RNA do vírus Sindbis e que os fibroblastos nocaute de GCN2 foram mais permissivos à infecção do vírus Sindbis e do vírus para estomatite vesicular (Berlanga, Ventoso *et al.*, 2006).

1.3.3 – PKR

A proteína cinase PKR foi originalmente identificada como um sensor a patógeno viral e regulador da resposta immune inata contra infecções virais em eucariotos (Clemens, 1996) . PKR é uma serina-treonina cinase induzida por interferons do tipo I (Samuel, 1993; Stark, Kerr *et al.*, 1998). Vírus de RNA dupla fita são reconhecidos por ligação aos domínios de ligação a RNA de dupla fita localizados na porção amino terminal de PKR, resultando numa autofosforilação intramolecular do domínio cinase (Williams, 2001; Garcia, Gil *et al.*, 2006). PKR inibe a síntese de proteínas celulares e virais através da fosforilação da subunidade alfa do fator eIF2. PKR também contribui para uma série de respostas celulares incluindo transdução do sinal, crescimento celular e apoptose (Kumar, Srivastava *et al.*, 1999; Donze, Deng *et al.*, 2004; Scheuner, Patel *et al.*, 2006). Por exemplo, foi demonstrado que a indução do estresse do RE por taspigargina induz a ativação de PACT (*PKR activation protein*) resultando na ativação de PKR seguido da ativação de uma via apoptótica via eIF2-alfa/ATF4/CHOP independente de sinalização de PERK em eventos apoptóticos (Lee, Yoon *et al.*, 2007) . Recentemente foi demonstrado por Nakamura e cols., (2010) que PKR pode agir conjuntamente com as principais cinases de processos inflamatórios como exemplo a JNK, e diretamente interagir com componentes críticos da sinalização de insulina como na regulação da fosforilação de IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), sugerindo um forte papel de PKR na integração do mecanismo de reconhecimento a patógeno, resposta imune inata com a ação da insulina e vias metabólicas críticas nas doenças metabólicas crônicas (Nakamura, Furuhashi *et al.*, 2010) .

1.3.4 – HR1

HR1 (*heme regulated inhibitor*) é expressa predominantemente em células de linhagem eritrocitária. A função de HR1 está associada à regulação da síntese de globinas e heme (grupo prostético da hemoglobina) através da ligação de dois domínios heme localizados na porção amino terminal e no domínio cinase de HRI (Chen, Crosby *et al.*, 1994). Na deficiência de heme, a inibição da síntese de proteínas é correlacionada à ativação de HRI (Clemens, 1996). O heme ligado ao domínio amino terminal é estável e co-purificado com HR1. Todavia, o heme ligado ao domínio cinase inibe a atividade de HR1 de modo dependente da concentração intracelular de heme (Chefalo, Oh *et al.*, 1998; Rafie-Kolpin, Chefalo *et al.*, 2000). Os níveis do mRNA de HR1 aumentam durante a diferenciação de células da linhagem eritrocitária de camundongo (Crosby, Lee *et al.*, 1994), porém pequenas quantidades do mRNA de HRI foram encontradas em células de linhagem não eritrocitária. Entretanto, nenhuma evidência da expressão da proteína de HRI foi relatada (Mellor, Flowers *et al.*, 1994; Berlanga, Herrero *et al.*, 1998). Recentemente, foi demonstrado que a regulação da tradução do mRNA por HRI é essencial para reduzir a síntese excessiva de globinas e nas severidades fenóticas, nas anemias de deficiência de ferro, protoporfiria eritropoiética e beta-talassemia, sendo HRI responsável pela hipocromia dessas três anemias (Han, Yu *et al.*, 2001; Chen, 2007).

1.4 – O envolvimento do Retículo Endoplasmático na morte celular programada

A principal função da UPR é impedir que a célula sofra com os danos causados pelo estresse do retículo endoplasmático (RE). A UPR tem o papel de restabelecer a função normal do RE através da atenuação da tradução, aumentando a capacidade de dobramento de proteínas do RE pela ativação de chaperonas do RE e pelo aumento da degradação de proteínas mal enoveladas através do programa de degradação do RE (ERAD). Entretanto, se a UPR não consegue restabelecer a homeostase celular, ocorrerá a ativação de vias apoptóticas (Eizirik, Cardozo *et al.*, 2008; Zhang e Kaufman, 2008b). Muitas vias podem ter papel importante na morte celular causada pelo estresse do RE. A sinalização através de PERK, ATF6 e IRE1 pode induzir sinais pro-apoptóticos através da ativação de moléculas alvo como CHOP, JNK ou membros da família de proteínas Bcl-2 (Szegezdi, Logue *et al.*, 2006; Tabas e Ron, 2011). Por outro lado, tem sido demonstrado que o estresse do RE pode também induzir a morte celular através da ativação de vias alternativas na autofagia (Yorimitsu, Nair *et al.*, 2006). Estes diferentes tipos de morte celular induzidos por eventos de estresse no RE, serão discutidos próximos itens.

1.4.1 – Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada, com mínima ativação do sistema imune tendo papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção dos organismos. A apoptose também está envolvida na formação de tecidos, no desenvolvimento do sistema imune e na manutenção da homeostase uma vez que permite a eliminação de células e tecidos lesados (Kerr, Wyllie *et al.*, 1972). A apoptose é um programa de morte celular que se caracteriza por condensação do citoplasma e núcleo, fragmentação do DNA, posicionamento da cromatina na periferia do núcleo, contração celular, alterações na membrana, formação de vesículas denominadas corpos apoptóticos e remoção dos fragmentos

celulares por fagócitos, sem haver perturbação das células (Robertson, Bird *et al.*, 1978; Wyllie, Kerr *et al.*, 1980; Savill e Fadok, 2000). Organelas como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e as mitocôndrias são fragmentadas (Frank, Gaume *et al.*, 2001; Lane, Lucocq *et al.*, 2002). Esta fragmentação não atinge apenas estruturas da célula, mas também moléculas como o DNA e proteínas. Sabe-se que a clivagem de proteínas durante a apoptose é realizada, principalmente, por caspases (Nicholson, 1999; Creagh, Conroy *et al.*, 2003). As caspases são proteases do grupo das cisteínas, altamente conservadas ao longo da evolução, que apresentam especificidade pelo ácido aspártico e desempenham papel central no processo de morte celular (Tait, 2008). São comumente agrupadas de acordo com suas funções; sendo as caspases 8,9,10 responsáveis pelo início das reações e as caspases 3,6,7 pela execução e ativação das vias apoptóticas (Huerta, Goulet *et al.*, 2007). A ativação das caspases ocorre tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. A via extrínseca é mediada por receptores específicos de morte celular (Fas, FADD, TRAF, TNFRSF, CD40) que se ligam a diferentes ligantes, como TNF, TRAIL, FasL, CD40L. A associação ligante/receptor ativa as caspases 8 e 10, que por sua vez clivam e ativam as caspases 3, 6 e 7. Por outro lado, a via intrínseca ou mitocondrial é iniciada pela liberação do Citocromo C da mitocôndria para o citosol, iniciando uma cascata de eventos que culminam na formação de estruturas conhecidas por apoptossomos. Estas estruturas clivam e ativam Caspase-9, que leva a ativação novamente das caspases 3, 6 e 7, induzindo a célula à apoptose (Huerta, Goulet *et al.*, 2007). Essas caspases também podem ser ativadas por uma via dependente de granzima B, uma protease presente em grânulos de linfócitos T citóxicos e células NK (Anthony, Andrews *et al.*). Além da granzima B, os grânulos contêm uma proteína formadora de poros, a perforina, que se polimeriza na membrana das células alvo formando poros e permitindo a entrada da granzima (Masson e Tschopp, 1985; Podack, Young *et al.*, 1985). Após entrar na célula, a granzima B cliva seus substratos, entre eles BID, Caspases 3 e 7, dando início à apoptose (Adrain, Murphy *et al.*, 2005).

Vários grupos têm procurado elucidar vias específicas de ativação de caspases responsáveis pela indução do programa apoptótico sob condições de estresse do RE (Masud, Mohapatra *et al.*, 2007). Evidências emergem no sentido de existir um *cross-talk* entre o RE e a mitocôndria (Li, Lee *et al.*, 2006). É sabido que a depleção ou o efluxo de Ca^{2+} é um componente crítico da via de apoptose tendo a participação de membros da família Bcl-2 incluindo Bax e Bak tanto

na membrana do RE como da mitocôndria (Demaurex e Distelhorst, 2003; Scorrano, 2003; Scorrano, Oakes *et al.*, 2003). Outros grupos relataram o envolvimento das caspases iniciadoras (2, 8 e 9) e efetoras (3 e 7) na apoptose induzida pelo estresse do RE (Masud, Mohapatra *et al.*, 2007). O estresse do RE leva a clivagem da Caspase 12 murina que age como uma caspase iniciadora sendo que em humanos, a Caspase 4 tem papel similar à Caspase 12 em murinos. Estas duas caspases 4 e 12, estão localizadas no lado citoplasmático da membrana do RE (Nakagawa e Yuan, 2000; Rao, Hermel *et al.*, 2001). A Caspase 12 pode ser controlada pela via IRE1 α /TRAF2 (Yoneda, Imaizumi *et al.*, 2001), pela Calpaína (Nakagawa e Yuan, 2000) ou Caspase 7 (Rao, Hermel *et al.*, 2001), ou induzida por ATF6 (Larner, Hayes *et al.*, 2006). Uma vez clivada, a Caspase 12 pode diretamente processar a Caspase 9 ou clivar Bap31 (Rao, Ellerby *et al.*, 2004; Groenendyk e Michalak, 2005) resultando na permeabilização mitocondrial e liberação de Citocromo C o qual liga-se a Apaf-1, que por sua vez leva a clivagem da Caspase 3 (Earnshaw, Martins *et al.*, 1999). Em contrapartida, outros estudos indicaram que a clivagem da Caspase 9 mediada pela Caspase 12 pode ser independente das vias de Apaf-1 e Citocromo C (Morishima, Nakanishi *et al.*, 2002; Rao, Castro-Obregon *et al.*, 2002).

Existe também um debate sobre o papel da Caspase 12 devido aos diferentes resultados obtidos em camundongos nocaute e células destes animais frente a diferentes estímulos de morte. Os experimentos indicam o envolvimento específico da Caspase 12 na apoptose induzida pelo estresse do RE. Entretanto, na apoptose induzida por agentes que não ativam a via apoptótica do RE, não ocorre o envolvimento da Caspase 12 (Nakagawa, Zhu *et al.*, 2000). Outros grupos também postularam a indução da apoptose causada pelo estresse do RE com envolvimento da Caspase 8 (Jimbo, Fujita *et al.*, 2003) e subsequente clivagem de Bap31 (Hu, Han *et al.*, 2006; Liu, Scofield *et al.*, 2006) e outros indicam a Caspase 2 como uma caspase de iniciação (Dahmer, 2005; Cheung, Lynn Kelly *et al.*, 2006). Sob condições fisiológicas normais, a apoptose induzida na UPR pode ser uma maneira de eliminar as poucas células num ambiente de estresse do RE que permaneceram incorretas apesar das ações reparadoras da UPR. *In vivo*, ainda não se sabe quais as caspases são requeridas na apoptose induzida pelo estresse do RE (Masud, Mohapatra *et al.*, 2007; Tabas e Ron, 2011). Em contraste a estes cenários de limitada apoptose e apoptose seletiva, o estresse crônico e persistente do RE pode induzir a apoptose que está diretamente relacionada a várias patologias incluindo doenças neurodegenerativas,

diabetes, aterosclerose e doenças renais (Kaufman, 2002). A (Figura 2) mostra um esquema de ativação e integração de vias do estresse do RE na apoptose.

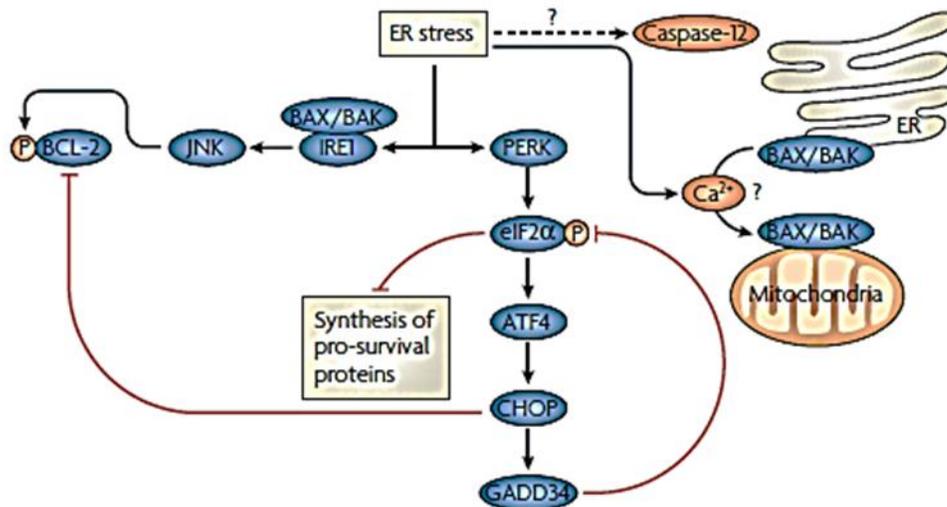


Figura 2: Integração das vias de apoptose no estresse do RE (Ron & Walter, 2007).

Dentre os principais mecanismos que são ativados sob estresse prolongado do RE mais uma vez torna-se importante destacar a importância de IRE1 e CHOP.

A ativação prolongada de IRE1 pode promover a apoptose. Estudos com cultura de células sob estresse prolongado identificaram a via pro-apoptótica IRE1-TRAF2-JNK. IRE1 fosforilado associa-se com TRAF2 para modular a atividade da via de JNK através de cinase (*MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)* ASK1) que fosforila JNK e controla apoptose através da ativação da Caspase 12. ASK1 é provavelmente ativada por AIP1 (Ron e Walter, 2007). A indução da apoptose via JNK pode envolver membros pro-apoptóticos da família de Bcl-2 tais como Bax e Bak que por sua vez podem amplificar a sinalização de IRE1 (Hetz, Bernasconi *et al.*, 2006). Além disto, a ativação prolongada de IRE1 também leva à ativação da via RIDD que pode promover a apoptose através da degradação de mRNAs que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência, incluindo o fator de transcrição XBP-1 (Hollien e Weissman, 2006; Hollien, Lin *et al.*, 2009).

A (Figura 3) resume como a ativação prolongada do IRE1 pode levar a apoptose.

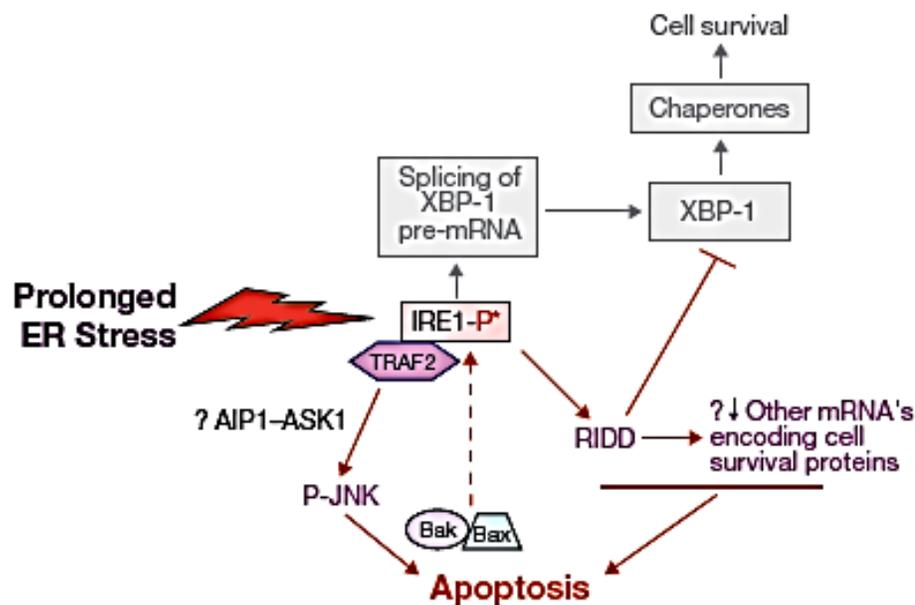


Figura 3: Representação esquemática das vias apoptóticas de IRE1 sob estresse prolongado do retículo endoplasmático (Tabas & Ron, 2011).

A ativação prolongada de CHOP pode promover a apoptose. Estudos com camundongos deficientes de CHOP estabeleceram um papel importante desta proteína na apoptose induzida pelo estresse do RE em vários modelos de doenças, incluindo disfunção renal (Zinszner, Kuroda *et al.*, 1998), diabetes (Oyadomari, Araki *et al.*, 2002), (Song, Scheuner *et al.*, 2008), doença de Parkinson (Silva, Ries *et al.*, 2005), dentre outras, todavia, os mecanismos moleculares são pouco compreendidos.

Um dos mecanismos mais citados da indução da apoptose via CHOP é pela supressão de Bcl-2. Estudos correlacionam a expressão de CHOP com o estresse oxidativo, apoptose e diminuição dos níveis de Bcl-2 em fibroblastos murinos transfectados com CHOP. Além disto, a restauração genética de Bcl-2 protege as células transfectadas com CHOP do estresse oxidativo

e da apoptose. O mecanismo deve estar relacionado a habilidade de CHOP de interagir com um ou mais repressores transcricionais para diminuir a transcrição de Bcl-2 (McCullough, Martindale *et al.*, 2001). Bcl-2 leva a sobrevivência celular através da inibição de proteínas do tipo *BH3-only* tais como Bad, Bim e Puma, as quais são necessárias para Bax-Bak causarem a permeabilização da membrana da mitocôndria e a apoptose (Cheng, Wei *et al.*, 2001). O papel de Bax na apoptose induzida por CHOP foi também mostrado em camundongos nocaute de CHOP, sendo os níveis de Bax aumentados de maneira CHOP dependente (Fu, Okada *et al.*, 2010). Em relação a Bim, os níveis são aumentados no estresse do RE devido a diminuição da degradação por proteassomo e pela indução gênica via CHOP-C/EBP α (Puthalakath, O'reilly *et al.*, 2007). Um outro mecanismo com implicação na indução da apoptose via CHOP é devido ao estresse oxidativo. O estresse prolongado do RE leva a hiperoxidação do lúmen do RE o que pode resultar na liberação de H₂O₂ para o citoplasma e provocar a indução de espécies reativas ao oxigênio (ROS) no citoplasma. A oxidação no lúmen do RE é induzida pela atividade transcricional de CHOP que alveja uma oxidase do RE chamada de ERO1 α (Marciniak, Yun *et al.*, 2004). Na fisiologia normal ERO1 promove a formação de pontes dissulfeto em novas proteínas traduzidas. Em estresse prolongado, ERO1 pode promover um ambiente de super oxidação que leva a morte celular (Marciniak, Yun *et al.*, 2004).

Dados recentes *in vitro* e *in vivo* mostraram que a apoptose induzida por CHOP envolve a ativação de vias pró-apoptóticas para a sinalização do cálcio. O cálcio citoplasmático leva a apoptose pela ativação da cinase CaMKII (*calcium sensing kinase*), a qual ativa várias vias de apoptose. Esta ativação de CaMKII foi observada em vários tipos celulares expostos a diferentes tipos de estresse e em camundongos tratados com tunicamicina. A indução de ERO1 α via CHOP ativa o canal de liberação de cálcio IP3R1 no RE, que é crucial para os eventos de sinalização elicitados pelo cálcio citoplasmático (Li, Mongillo *et al.*, 2009; Timmins, Ozcan *et al.*, 2009; Li, Scull *et al.*, 2010). Dentre outras moléculas induzidas por CHOP com implicações na apoptose podemos citar a fosfatase GADD34, o receptor de morte (DR5; TRAIL-R2) e a proteína TRB3 (*Tribbles-related protein 3*). DR5 é um mediador da morte induzida pelo estresse do RE em vários tipos de células tumorais e TRB3 é necessária para uma completa resposta apoptótica em células 293 e Hela expostas a tunicamicina (Yamaguchi e Wang, 2004; Ohoka, Yoshii *et al.*, 2005).

A Figura 4 resume como a ativação prolongada de CHOP pode levar a apoptose.

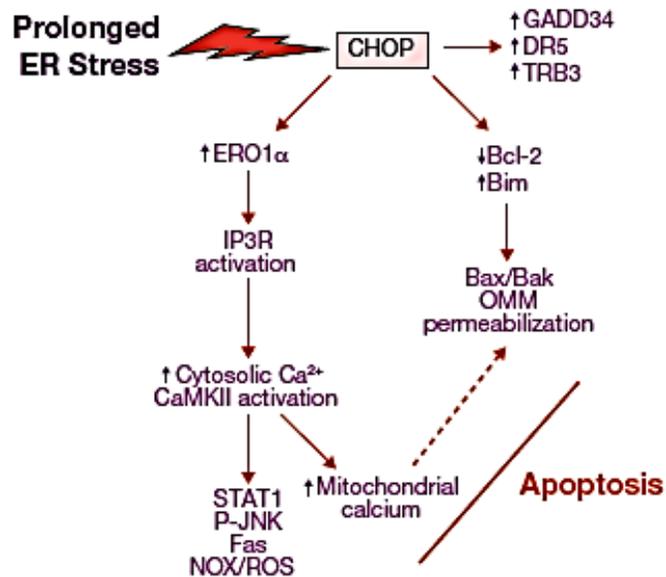


Figura 4: Representação esquemática das vias apoptóticas de CHOP sob estresse prolongado do retículo endoplasmático (Tabas & Ron, 2011).

1.4.2 – Autofagia

Em eucariotos, os dois principais sistemas de degradação proteica são pelo proteassomo (realizadas pelas ubiquitinas) e pelo lisossomo. Eles diferem com relação às funções e aos tipos de substratos que vão degradar. No sistema de lisossomo, a degradação de materiais extracelulares é mediada pela endocitose (heterofagia) e a degradação de componentes intracelulares é mediada por três tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas, as quais diferem entre si pelo modo que os materiais são transportados para o lisossomo. Na microautofagia, o conteúdo é diretamente absorvido pelos lisossomos pelo processo de invaginação da membrana e na autofagia mediada por chaperonas, o conteúdo liga-se diretamente a proteína Hsc70 e suas-co-chaperonas. Este complexo depois se liga a proteína LAMP2 na superfície do lisossomo onde é transportado para dentro desta organela (De Duve e Wattiaux, 1966; Seglen e Bohley, 1992; Ohsumi, 2001; Cuervo, 2004; Levine e Klionsky, 2004; Meijer e Codogno, 2004; Mizushima, Levine *et al.*, 2008). Descreveremos, a seguir, a macroautofagia (que será denominada de autofagia) onde ocorre a formação de autofagossomos.

A autofagia é um processo de degradação celular de proteínas de vida longa e de organelas em excesso ou danificadas. Ao contrário do sistema de proteassomos, a autofagia é o único sistema que consegue degradar organelas como a mitocôndria (Levine e Klionsky, 2004; Lum, Deberardinis *et al.*, 2005; Yorimitsu e Klionsky, 2005). Durante a autofagia, vesículas com dupla membrana são formadas e são denominadas de autofagossomos, ou vacúolo autofágico. Os autofagossomos carregam proteínas citosólicas e/ou organelas e depois se fundem com a membrana lisossomal (vesículas endolisossômicas) originando o autolisossomo. Após a fusão os conteúdos são liberados no lúmen do autolisossomo e são degradados por hidrolases residentes, sendo as macromoléculas resultantes recicladas (Klionsky, 2005; Yorimitsu e Klionsky, 2005). Este processo é ubíquo nos eucariotos, de leveduras até os mamíferos, sendo essencial para o desenvolvimento celular normal e diferenciação (Levine e Klionsky, 2004; Mizushima, 2005). A autofagia ocorre em níveis basais, mas pode ser induzida dependendo do contexto e do tipo celular. Em levedura e mamíferos, durante a depleção de nutrientes, a maquinaria autofágica pode servir como uma fonte alternativa de macromoléculas e energia,

aumentando assim as chances de sobrevivência das células durante o estresse causado pela depleção de nutrientes (Lum, Deberardinis *et al.*, 2005; Sarbassov, Ali *et al.*, 2005). Conforme previamente mencionado, o ERAD é um mecanismo primário de degradação para proteínas mal enoveladas que se acumulam no estresse do RE. Alguns autores acreditam que a autofagia pode funcionar como um mecanismo de *back up* de degradação caso o ERAD não seja suficiente para lidar com a carga de proteínas mal enoveladas via degradação pelo proteassomo (Friedlander, Jarosch *et al.*, 2000; Spear e Ng, 2003; Yorimitsu, Nair *et al.*, 2006). A autofagia é frequentemente ativada em resposta a diferentes estresses e já foi demonstrado que tem participação em muitos processos fisiológicos e patológicos tais como em doenças neurodegenerativas (Cuervo, 2004; Ravikumar, Vacher *et al.*, 2004; Iwata, Christianson *et al.*, 2005). A autofagia também pode ter papel na supressão de tumores possivelmente pela remoção de organelas danificadas e pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio. Além disto, a autofagia está envolvida na resposta imune do hospedeiro à invasão de bactérias e patógenos virais (Shintani e Klionsky, 2004; Levine, 2005).

Estudos recentes demonstraram que o estresse do RE pode induzir a morte celular por vias alternativas da autofagia embora os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da autofagia não estejam completamente elucidados (Novikoff e Shin, 1978; Yorimitsu, Nair *et al.*, 2006). A interrelação entre a autofagia e a apoptose parece ser bem complexa. Quando o RE está sujeito ao estresse tanto a apoptose como a autofagia podem ser afetadas. É amplamente aceito que o estresse do RE resulta tanto na apoptose como na autofagia, entretanto, vários fatores podem resultar numa escolha preferencial entre um cascata de ativação que resultará no aumento da autofagia ou da apoptose. Em condições normais, a regulação da morte celular pode ser um balanço entre a apoptose e a autofagia basal (Moretti, Cha *et al.*, 2007). Estes autores acreditam que as vias de IRE1 e PERK podem estar relacionadas na escolha entre a apoptose e autofagia. Sob várias condições do estresse do RE, IRE1 pode ter um efeito diminuído em Bak/Bax, mas aumentando preferencialmente as subvias de JNK. Existem evidências que JNK, um componente da via de IRE1, pode estar diretamente envolvido na promoção da autofagia, pelo menos na fase inicial do estresse do RE. A via de PERK pode ser um componente importante na regulação da morte celular, tendo estreita relação com o tempo de fosforilação de eIF2 que pode determinar se o destino da

célula irá ativar a autofagia via complexo ATG5-ATG12/LC3 ou a apoptose via ATF4/CHOP com ativação de caspases (Moretti, Cha *et al.*, 2007).

Existem importantes questões a serem respondidas nas futuras investigações que possam determinar mais detalhadamente a escolha entre a autofagia e a apoptose. Indústrias farmacêuticas vem propondo uma otimização no tratamento de câncer através do aumento da sensibilidade aos efeitos da radiação e da autofagia. Estes produtos serão incluídos em novos estudos clínicos na tentativa de se obter melhores resultados na morte celular por autogia. (Moretti, Cha *et al.*, 2007).

1.4.3 - Necrose

A necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular e perda da integridade da membrana plasmática. Isto leva à liberação do conteúdo celular no espaço extracelular adjacente seguido de indução da resposta inflamatória. Apesar de ser normalmente tida como um processo descontrolado e acidental, estudos demonstram que a necrose é controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (Festjens, Vanden Berghe *et al.*, 2006; Golstein e Kroemer, 2007). Frequentemente, o mesmo tipo de dano pode induzir apoptose ou necrose sendo que o tipo de morte predominante dependerá do tipo e da severidade do dano, do tipo celular e do contexto celular. Exemplo disto, TNF induz a morte por apoptose na maioria de linhagens de células, mas na linhagem L929 um fibrosarcoma murino, TNF induz a necrose (Vercammen, Vandenabeele *et al.*, 1997). A morte por necrose é prevalente no núcleo de regiões isquêmicas mas nas regiões adjacentes onde o suprimento de oxigênio e depleção de energia são menos prolongados, a morte por apoptose é mais comumente observada (Charriaut-Marlangue, Margail *et al.*, 1996).

A morte celular por necrose pode ocorrer em células neuronais devido a super ativação de receptores de glutamato causado pelo excesso de neurotransmissores como NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), AMPA (*2-amino-3propionate*) dentre outros. As espécies reativas de oxigênio ROS que podem ser geradas por exemplo, na mitocôndria e no RE podem causar danos a

macromoléculas como o DNA, proteínas e lípidos. O estresse oxidativo é frequentemente associado a uma variedade de fisiopatologias incluindo inflamação, apoptose, necrose e choque séptico, além de isquemia por reperfusão e doenças neurodegenerativas (Schulz, Matthews *et al.*, 1997; Halestrap, Kerr *et al.*, 1998; Gutteridge e Mitchell, 1999).

1.5 - Os Salicilatos

Os povos antigos, assírios e egípcios já tinham conhecimento de que o extrato da casca de salgueiro possuía efeito analgésico para dores nas articulações. O Reverendo Edward em 1763, foi a primeira pessoa que utilizou o extrato da casca de salgueiro, em estudos clínicos, para o tratamento da dor e da febre. No início do século XIX, a salicilina foi extraída da casca do salgueiro e purificada. Embora em 1853 o químico francês, Charles Gerhardt tenha sido o primeiro a sintetizar o ácido acetil salicílico, isto permaneceu ignorado até que em 1897 Felix Hoffmann redescobriu a fórmula para sintetizar o ácido acetil salicílico e testou em seu pai que sofria de artrite reumatóide. Felix Hoffmann, ganhou com isto, reconhecimento mundial por ter utilizado este composto para o tratamento da dor e artrite. Em seguida, Felix Hoffmann convenceu a companhia farmacêutica Bayer a comercializar este novo fármaco, sendo então patenteada pela Bayer, em 1900, como Aspirina (Levesque e Lafont, 2000).

Os salicilatos compreendem uma família de fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINES) que são divididos em dois grupos: acetilados e não acetilados. No grupo dos acetilados está o ácido acetil salicílico (ASA). No grupo dos não acetilados pode se citar o salicilato de sódio, clonixinato de lisina, benorilato, diflunisal, salicilamida, etersalato, e salsalato.

Em 1971, John Vane em seu clássico experimento, incubou extrato de pulmão de cobaias com ácido araquidônico e diferentes concentrações de aspirina, indometacina ou salicilato de sódio. Com esse ensaio, ele descobriu que esses fármacos bloqueavam a síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxigenase (COX), a enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandina (Vane, 1971). Dois outros experimentos deram suporte adicional ao achado de Vane. No primeiro, Smith e Willis em 1971 obtiveram amostras de sangue de voluntários antes e depois de ingerirem 600 mg de aspirina. As plaquetas foram isoladas, lavadas e incubadas com trombina. Neste experimento foi observado que as plaquetas de amostras na presença de aspirina não se agregavam e liberavam menos prostaglandina do que nos voluntários que não receberam aspirina (Smith e Willis, 1971). No segundo experimento, Ferreira, Vane e colaboradores (Ferreira, Moncada *et al.*, 1971) demonstraram

que a aspirina ou indometacinana bloqueavam a liberação de prostaglandina em um baço perfundido de cão submetido à estimulação de nervos simpáticos (Botting, 2010). Contudo, demonstrou-se que a aspirina bloqueia de maneira irreversível a atividade das ciclooxigenases através da acetilação específica de resíduos de serina (Ser 530) impedindo assim o acesso ao sítio de ligação no resíduo de tirosina (Tyr 385) dessas proteínas ao ácido araquidônico (Simmons, Botting *et al.*, 2004).

O salicilato de sódio é um inibidor, relativamente fraco, das ciclooxigenases; porém, é capaz de suprimir processos inflamatórios em doses comparáveis as do ASA (Vane, 1971; Vane e Botting, 2003).

A isoforma COX-1 possui expressão constitutiva, expressa em quase todos os tecidos, dependendo somente da disponibilidade do substrato. A COX-1 mantém a produção de prostaglandina que protege a mucosa gastrointestinal e regula o fluxo sanguíneo renal (Tegeeder, Pfeilschifter *et al.*, 2001). Interessante salientar que baixas doses terapêuticas diárias (75 mg) de aspirina são usadas na prevenção de ataques no coração e acidente vascular cerebral. A isoforma COX-2 foi descoberta em 1991, sendo codificada por um gene diferente de COX-1 e tem sua expressão induzida *in vitro* por fatores pró-inflamatórios como LPS de bactérias, citocinas liberadas de macrófagos como a Interleucina-1 e também por mitógenos e fatores de crescimento (Xie, Chipman *et al.*, 1991; Kujubu e Herschman, 1992). O salicilato de sódio pode ser um inibidor efetivo da atividade de COX-2. Foi demonstrado em células humanas A549 (epitélio pulmonar humano) que o salicilato de sódio pode inibir COX-2 em concentrações menores do que as exigidas para a inibição da ativação de NF- κ B (20 mg/ml), sendo facilmente deslocado do sítio de ação em COX-2 quando altas concentrações de ácido araquidônico exógeno é fornecido a estas células (Mitchell, Saunders *et al.*, 1997). A COX-2 tem sua expressão aumentada em tecidos periféricos e nas lesões da medula espinhal levando a uma produção elevada de prostaglandina, acima dos níveis farmacológicos normais. A prostaglandina também contribui para o crescimento de tumores através da inibição da apoptose (Sheng, Shao *et al.*, 1998) induzindo, assim, a formação de vasos sanguíneos que mantém o tumor (Tsuji e Dubois, 1995; Masferrer, Leahy *et al.*, 2000). A inibição de COX pode, em parte, explicar a atividade antitumoral de alguns AINES. Todavia, algumas evidências sugerem que os AINES também modulam as vias de transdução de sinais

independentes de COX que podem estar envolvidas com os efeitos anti-inflamatórios e antitumorais dessas drogas (Shiff, Qiao *et al.*, 1995; Mccracken, Wechter *et al.*, 1996; Zhang, Morham *et al.*, 1999). É também conhecido que os salicilatos podem inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B através da ligação ao seu ativador IKK-beta (*I κ B kinase B*) levando assim a um bloqueio da expressão de genes pró-inflamatórios (Kopp e Ghosh, 1994; Pierce, Read *et al.*, 1996). Os salicilatos, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias e anti-proliferativas, apresentam também efeitos anti-diabetogênicos, diminuindo as concentrações de glicose no sangue (Ebstein, 1877; Williamson e Lond, 1901; Reid, Macdougall *et al.*, 1957; Gilgore e Rupp, 1961; Baron, 1982).

1.5.1– O potencial terapêutico dos salicilatos em diversas doenças e suas ações sobre as vias de sinalização intracelular

Os salicilatos têm efeitos significativos sobre a homeostase celular e são amplamente utilizados em programas preventivos para várias patologias e em terapias clínicas sobretudo na inflamação e no câncer (Amann e Peskar, 2002). Existem poucos dados na literatura em relação a biodistribuição do salicilato (no nível tecidual e celular) o que na realidade representaria a real concentração do salicilato nos locais de ação (Amann e Peskar, 2002). A diferença entre os dois tipos de efeitos (dependente e independente de ciclooxigenases) está na faixa de concentrações utilizadas, ou seja, entre 1 e 5 mM NaSal inibe as enzimas COX e entre 5 e 20 mM Nasal exerce influência em certas vias de transdução de sinais e com ações inibitórias em vários fatores de transcrição (Tegeder, Pfeilschifter *et al.*, 2001).

A inibição de NF- κ B pelos salicilatos é devido a ligação de NaSal ao sítio de ligação ao ATP de IKK-beta (*inhibitor κ -B kinase*), impedindo assim a fosforilação e degradação de I κ B (subunidade inibitória de NF- κ B), com conseqüente impedimento da liberação da translocação de NF- κ B para o núcleo (Kopp e Ghosh, 1994; Pierce, Read *et al.*, 1996). NaSal também interfere nas vias de sinalização das MAPKs (*mitogen activated protein kinases*). Em vários estudos de Schwenger e colaboradores foi demonstrado que em fibroblastos humanos normais FS-4, NaSal bloqueou a ativação das ERK p42/p44 e JNK em resposta ao tratamento por TNF,

mas não em resposta ao tratamento por EGF (fator de crescimento epidérmico) (Schwenger, Skolnik *et al.*, 1996; Schwenger, Bellosta *et al.*, 1997). Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento com NaSal apenas causou a ativação de p38 MAPK mas não de JNK (Schwenger, Bellosta *et al.*, 1997). Ademais, em células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e COS-1 (rim de macaco africano verde) foi demonstrado que a ativação de p38 por NaSal é essencial para inibir a ação de TNF na indução da degradação e fosforilação de I κ B α (Schwenger, Alpert *et al.*, 1998). Em 1999 estes mesmos autores demonstraram que em células COS-1 e HT-29, o tratamento com NaSal, causou a ativação de JNK inibindo simultaneamente a ação mais potente de TNF de ativar JNK. Foi verificado que a ativação de p38 e JNK parece ser uma característica única da aspirina e NaSal, uma vez que esta ativação não foi observada com outros anti-inflamatórios não esteróides (Schwenger, Alpert *et al.*, 1999). Devido a essas mudanças, sobretudo às relacionadas com NF- κ B e as cinases JNK, p38, que são críticos durante a carência de soro que leva a indução da apoptose, o tratamento com NaSal pode ter efeitos proapoptóticos também com a participação destas vias (Kiss, Kiss *et al.*, 2004). Em células PC12 (*rat phaeochromocytoma*) tratadas com NaSal ocorre a inibição da ligação de NF- κ B ao DNA, com conseqüente indução da morte celular por apoptose (Kiss, Kiss *et al.*, 2004). A ativação de JNK e p38 conjuntamente com a inibição de ERK parece ser crítica para a indução da apoptose em células PC-12 carenciadas de fatores de crescimento (Xia, Dickens *et al.*, 1995).

Em células humanas de câncer colorretal (HT-29) e em modelos *in vivo* de camundongos transplantados com tumores de cólon ou células HT-29, foi demonstrado que o tratamento prolongado com aspirina (100 mg/kg) e outros anti-inflamatórios não esteróides, ocorre a ativação de NF- κ B e conseqüente indução da apoptose (Yamamoto, Yin *et al.*, 1999; Shao, Fujiwara *et al.*, 2000; Greten, Eckmann *et al.*, 2004; Takada, Bhardwaj *et al.*, 2004; Stark e Dunlop, 2005). Outro importante estudo de Klampfer e colaboradores em várias linhagens de leucemia mielóide (TF-1, CMK-1, U937, HL-60, Mo7e) tratadas com NaSal foi observado a ativação da Caspase 3 e indução da apoptose independente de p53, porque muitas destas células não possuem p53 funcional, e também a inibição de MCL-1 (Klampfer, Cammenga *et al.*, 1999). E, finalmente, um estudo mais recente, em células de leucemia humana obtidos de pacientes e de linhagens de leucemia como TK6 e Jurkat, o tratamento com aspirina induziu a apoptose independente de NF- κ B e MAPKs, através de uma alteração no balanço das

moléculas anti-apoptótica e pro-apoptótica Mcl-1/Noxa respectivamente (Iglesias-Serret, Pique *et al.*, 2010).

Dados obtidos em nosso laboratório mostram claramente em células promonocitárias humanas e murinas, que os salicilatos inibem a síntese proteica celular através da indução da fosforilação da subunidade alfa de eIF2 e que a cinase PERK tem importante papel nesta fosforilação. Os dados em conjunto mostram que um aumento na fosforilação na subunidade alfa de eIF2 desencadeado pelo tratamento com os salicilatos resulta em atenuação da síntese proteica e que isto ocorre através da inibição da tradução do mRNA. Além da fosforilação de eIF2-alfa, observa-se, em tempos mais tardios, uma recuperação da síntese proteica em células deficientes de PERK tratadas com salicilatos. Esta observação suscita a hipótese de que o mecanismo da inibição da síntese desencadeado por salicilatos deve certamente envolver a participação de outra cinase além de PERK. Foi verificado também que o tratamento de células com salicilatos leva a ativação da caspase-12 e indução do fator de transcrição CHOP/gadd153, dois eventos marcantes na resposta do estresse do RE (Silva, Wang *et al.*, 2007).

Justificativa

2 - Justificativa

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) como o ácido acetil salicílico (a popular Aspirina) e o salicilato de sódio são bem conhecidos por sua capacidade de inibição da atividade da ciclooxigenase (EC 1.14.99.1), uma enzima chave na biosíntese de prostanglandina. Entretanto, vários estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o salicilato de sódio e outros anti-inflamatórias não esteróides são considerados fármacos promissores para o tratamento contra o câncer. O uso prolongado desses anti-inflamatórios tem se mostrado eficaz no tratamento do câncer de cólon, câncer de mama, próstata, pulmão e pele (Vane, 1971; Gupta e Dubois, 1998; Thun, Henley *et al.*, 2002; Rao e Reddy, 2004). As propriedades de quimio-prevenção dos AINES devem-se à habilidade desses fármacos em induzir a apoptose de um modo independente da atividade de ciclooxigenase.

A fosforilação do fator 2 de iniciação da tradução eIF2 é um ponto crítico na convergência de resposta integrada ao estresse. Isto dá suporte à adaptação celular à diversas condições de estresse, incluindo o estresse do retículo endoplasmático através da inibição da síntese global de proteínas e pela indução de vias celulares específicas para lidar com o estresse (Wek, Jiang *et al.*, 2006). O uso do AINES pode levar a uma perturbação no retículo endoplasmático e, como consequência, facilitando a indução da apoptose em células cancerosas (Yang, Park *et al.*, 2010).

Portanto, nosso estudo explora a ligação entre as vias de sinalização de resposta do estresse do retículo endoplasmático e a indução da apoptose em células tratadas com salicilato de sódio.

Uma vez que já foi demonstrado que os salicilatos levam a indução da fosforilação de eIF2 de modo dependente de PERK, porém sendo restaurada em tempos mais tardios, mesmo na ausência de PERK (Silva, Wang *et al.*, 2007), tal evidência nos levou a testar a hipótese de que uma outra cinase que fosforila a subunidade alfa do fator eIF2, como a cinase GCN2, e seu papel na modulação da resposta de apoptose induzida pelo salicilato de sódio.

Objetivos

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Investigar o papel da cinase GCN2, em células tratadas com salicilato de sódio e seus efeitos na(s) via(s) de sinalização celular envolvidas na apoptose ocasionada pelo envolvimento da resposta do estresse do retículo endoplasmático.

3.2 - Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade e proliferação de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens e deficientes de GCN2 após tratamento com salicilato de sódio.

Analisar a ocorrência de apoptose em MEFs selvagens e deficientes de GCN2 após o tratamento com NaSal.

Avaliar os efeitos dos salicilatos sobre as vias de Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR) do estresse do retículo endoplasmático.

Comparar o perfil de expressão de RNAs mensageiros da UPR em MEFs selvagens e deficientes de GCN2 após tratamento com NaSal.

Avaliar a participação de GCN2 na morte celular

Investigar as vias apoptóticas ativadas pelo NaSal envolvidas na resposta de estresse do retículo endoplasmático em MEFs selvagens e deficientes de GCN2.

Metodologia

4 - Metodologia

4.1- Cultura de Fibroblastos Embrionários Murinos (MEFs) selvagens e deficientes de PERK e GCN2

Fibroblastos embrionários murinos do tipo selvagem ou deficientes de PERK imortalizados pelo antígeno SV40 foram cedidos pelo Dr. David Ron – New York University School of Medicine, New York - USA. MEFs deficientes de GCN2 imortalizados por SV40 foram cedidos pela Dra. Beatriz Castilho do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com a permissão do Dr. Douglas Cavener (The Pennsylvania State University, Pennsylvania – EUA) (Zhang, Mcgrath *et al.*, 2002). As células foram mantidas em cultura em meio DMEM (LGC) suplementado com 10% de SFB, 1% de solução de antibióticos penicilina e estreptomicina (Invitrogen) a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Previamente a cada tratamento com NaSal, o meio de cultura era substituído por OPTIMEM (Invitrogen) suplementado com 5% de SFB. Todas as células eram então tratadas com salicilato de sódio em tempos e concentrações de acordo com o tipo de ensaio. (Sodium Salicylate, Reagent Plus TM – S3007, pureza > 99% – Sigma).

4.2 - Obtenção de extratos celulares totais

Ao final dos tratamentos, a monocamada das culturas eram lavadas com PBS gelado. Os extratos celulares eram então solubilizados em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 0.1% de Triton X-100, 0.25% de deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl , 1 mM EGTA, 2 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de NaF, 30 mM de pirofosfato, contendo inibidores de proteases 1 mM PMSF, aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1µg/ml e pepstatina 1µg/ml). Os lisados celulares eram clarificados por micro-centrifugação (microcentrífuga – Eppendorf 5415R). Posteriormente, os extratos eram quantificados através do ensaio de Bradford (Bradford, 1976) fracionados em SDS-PAGE, transferidos para membranas PVDF e detectados por western-

blot com os anticorpos específicos indicados no item 4.3.3. As bandas eram visualizadas com quimioluminescência (kit ECL Plus, GE Healthcare).

4.3 - Western Blot

4.3.1 - Fracionamento eletroforético e transferência

O 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) era misturado a trinta microgramas dos extratos celulares. Após fervura por 5 minutos seguida de incubação por 2 minutos no gelo, os extratos eram aplicados em gel de poliacrilamida a 8% ou 12% e submetidos à eletroforese a uma tensão de 150 V em tampão Tris-Glicina (Tris base 25 mM pH 8,3; Glicina 250mM; 0,1% SDS). Ao final da corrida, o gel era lavado brevemente em tampão de transferência (Tris base 25mM pH 8; Glicina 250mM; 20% Metanol) e colocado entre um papel Whatmann 3M e a membrana PVDF (polifluoreto de vinilideno) previamente equilibrada em tampão de transferência. A montagem era transferida para uma cuba, sendo completamente imersa em tampão de transferência gelado e então aplicada uma tensão de 100 V por uma hora. Ao final da transferência, a membrana era guardada a 4°C até o início do imunoenensaio.

4.3.2 - Imunoensaio e revelação

Após rinsagem em TBS-T (Tris-HCl 20mM pH 7,6; NaCl 137mM; 0,1% Tween-20) a membrana era incubada em solução de bloqueio (TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana era lavada por 3 vezes por 5 minutos em TBS-T, seguido de incubação a 4°C por 16 horas, ou à temperatura ambiente por uma hora, com o anticorpo primário diluído em solução de TBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Em seguida, a membrana era lavada conforme acima, sendo posteriormente incubada à temperatura ambiente sob agitação por mais 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase e diluído em solução de TBS-T. Novamente eram realizadas três lavagens como descrito anteriormente. Para a detecção do anticorpo secundário, a membrana era transferida para uma placa cassete de raio-X e gotejada sobre a primeira 1 mL da solução substrato “ECL Plus Western Blot Detection System” RPN2132 (Amersham Biosciences). Após incubação à

temperatura ambiente durante 1 minuto, o excesso da solução ECL Plus era retirado da membrana. Em câmara escura e com o cassete aberto, um filme de autoradiografia era colocado sobre a membrana e, após o fechamento do cassete, a membrana era exposta em tempos que variaram de 30 segundos a 10 minutos. Após a incubação, o filme era revelado utilizando as soluções de revelação e fixação da Kodak.

4.3.3 - Anticorpos

Os anticorpos primários específicos utilizados foram para resíduos anti-p-PERK (phospho-PERK Thr980 #3179S, Cell Signaling), anti-PERK (H-300 SC13073, Santa Cruz), anti-p-eIF2alfa (phospho-eIF2alpha Ser51 #9721S, Cell Signaling), anti-eIF2alfa (SC11386, Santa Cruz), anti-p-JNK1 (phospho SAPK/JNK Thr183/Tyr185 #92251S, Cell Signaling), anti-JNK1/2 (SC7345, Santa Cruz), anti-pGCN2 (phospho T899, ab75836, Abcam), anti-GCN2 (SC46341, Santa Cruz), anti-FLAG-M2 (F3165, Sigma) e anti-tubulina (SC8035, Santa Cruz). Os anticorpos secundários que foram utilizados eram de acordo com isotipo do anticorpo primário.

4.4 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mede a viabilidade e a proliferação celular (Mosmann, 1983). O ensaio baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, de converter o substrato MTT, solúvel em água, em cristal de formazan, produto insolúvel em água. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, esse modelo pode ser usado com o objetivo de avaliar a citotoxicidade e proliferação celular induzidas por diferentes estímulos. MEFs selvagens ou deficientes de GCN2 foram semeados em placas de 96 poços na densidade de 1×10^5 células/poço e incubados durante 16 horas. Ao final deste tempo, as células foram tratadas com NaSal (nas concentrações indicadas para cada ensaio) e incubadas por 16 horas. Em seguida ao tratamento, 20 µl de solução de MTT (Sigma)

(5 mg/ml em DMEM) eram adicionados a cada poço seguido de incubação por 4 horas a 37⁰ C. Após esse período, os sobrenadantes eram aspirados e 200 µl de isopropanol acidificado eram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. Foram coletados 100 µl de cada poço para a leitura dos valores de absorbância em 570 nm em um espectrofotômetro (ASYS HITECH GmbH, Eugendorf, Austria). O valor da densidade óptica do grupo controle (não tratado) foi considerado como 100% para cálculo da porcentagem da alteração da viabilidade celular em células tratadas com NaSal, após subtração da absorbância dos poços utilizados com branco.

4.5 - Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo

A presença de apoptose em MEFs tratados com salicilato de sódio foi determinada por citometria de fluxo, onde foram avaliados diferentes marcadores de apoptose como, a fragmentação do DNA por meio de uma solução hipotônica fluorocrômica (HFS) e a marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo.

4.5.1 - Determinação do conteúdo de DNA subdiploide por citometria de fluxo

O conteúdo de DNA subdiploide foi determinado para a quantificação da apoptose em MEFs selvagens e deficientes de GCN2 tratados ou não com 20 mM NaSal por 16 horas. O método descrito por Nicoletti e colaboradores (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991) foi utilizado nesses ensaios. Este método permite calcular a porcentagem de núcleos apoptóticos após a marcação por iodeto de propídeo presente numa solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 µg/ml de iodeto de propídeo (PI) e 0.1% de Triton X-100 em citrato de sódio a 0.1% (todos os reagentes – SIGMA-EUA). A incubação das células com a solução HFS leva à fragilização da membrana celular pela ação do Triton X-100 e o choque hipotônico provoca a lise da mesma. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no DNA nuclear. O iodeto de propídeo não penetra através da membrana íntegra e, portanto, diferencia células normais de células apoptóticas e necróticas (Aubry, Blaecke *et al.*, 1999). As células normais apresentam o conteúdo de DNA igual a 2n ou 4 n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. As células em apoptose, por sua vez, apresentam um conteúdo de DNA menor que 2n, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo, sendo esta fase de subdiploidia (à esquerda da fase G₀, representada no histograma). Após a delimitação da população celular de interesse em gráficos pontuais de tamanho versus granulosidade, a fragmentação do DNA foi analisada em histogramas, como representada na Figura 5.

Para a determinação do conteúdo de DNA subdiploide, a distribuição dos núcleos foi analisada no programa CellQuest (Becton Dickson-EUA) em histogramas que representam o número de eventos (counts) em função da fluorescência, conforme Figura 5. As células selvagens e

nocaute de GCN2 foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^5 células por poço e incubadas durante a noite a 37°C , 5% CO_2 . No dia seguinte, as células foram tratadas por 2, 8 e 16 horas com 20 mM NaSal e novamente incubadas. Após o término de cada tratamento, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por três minutos a 8000 rpm. (Heraeus multifuge X3R, Thermo Scientific). Nos poços da placa foram adicionados 200 μl de HFS e ao sedimento celular obtido pós-centrifugação foram adicionados 100 μl de HFS. As amostras foram incubadas a 4°C por 4 horas ao abrigo da luz. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson).

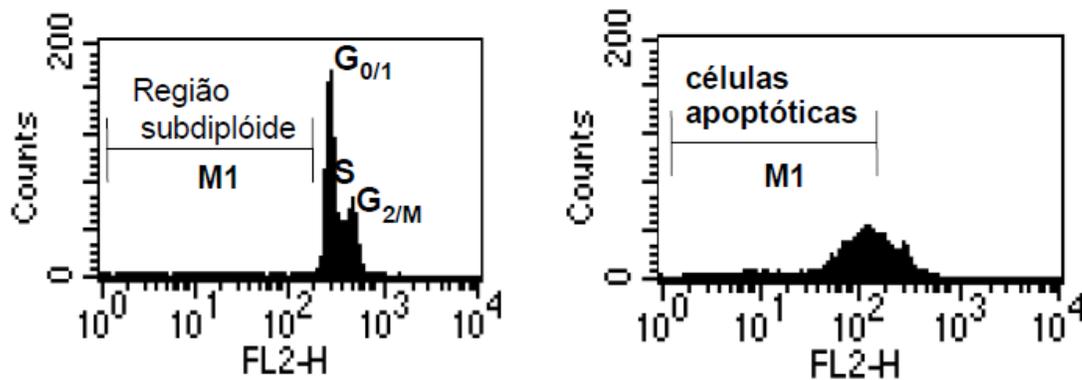


Figura 5: Histograma representativo da análise de conteúdo de DNA subdiploide. À esquerda o histograma de células normais e à direita o histograma de células em apoptose. O marcador **M1**, nos gráficos, representa a região de DNA fragmentado do histograma celular.

4.5.2 - Marcação celular com anexina V e iodeto de propídeo

O método utilizado nesse trabalho (Aubry, Blaecke *et al.*, 1999) permite uma análise mais refinada dos diferentes tipos e estágios de morte celular (estágio inicial de apoptose, estágio tardio de apoptose e danos a membrana celular) os quais ocorrem durante a citotoxicidade celular. A anexina V tem afinidade pelo fosfolípide de membrana fosfatidilserina. Esse fosfolípide encontra-se voltado para a face interna da membrana celular e é exposto na face externa durante os estágios iniciais de apoptose. Nessa fase inicial, as células mantêm a integridade da membrana celular, o que impede a penetração do iodeto de propídeo. A permeabilização da membrana nos estágios mais tardios da apoptose permite a penetração desse corante e as células tornam-se duplo marcadas. Portanto, esse ensaio permite a quantificação de células em estágios iniciais de apoptose bem como sua diferenciação daquelas com danos na membrana (apoptose tardia + permeabilização da membrana) causados por citotoxicidade celular.

Para a realização desse ensaio os MEFs foram plaqueados a uma densidade de 5×10^5 por poço em placas de 24 poços e incubados por um dia a 37°C e 5% de CO_2 . Após este período, as células eram tratadas com 20 mM de NaSal, ou deixadas sem tratamento, por 16 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 200 μl de meio DMEM contendo 10% de SFB, transferidas para tubos Falcon de 15 ml e centrifugadas por três minutos a 800 rpm (Heraeus multifuge X3R, Thermo Scientific). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado com PBS e posteriormente ressuspendido em 100 μl de tampão de ligação adicionado de 10 μl de PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 5 μl de anexina V-FITC (Apoptosis kit Annexin V-FITC – Invitrogen, USA). As amostras foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este tempo, foram adicionados 400 μl de tampão de ligação em todas as amostras seguido de análise imediata por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). O programa CellQuest (Becton Dickinson) foi utilizado para a determinação da porcentagem das células marcadas com anexina V-FITC, PI ou duplo marcadas.

4.6 - Análise da expressão diferencial de genes: arranjos de PCR quantitativa em tempo real (*Quantitative Real Time-PCR array*)

Para iniciar estudos dos mecanismos que levam a indução da apoptose em MEFs tratados ou não com NaSal, foi realizada a reação de PCR quantitativa em tempo real, por meio de kit comercial *RT² Profiler PCR – Mouse Unfolded Protein Response (SABiosciences – USA – PAMM 089-A)*, conforme instruções do fabricante. As prováveis vias de indução da apoptose ativadas pelos salicilatos foram determinadas avaliando-se a expressão de RNA mensageiro (RNAm) codificante para 84 proteínas relacionadas a resposta de proteínas mal enoveladas (UPR).

4.6.1 - Extração do RNA total de MEFs estimulados por NaSal e obtenção da fita de cDNA

MEFs selvagens e nocaute de GCN2 foram semeados em placas de seis poços na densidade de 1.3×10^6 /poço e incubados a 37°C, 5% CO₂. No dia seguinte, o meio de cultura (DMEM+ 10% SFB) era substituído por meio OPTIMEM+ 5% SFB. Em seguida, as células eram estimuladas por 20 mM de NaSal por 3 e 6 horas. Após o término da estimulação, o RNA de cada amostra foi extraído por meio do kit de extração *RNeasy* (Qiagen – Germany). Ao final da extração, o RNA foi eluído em 50 µl de água *RNase-free* acrescido de 1.2 µl de *Rnasin* (Qiagen – Germany) e quantificado em espectrofotômetro nas absorvâncias 260/280, 260/230 (NanoVue plus, GE). Para verificação da integridade e qualidade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel desnaturante de agarose a 2%, onde foram avaliadas as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal conforme exemplificado na Figura 6. Os RNAs foram estocados a – 70°C.

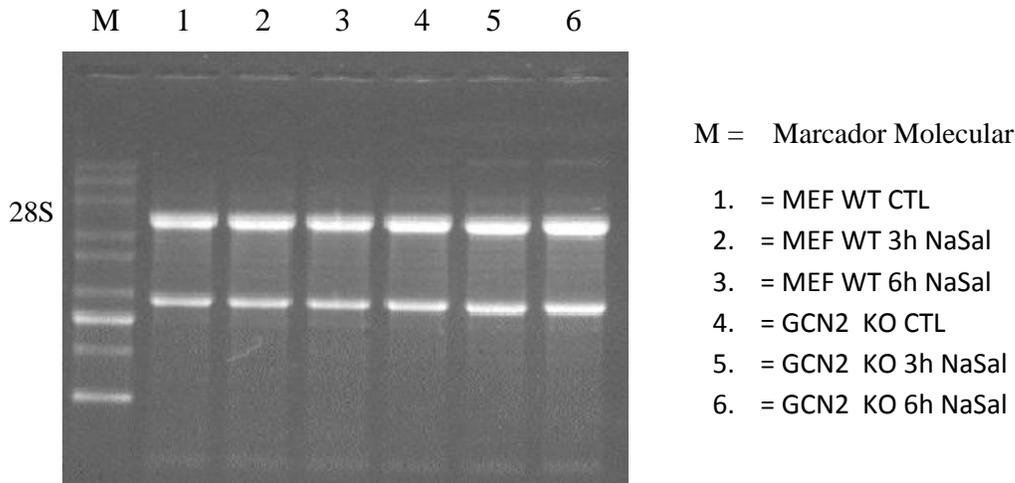


Figura 6: Amostras de RNA total em gel desnaturante de agarose a 2%

Para a síntese de cDNA, um micrograma de RNA total foi utilizado para cada reação. A síntese de cDNA foi obtida com o kit (*RT² First Strand Kit* – SABiosciences - USA). O protocolo do kit inclui uma fase prévia de eliminação de DNA genômico antes da reação da transcriptase reversa, onde foi adicionado em cada amostra de RNA 2ul do tampão GE (5X gDNA Elimination Buffer) seguido de incubação a 42° C por 5 minutos. O kit também inclui um controle interno de RNA para monitorar a eficiência da reação de transcrição reversa. Após o término da síntese, o cDNA foi eluído em 20 µl de água livre de Rnase e Dnase.

4.6.2 - Arranjos de qRT-PCR (PCR Quantitativa em Tempo Real) de 84 genes da via de proteínas mal enoveladas (UPR) SABiosciences

Para o preparo das reações de qRT-PCR foram utilizados 1350 µl do master mix (*RT² SYBR[®] Green/ROX[™] qPCR Master Mix* – SABiosciences-USA) adicionado de 102 ul de cDNA diluído com volume final de 2500 µl suficiente para cada placa de 96 poços fornecidas pelo fabricante (*RT2 Profiler TM PCR ARRAY – Mouse Unfolded Protein Response* – SABiosciences-USA). Em seguida, foram adicionados 25 µl em cada poço que já continha os pares de iniciadores específicos para cada gene associado a via de proteínas mal enoveladas (UPR) do estresse do retículo endoplasmático, Figura 7. A reação da qRT-PCR foi processada pela máquina da ABI – 7300 Real Time PCR System – USA. O ciclo da PCR consistia de um

ciclo inicial de desnaturação a 95⁰ C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95⁰ C, um minuto a 60⁰ C para o anelamento e um ciclo para a curva de dissociação de 95⁰ C por 15 segundos, 60⁰ C por 30 segundos e 95⁰ C por 15 segundos. Cada condição experimental foi efetuada duas vezes, com duplicatas biológicas. Por fim, as análises de cada reação da qRT-PCR foram realizadas pelo *software Web-Based PCR Data Analysis* (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) . Os resultados foram determinados pelo método 2- $\Delta\Delta^{Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), que representa o número de vezes que o gene de interesse está mais ou menos expresso nas células estimuladas com NaSal quando comparado com às células não estimuladas. É importante ressaltar que o valor $\Delta\Delta^{Ct}$, foi calculado a partir da fórmula: $\Delta\Delta^{Ct} = \Delta^{Ct}(\text{grupo 2}) - \Delta^{Ct}(\text{grupo 1})$, sendo o grupo 2, os grupos experimentais (células tratadas com NaSal), e o grupo 1, o grupo controle (células não tratadas).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amfr	Armet	Atf4	Atf6	Atf6b	Atxn3	Bax	Calr	Canx	Cct4	Cct7	Cebpb
B	Creb3	Creb3l3	Ddit3	Derl1	Derl2	Dnajb2	Dnajb9	Dnajc10	Dnajc3	Dnajc4	Edem1	Edem3
C	Eif2a	Eif2ak3	Ern1	Ern2	Ero1l	Ero1lb	Erp44	Fbxo6	Ganab	Ganc	H47	Herpud1
D	Hspa1l	Hspa2	Hspa4	Hspa4l	Hspa5	Hspb9	Hsph1	Htra2	Htra4	Insig1	Insig2	Mapk10
E	Mapk8	Mapk9	Mbtps1	Mbtps2	Nploc4	Nucb1	Os9	Pdia3	Pfdn2	Pfdn5	Ppia	Ppp1r15b
F	Prkcsh	Rnf139	Rnf5	Rpn1	Scap	Sec62	Sec63	Sel1l	Serp1	Sil1	Srebf1	Srebf2
G	Syvn1	Tcp1	Tor1a	Ube2g2	Ube2j2	Ubxn4	Ufd1l	Ugcgl1	Ugccl2	Usp14	Vcp	Xbp1
H	Gusb	Hprt1	Hsp90ab1	GAPDH	Actb	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 7: Mapa da placa de 96 poços mostrando os 84 genes associados a via de proteínas mal enoveladas (UPR). Genes constitutivos (H1 a H5), um controle para contaminação de DNA genômico de camundongo (H6), três controles de transcrição reversa (H7 a H9), três controles positivos da PCR (H10 a H12). A lista com os nomes e descrição dos genes avaliados estão relacionados no Anexo 1 da tese.

4.7- Ensaio de atividade do gene repórter luciferase

A ativação da via de estresse do RE *in vitro* pode ser também avaliada por ensaios com gene repórter que contém os elementos de resposta do estresse do RE (ERSE – *endoplasmic reticulum stress element*) clonado no plasmídeo pGL3-Promoter (Promega), que foi gentilmente cedido pelo Dr. Tomomi Gotoh, Kumamoto University, Japão (Gotoh, Oyadomari *et al.*, 2002). MEFs selvagens e GCN2-KO foram co-transfectados com os plasmídeos pGL3-ERSE e pRL-TK (que expressa a luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do HSV-1). Os complexos de DNA (200 ng de pGL3-ERSE e 50 ng de pRL-TK e Lipofectamine 2000 (Invitrogen) – 1 ul/transfecção foram feitos em meio OPTIMEM (Invitrogen) e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, os complexos eram adicionados às células por 24 horas. Ao término deste período, as células foram expostas a diferentes concentrações de NaSal por diferentes intervalos de tempo. Os extratos celulares obtidos ao final dos tratamentos foram utilizados para a análise da atividade luciferase. O ensaio de luciferase foi realizado com o kit “Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System” (Promega). Para a leitura da atividade da luciferase, 20 µL de cada amostra de extrato celular obtido foram adicionados a cada poço de uma placa FluoroNunc™ de noventa e seis poços, seguido da adição de 40 µL do substrato luciferina de *Photinus pyralis* (reagente LAR II do kit DLR) e leitura por 3 segundos para cada amostra. Para a normalização dos resultados, era feita em seguida a leitura da luciferase da *Renilla reniformis* onde foram adicionados 40 µl do reagente Stop & Glo (Promega) a cada poço contendo as amostras em análise. A leitura das amostras foi realizada no luminômetro (Lumicount Packard BioSciences) pelo programa Reader (Packard BioSciences). A Figura 8 esquematiza o ensaio da luciferase.

Ensaio de gene repórter

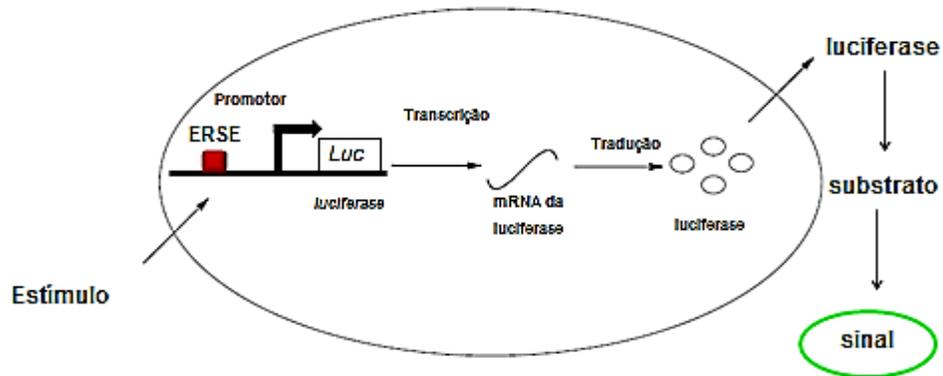


Figura 8: Representação esquemática do ensaio de luciferase

4.8 - Transfecções de siRNA para GCN2 e de células HEK 293T

Com objetivo de se explorar outras técnicas para abolir a função de GCN2 decidiu-se realizar alguns experimentos com o silenciamento de GCN2 por meio da técnica de transfecção de siRNAs. Para as transfecções, células MEF WT, PERK KO foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/poço (MEFs) em meio DMEM contendo 10% de SFB e incubadas a 37°C , 5% CO_2 . No dia seguinte, o meio DMEM foi substituído pelo meio OPTIMEM (Invitrogen) suplementado com 5% de SFB. Os siRNAs 50 nM/transfecção (Invitrogen) foram solubilizados em meio OPTIMEM em um tubo estéril. Em um outro tubo o reagente de transfecção (Lipofectamine 2000 – Invitrogen) foi solubilizado em meio OPTIMEM e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os siRNAs foram misturados ao reagente de transfecção para a formação dos complexos (siRNA/Lipofectamine 2000) e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os complexos foram adicionados às células e estas incubadas por 24 horas até serem estimuladas com salicilatos nos tempos determinados para cada experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata e repetido três vezes com replicatas biológicas.

Para as células HEK 293T o procedimento para transfecção foi realizado conforme acima mencionado, com exceção da quantidade de células para o plaqueamento $0,6 \times 10^6$ por poço, e do plasmídeo pFLAG-GCN2 (cedido gentilmente pelo Dr. David Ron- New York University, School of Medicine) que foi co-transfectado juntamente com os siRNAs. Esse plasmídeo possui a sequência clonada completa de GCN2 fusionada a uma sequência denominada de flag para detecção em Western Blot.

Resultados

5 - Resultados

5.1 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)

Diante da necessidade de se determinar a densidade celular ótima para os ensaios de apoptose, realizamos uma curva de crescimento com diferentes quantidades de células na presença de MTT. Observamos na Figura 9 A/B que houve um crescimento celular nas diversas quantidades testadas, sendo a densidade de 1×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços a escolhida para os ensaios em MEFs WT e GCN2 KO.

5.2 - Efeito das diferentes concentrações de NaSal sobre a proliferação de MEFs WT e GCN2-KO

Para iniciar estudos sobre o papel de GCN2 no estresse celular induzido pelo NaSal, MEFs WT e GCN2-KO foram tratados com várias concentrações de NaSal nos tempos indicados e posteriormente avaliados no ensaio de MTT para verificação da proliferação celular. Na Figura 10A, comparando-se com o controle não tratado, observou-se que o tratamento com 20 mM NaSal nas duas linhagens, por oito horas, não alterou significativamente a proliferação de nenhuma das duas células Figura 10A. No controle de morte celular (etoposídeo- 50 μ M) também não foi observado nenhuma alteração na proliferação de ambas as linhagens.

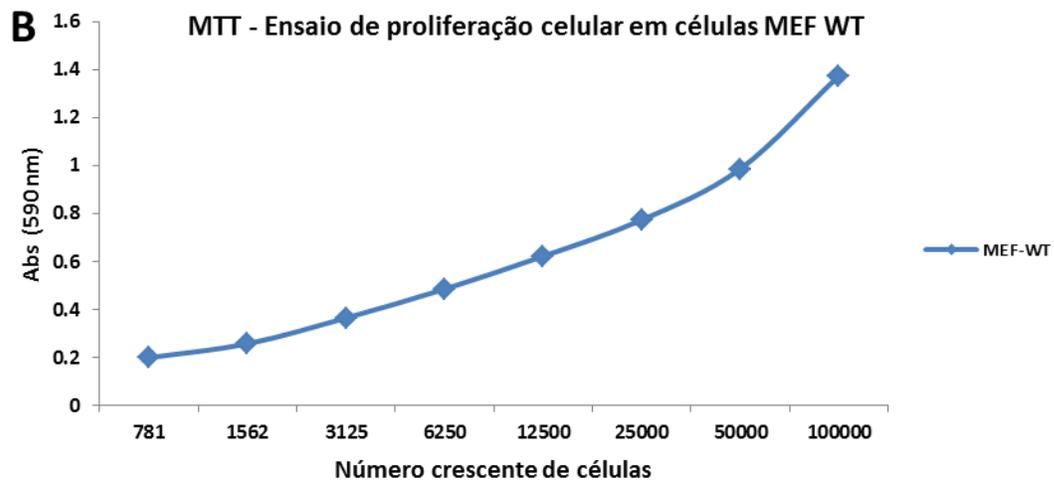
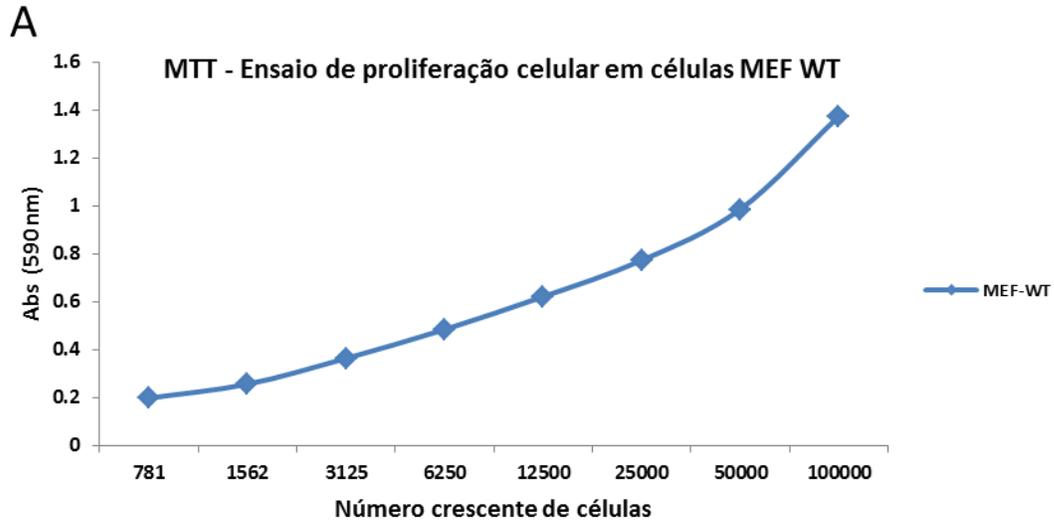
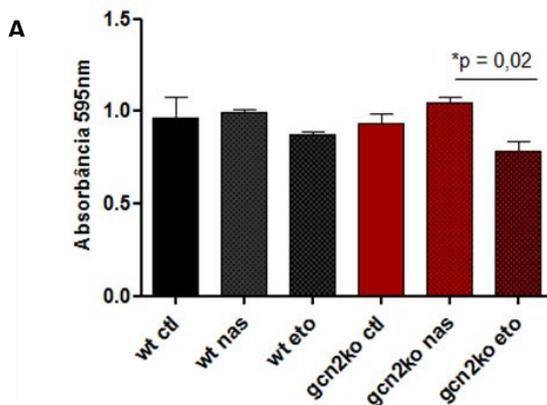
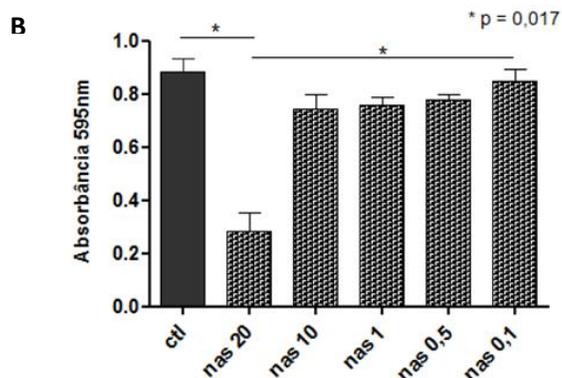


Figura 9: Ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT. MEFs WT (A) e GCN2 KO (B) foram plaqueados em triplicata, em diferentes quantidades e incubados por 48 horas. Após este tempo, a solução de MTT foi adicionada às células seguido de incubação por 4 horas sendo a leitura das placas de 96 poços realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

MTT - Ensaio de proliferação celular em células MEF WT e GCN2 KO tratadas com 20mM de NaSal por 8 horas



MTT - Ensaio de proliferação celular em células MEF WT tratadas com diferentes concentrações de NaSal por 16 horas



MTT - Ensaio de proliferação celular em células GCN2 KO tratadas com diferentes concentrações de NaSal por 16 horas

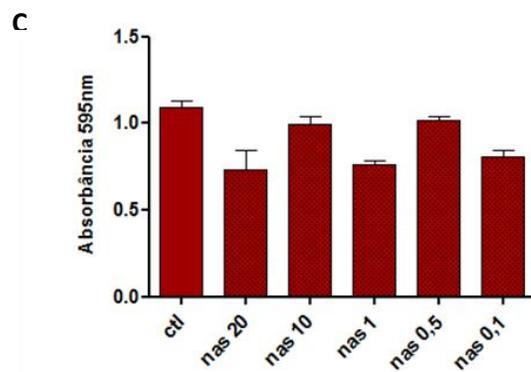


Figura 10: Efeito das diferentes concentrações de Salicilato de Sódio (NaSal) sobre a proliferação celular. MEFs WT e GCN2 KO foram plaqueados em triplicata e tratados com diferentes concentrações de NaSal por 8 e 16 horas. Após este tempo, a solução de MTT foi adicionada às células seguido de incubação por 4 horas sendo a leitura das placas de 96 poços realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Análises estatísticas realizadas pelo método de Kruskal-wallis e pós teste de Dunn ($p < 0.05$) representativa de pelo menos dois experimentos independentes.

Na Figura 10B, o tratamento com 20 mM de NaSal por 16 horas nas células WT, causou uma diminuição significativa da proliferação celular (68,8%). Todas as outras concentrações testadas não causaram reduções significativas na proliferação celular quando comparadas ao controle não tratado. Por outro lado, no resultado apresentado na Figura 10C, células GCN2-KO tratadas com a maior concentração de NaSal (20 mM) por 16 horas, tiveram uma redução atenuada da proliferação celular (34.5%) quando comparadas ao controle não tratado. A variação da resposta detectada nas células GCN2-KO tratadas por 16 horas conforme pode se observar na Figura 10C, pode ser devido a hormese. Este fenômeno biológico, embora ainda não totalmente elucidado pela ciência, tem sido amplamente descrito em ensaios diversos, sendo observado que uma mesma substância pode causar efeitos fisiológicos distintos, dependendo da concentração utilizada podendo ocorrer estímulo ou inibição na variável considerada (Mattson, 2008).

5.3 - Apoptose induzida pelo tratamento com NaSal em MEFs

5.3.1 - Análise da fragmentação do DNA de células MEF WT e GCN2 KO após tratamento com NaSal

Após observar uma diminuição significativa na proliferação nos MEFs WT tratados com 20 mM NaSal por 16 horas, o próximo passo foi avaliar se essa redução na proliferação poderia ser devido a apoptose. A fragmentação do DNA foi analisada nas duas linhagens após tratamento com 1 e 20 mM NaSal por 16 horas, Figura 11. Como mencionado anteriormente, nesta metodologia o iodeto de propídeo se intercala no DNA celular, permitindo a quantificação do conteúdo de DNA sub-diplóide (fragmentado). Conforme demonstrado na Figura 11, nas células WT tratadas com NaSal foi observada uma elevada porcentagem do conteúdo de DNA subdiplóide (45%) quando comparado ao controle não tratado, que apresentou um conteúdo menor que (5%).

Incorporação de iodeto de propídeo em células MEF WT e GCN2 KO tratadas com 1 e 20mM NaSal por 16 horas

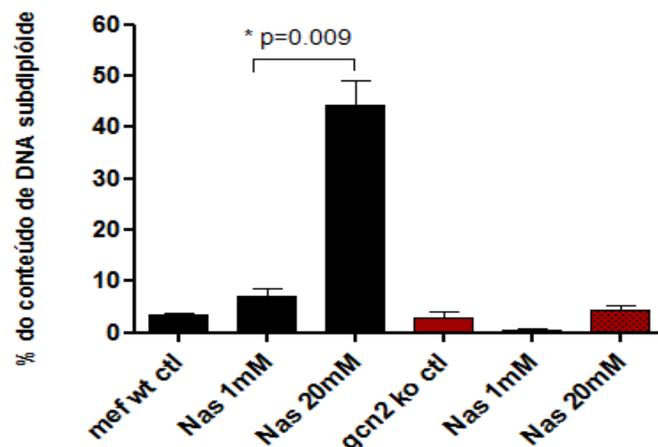


Figura 11: Análise comparativa entre a fragmentação do DNA de células MEF WT e GCN2 KO tratadas com NaSal. MEFs WT e GCN2 foram plaqueados em triplicata e tratados com 1 e 20 mM NaSal por 16 horas. Após este tempo, as células foram tratadas com solução de HFS por 4 horas e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Análises estatísticas realizadas pelo método de Kruskal-wallis e pós teste de Dunn ($p < 0.05$) representativa de pelo menos dois experimentos independentes.

Na concentração de 1 mM NaSal, a porcentagem de células marcadas por iodeto de propídeo foi similar ao controle não tratado, ou seja, uma diferença pouco significativa. Nas células GCN2-KO tratadas com as duas concentrações de NaSal, não foi observado um elevado aumento percentual de células marcadas com iodeto de propídeo, sendo que na concentração de 20 mM NaSal apenas (5%) das células estavam com o DNA fragmentado.

5.3.2 - Análise da marcação com anexina V e iodeto de propídeo em MEFs WT e GCN2-KO tratados com NaSal

Os biomarcadores anexina V e iodeto de propídeo (PI) são ferramentas fundamentais para se avaliar o perfil e estágio apoptótico das células. Dessa forma, avaliamos por citometria de fluxo o percentual médio de MEFs WT e GCN2-KO positivos apenas para anexina V (estágio recente de apoptose) e positivos para anexina e PI (estágio tardio de apoptose), após tratamento com 20 mM de NaSal por 16 horas Figura 12. A análise dos dados revelou que os MEFs WT tratados com NaSal, apresentam uma porcentagem significativa dessas células marcadas com anexina V (64%) contrastando com (13%) das células GCN2 KO marcadas com anexina V. A porcentagem de células duplamente marcadas para anexina V e PI foi similar nas duas linhagens e independente do tratamento com NaSal. A marcação de anexina V/PI foi similar nos controles não tratados de ambas as linhagens.

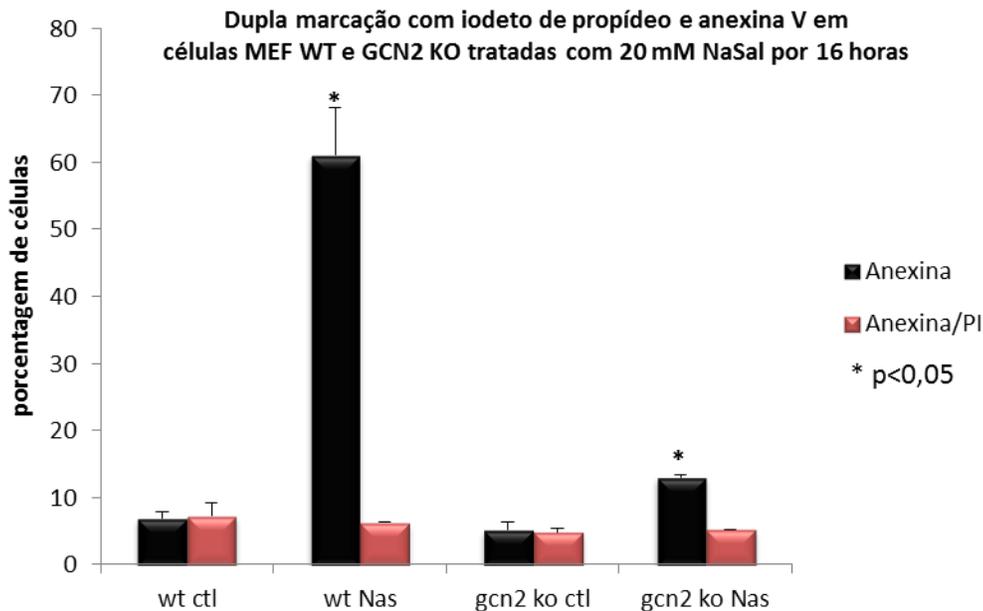


Figura 12: Análise comparativa para dupla marcação com PI/Anexina V de MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal. MEFs WT e GCN2 foram plaqueados em duplicata e tratados com 20 mM NaSal por 16 horas. Após este tempo, o tampão de ligação contendo anexina V e iodeto de propídeo foi adicionado às células. Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Análises estatísticas realizadas pelo método de *Student's t-test* $p < 0.05$ representativa de dois experimentos independentes.

5.4 - Análise da expressão de genes relacionados com a resposta de proteínas mal enoveladas (UPR) em MEFs WT e GCN2-KO após estimulação com NaSal

Uma vez demonstrada a indução da apoptose nas células MEF WT estimuladas com NaSal e sabendo-se que o estresse prolongado do RE pode levar a apoptose, o próximo passo foi definir quais os prováveis mecanismos pelos quais os salicilatos poderiam ativar ou modular componentes celulares para induzir a apoptose. Para isso, examinamos a expressão gênica em células WT e GCN2-KO estimuladas com 20 mM NaSal por 3 e 6 horas. O RNA total foi obtido e através da reação de PCR em tempo real, foi utilizado um arranjo contendo vários pares de iniciadores para a amplificação e análise de 84 genes da UPR (*RT² Profiler PCR – Mouse Unfolded Protein Response - SABiosciences - USA*). A descrição detalhada dos genes

encontra-se no Anexo desta tese. A análise da expressão gênica foi realizada considerando-se como um parâmetro significativo uma diferença de pelo menos três vezes de indução ou inibição da expressão gênica em relação aos controles não tratados com NaSal para cada linhagem. Nos gráficos da Figura 13 de A – U, estão plotados todos os genes induzidos ou inibidos após o tratamento com NaSal, nas duas linhagens, e considerando o agrupamento funcional de cada gene da UPR informado no arranjo da SaBiosciences (RT² Profiler™ PCR Array – PAMM-089C). Na Tabela 1, estão sumarizados todos os resultados que foram plotados nos gráficos da Figura 13 de A- U.

Dos 84 genes avaliados, nas células WT tratadas por 3 e 6 horas com 20 mM NaSal, 11 (13,1%) e 21 (25%) genes, foram exclusivamente induzidos, respectivamente. Nas células GCN2-KO três genes (3,57%) foram induzidos após 6 horas de tratamento, porém não exclusivamente quando comparados com as células WT. Desses três genes, dois tiveram a expressão aumentada e independente de GCN2 que incluem *Serp1* (5,71) e *Ugcgl2* (6,7) vezes de aumento, respectivamente. O gene *Ddit3* (*CHOP*) foi induzido (43,8) vezes nas células WT, porém (5,5) vezes nas células GCN2-KO após 6 horas de tratamento com NaSal. A diferença de expressão de *CHOP* entre as duas linhagens foi de (7,96) vezes. Nos dois tempos de tratamento testados, *Herpud* foi o único gene inibido nas células GCN2-KO (5,34) vezes. Dos 84 genes analisados, 51 não apresentaram mudança significativa na expressão gênica nas células WT tratadas com NaSal e nenhum gene foi inibido nestas células nas condições testadas e nos parâmetros analisados. Dentre os genes induzidos nas células WT após 6 horas de tratamento, além de *Ddit3* (*CHOP*) podemos destacar: *Cebpb* (7,2) vezes de aumento, os fatores de transcrição ATF6 e ATF4 (12,7, 8,7) vezes de aumento, respectivamente. Os sensores da UPR: *Ern1* (IRE1 α) e *Eifak3* (PERK) (7,7 e 3,3) vezes de indução, respectivamente. *Atxn3* (Ataxin 3) apresentou (9,4) vezes de aumento. A cinase *Mapk8* foi induzida (3,2) vezes. A proteína fosfatase *Ppp1r5b* foi induzida (6,5) vezes. Vários genes envolvidos no controle de qualidade de dobramento de proteínas, ligantes a proteínas mal dobradas, ubiquitinação, proteínas para isomerização dissulfídica e regulação do metabolismo do colesterol também tiveram um aumento significativo de expressão. As proteínas *Heat Shock* (*Dnajb2*, *Dnajb9*, *Dnajc10* e *Hspa11*) foram induzidas em níveis significativos entre (3,6 e 8,2) vezes. Os genes para ubiquitinação *Ube2g2* e *Ufdll1* foram induzidos (6,0 e 5,1) vezes, respectivamente. A oxidase

Ero11b foi induzida (6,3) vezes. Vários genes envolvidos na degradação do RE (ERAD) também foram induzidos, dentre eles: *Der11*, *Herpud*, *Sec62*, *Ubxn4* (3,3, 4,7, 3,2, 3,7) vezes, respectivamente. E finalmente, o gene *Insig1* conhecido como *insulin-induced gene 1* teve sua expressão aumentada em (5,6) vezes. Esses resultados demonstram que as células respondem ao tratamento por NaSal através da regulação da expressão de vários genes da UPR sendo que vários dos genes induzidos tem papel importante na indução da apoptose. Comparando o baixo número de genes induzidos (4 genes, 4,76%) nas células GCN2-KO com o número de genes induzidos nas células WT (32 genes, 38,1%) isto nos leva a sugerir fortemente que o NaSal provoca respostas celulares através da regulação de genes da UPR com participação significativa de GCN2.

Foram também identificados 10 genes cujas expressões foram alteradas quando comparou-se os controles não tratados de ambas as linhagens, Tabela 2. A maior diferença encontrada foi para ATF4. As células GCN2-KO apresentam uma expressão (14) vezes maior quando comparado ao controle WT. Os outros genes incluem: *Ddit3*, *Eifak3*, *Sreb1*, *Sreb2*, *Xbp1*, *Herpud1*, *Mbtps2*, *Sil1*, *Ubxn4*. Nenhum dos 84 genes exibiu expressão reduzida de acordo com o parâmetro utilizado, i.e., de pelo menos três vezes de diferença.

Tabela 1 Análise da expressão gênica em células WT e GCN2 KO tratadas com NaSal

Symbol	Refseq	Fold change			
		WT		GCN2-KO	
		3h	6h	3h	6h
Atf4	NM_009716	1.2058	12.7139	1.0377	-1.192
Atf6	NM_001081304	3.1492	8.6838	-1.203	1.528
Atxn3	NM_029705	3.2716	9.437	-1.7613	2.6882
Canx	NM_007597	1.8596	3.1023	-1.2716	1.2938
Cct4	NM_009837	1.4489	4.3419	1.5035	1.8046
Cct7	NM_007638	-1.1975	4.0232	1.9566	1.4109
Cebpb	NM_009883	4.1989	7.2267	-1.0222	1.3771
Creb3	NM_013497	1.459	5.7292	1.6799	-1.0023
Ddit3	NM_007837	6.021	43.8144	2.2089	5.5277
Derl1	NM_024207	3.3173	2.8547	nd	1.9611
Dnajb2	NM_178055	4.9588	6.9805	1.0595	2.3565
Dnajb9	NM_013760	5.8361	8.2154	-1.5764	2.2527
Dnajc10	NM_024181	-1.6994	3.5513	1.0817	1.476
Edem1	NM_138677	-1.257	3.4782	-1.2672	1.2805
Eif2ak3	NM_010121	-1.0718	3.3365	-1.2894	-1.3457
Ern1	NM_023913	-1.9588	7.7454	-1.8361	2.8712
Ero1l	NM_015774	2.0705	3.5636	-2.1535	1.5874
Ero1lb	NM_026184	2.3457	6.335	-2.3403	2.7543
Herpud1	NM_022331	1.4142	4.6697	-1.8171	-5.3455
Hspa1l	NM_013558	nd	4.936	nd	nd
Hspa4l	NM_011020	2.0849	3.8727	-1.3582	1.6954
Insig1	NM_153526	2.9282	5.5533	-1.3819	1.8489
Mapk8	NM_016700	1.2924	3.1895	-1.0151	2.0373
Pfdn5	NM_027044	2.3295	3.2678	1.3318	1.0956
Ppp1r15b	NM_133819	2.5669	6.4681	-2.5432	-1.5192
Rnf139	NM_175226	1.0425	3.5024	-2.0093	1.0805
Sec62	NM_027016	2.6666	3.1785	-1.146	1.6779
Sel1l	NM_001039089	-1.4142	3.2006	-1.2541	1.1109
Serp1	NM_030685	2.3457	5.7094	-1.0081	5.9039
Ube2g2	NM_019803	3.7711	5.9725	-1.0842	1.6606
Ubxn4	NM_026390	3.1932	3.6893	-1.2894	1.1783
Ufd1l	NM_011672	-1.2702	5.11	1.0968	2.161
Ugcgl2	NM_001081252	4.6428	5.2719	-1.1186	6.0699
Xbp1	NM_013842	3.5431	nd	-1.8877	1.1906

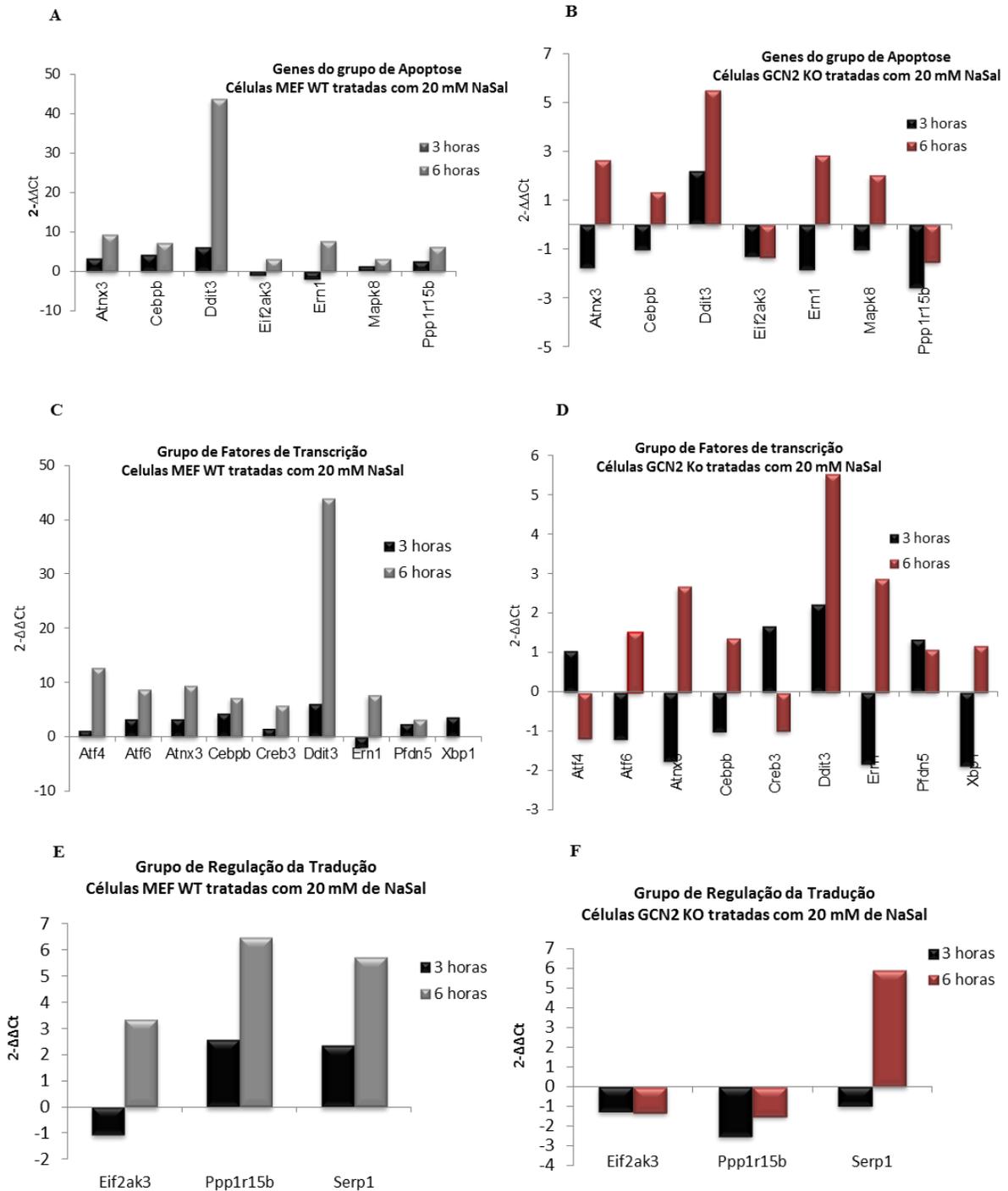


Figura 13: Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal, de acordo com o seu enquadramento em grupos funcionais. (A,B) Genes do grupo de apoptose; (C,D) Genes do grupo de fatores de transcrição; (E,F) Genes do grupo de regulação da tradução. Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene.

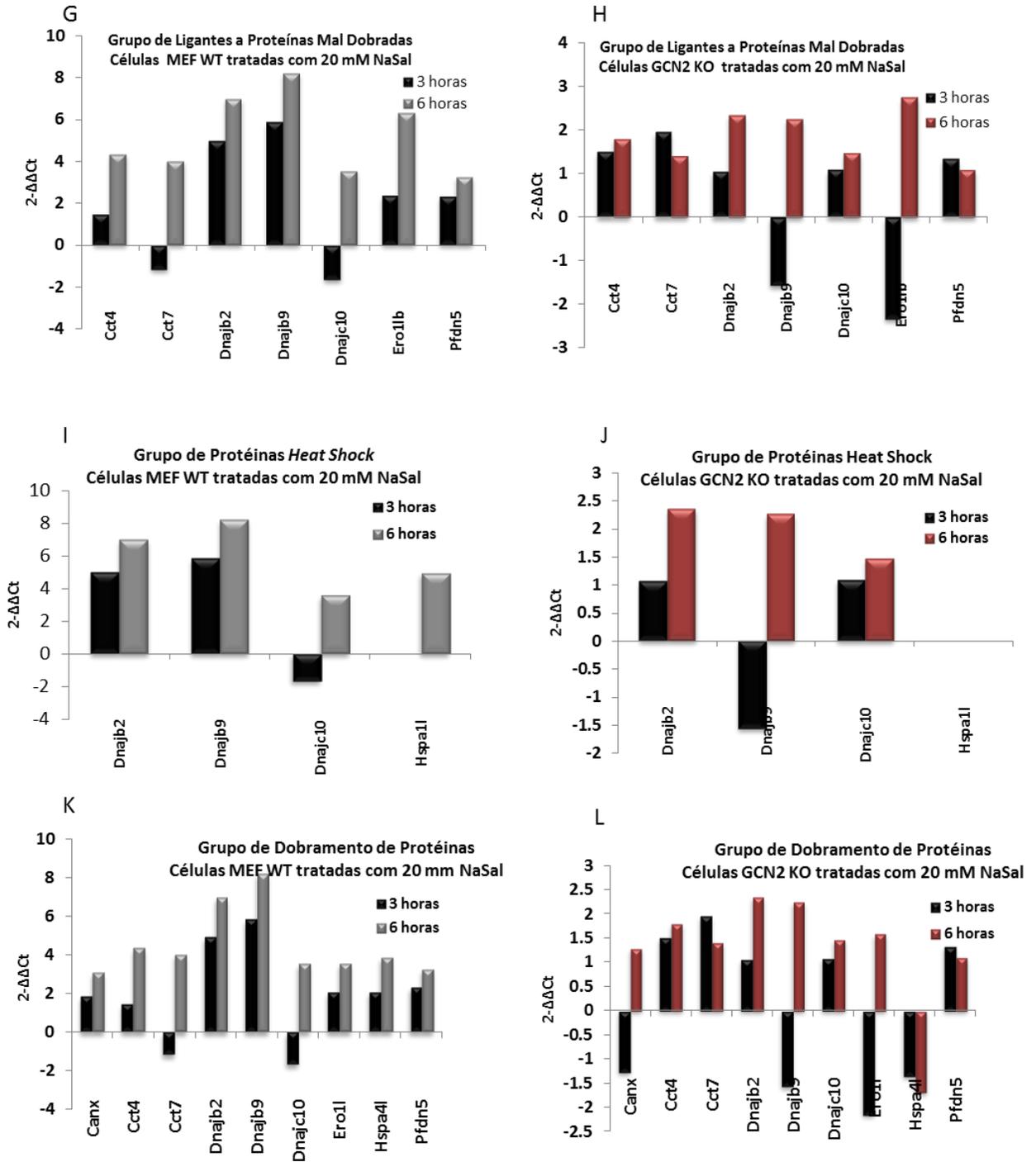


Figura 13: Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal, de acordo com o seu enquadramento em grupos funcionais. (G,H) Genes do grupo de ligantes a proteínas mal dobradas; (I,J) Genes do grupo de proteínas heat shock; (K,L) Genes do grupo de dobramento de proteínas. Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene.

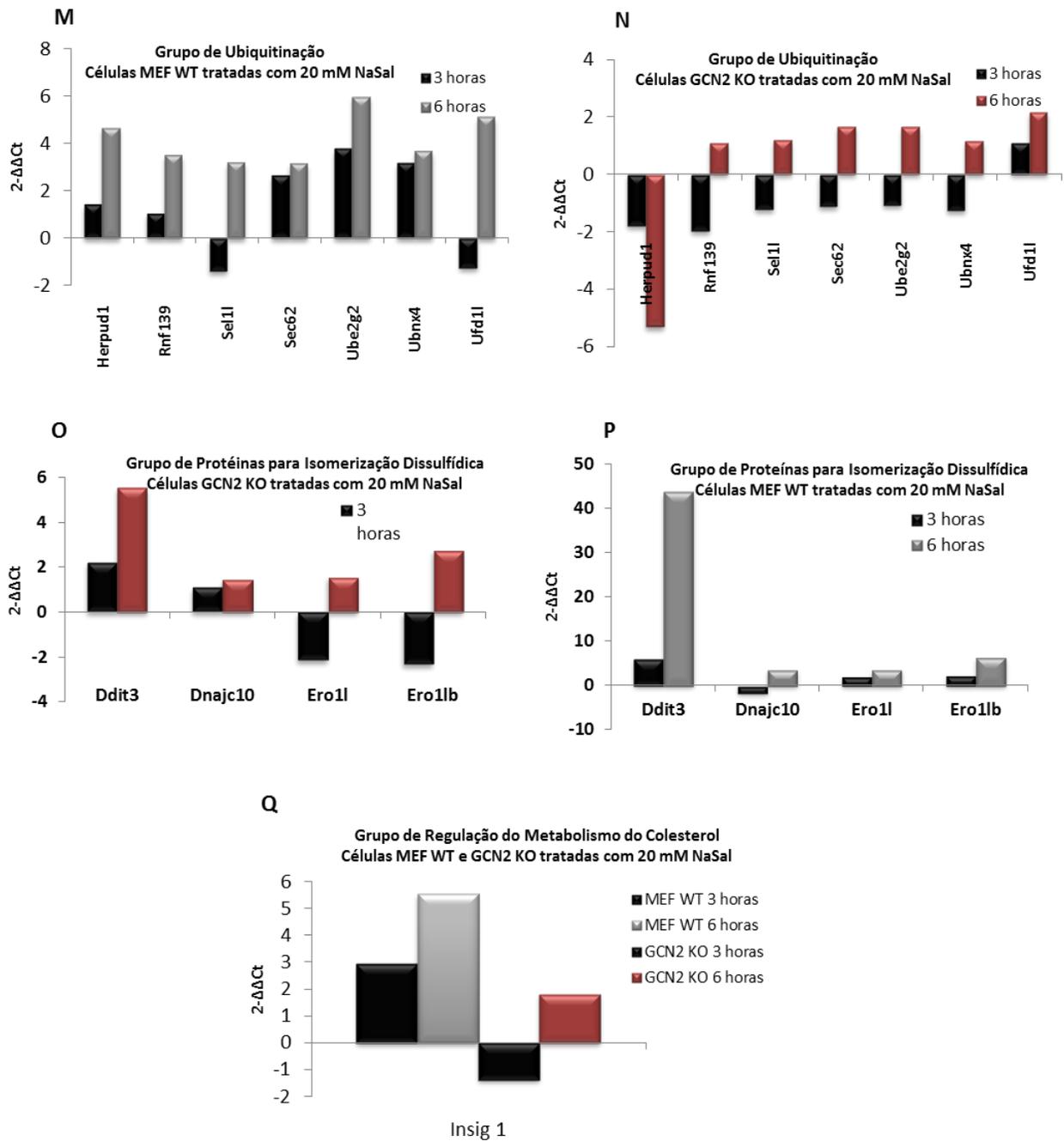


Figura 13: Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal, de acordo com o seu enquadramento em grupos funcionais. (M,N) Genes do grupo de ubiquitinação; (O,P) Genes do grupo de proteínas para isomerização dissulfídica; (Q) Genes do grupo de regulação do metabolismo do colesterol. Os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene.

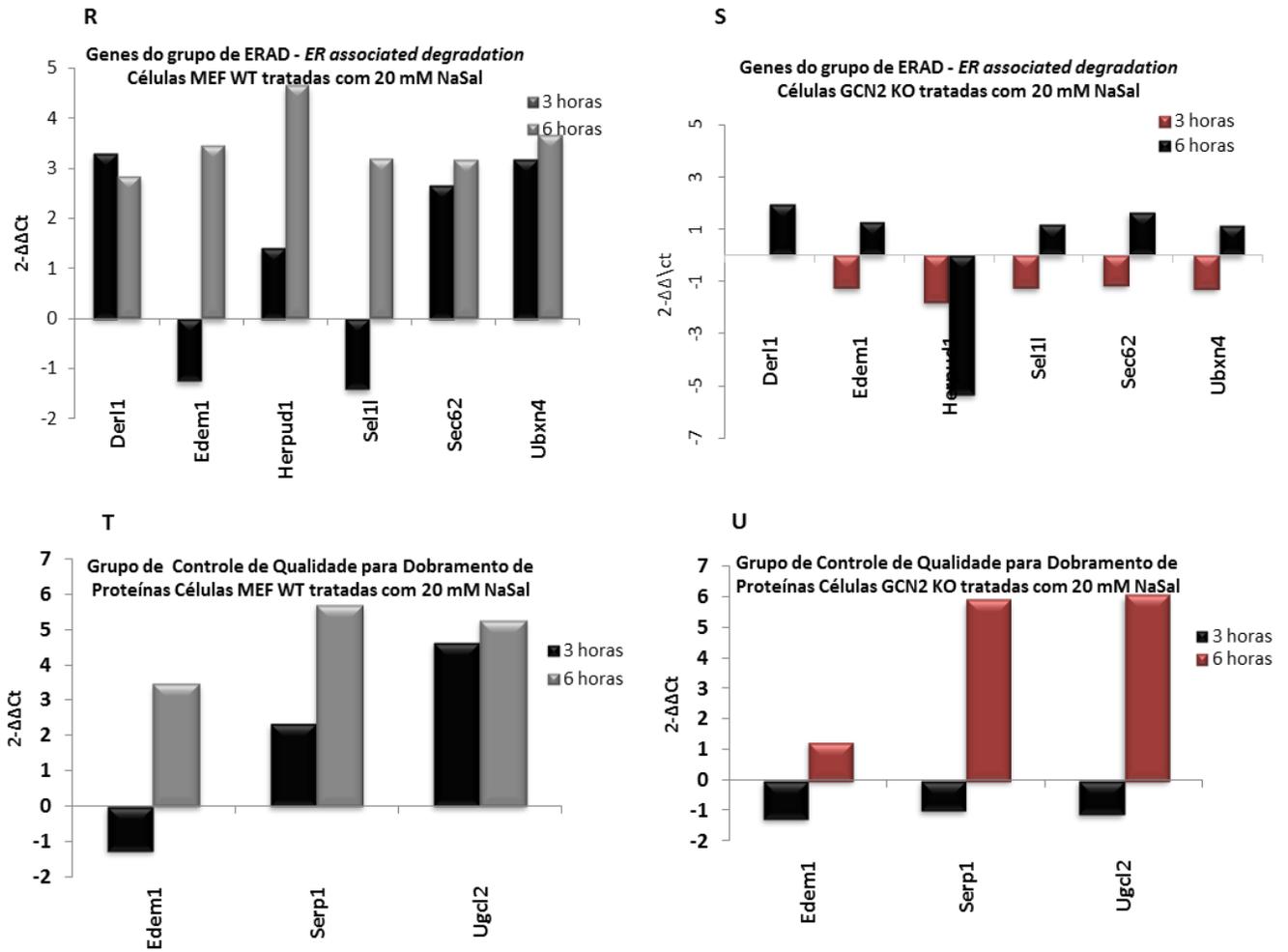


Figura 13: Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFs WT e GCN2 KO tratados com NaSal, de acordo com o seu enquadramento em grupos funcionais. (R,S) Genes do grupo de ERAD; (T,U) Genes do grupo de controle de qualidade para dobramento de proteínas. Os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ estão representados pelas barras, e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene.

Tabela 2. Genes de expressão elevada em células GCN2-KO em comparação com células WT.

Gene	Fold increase
<i>Atf4</i>	14.0
<i>Ddit3</i>	3.2
<i>Eif2ak3</i>	3.4
<i>Herpud1</i>	4.3
<i>Mbtps2</i>	4.8
<i>Sil1</i>	3.3
<i>Srebfl</i>	3.6
<i>Srebfl2</i>	3.7
<i>Ubxn4</i>	3.5
<i>Xbp1</i>	3.0

5.5 -Análise da atividade do elemento de resposta ao estresse do RE (ERSE) presente no promotor de CHOP após tratamento com NaSal

Demonstrou-se no arranjo de PCR quantitativa em tempo real que o gene *Ddit3* que codifica o fator de transcrição CHOP foi significativamente induzido nas células WT, porém com expressão reduzida nas células GCN2- KO após tratamento por 6 horas com NaSal. A fim de avaliar se o tratamento com o NaSal provocaria um aumento de expressão de CHOP no nível transcricional, conduziu-se um ensaio de gene repórter da luciferase onde células WT foram transfectadas com o plasmídeo pGL3-ERSE que contém a sequência de ERSE (*ER stress response element*) que está localizado na região promotora de CHOP. Ainda, as células foram co-transfectadas com o plasmídeo pRL-TK para posterior determinação da atividade da luciferase e normalização dos resultados. Hipotetizou-se que o tratamento com NaSal poderia

resultar na ativação de ERSE. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram tratadas com 20 mM NaSal nos tempos indicados. Como demonstrado na Figura 14 A, foi observado claramente que o tratamento com NaSal por diferentes intervalos de tempo causou um aumento significativo da atividade da luciferase quando comparado aos controles não tratados. Pode ser observado que após 3 horas de tratamento, a ativação de ERSE foi a mais expressiva, de acordo com o aumento da atividade relativa da luciferase. Nos tempos posteriores, essa resposta inicial começa a diminuir gradativamente nos tempos de 5 e 7 horas. Não foi observado um aumento da atividade da luciferase nas células tratadas com 5 mM DTT, pelo menos nas condições testadas. Em outro experimento, cujos resultados são apresentados na Figura 14 B, a análise da atividade de ERSE foi examinada em ambas as linhagens WT e GCN2-KO após 6 horas de tratamento com NaSal (tempo maior de ativação do mRNA de CHOP detectado no arranjo da PCR em tempo real). Ademais, foi utilizado neste experimento outro indutor bem conhecido de estresse do RE a tunicamicina (5 µg/ml). O resultado mostrou que a atividade da luciferase nas células WT foi 3,3 vezes induzida pelo tratamento por NaSal quando comparado ao controle não tratado. Por outro lado, nas células GCN2-KO, a atividade da luciferase após o tratamento com NaSal resultou em uma aumento de apenas 1,6 vezes quando comparado ao controle não tratado. Nas condições testadas, o tratamento com tunicamicina induziu menor atividade da luciferase quando comparadas às células MEF WT tratadas com NaSal. Estes resultados sugerem que a ativação transcricional de CHOP induzida por NaSal deve ser mediada através da ativação de ERSE presente na região promotora do gene (Ubeda e Habener, 2000), (Yoshida, Haze *et al.*, 1998).

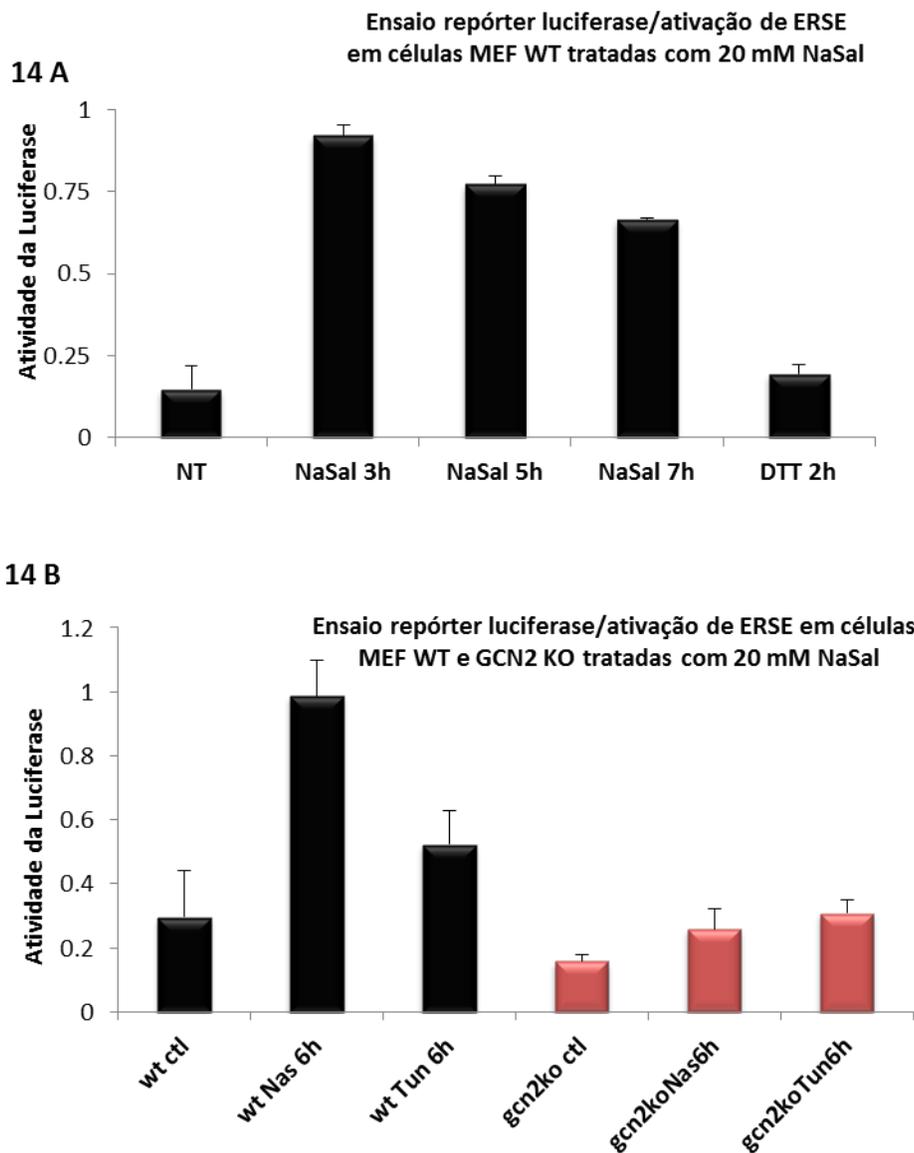


Figura 14: Análise da ativação dos elementos responsivos ao estresse do RE (ERSE) em células WT e GCN2 KO tratadas com NaSal. (A): MEFs WT foram transfectados com os plasmídeos pGL3-ERSE e pRL-TK. Após 24 horas, células foram estimuladas com 20 mM NaSal ou 5 mM DTT nos tempos indicados. (B): MEFs WT ou GCN2 KO foram transfectados com os plasmídeos citados em (A) e estimulados com 20 mM NaSal ou 5 µg/µl tunicamicina por 6 horas. Os extratos celulares foram coletados e as atividades das luciferases determinadas pela captura da luminescência em luminômetro. Os resultados foram normalizados pela razão da atividade da luciferase do vagalume sobre a de *Renilla*. Os ensaios conduzidos em triplicata.

5.6 – Efeito do tratamento com NaSal sobre a fosforilação de GCN2

Experimentos prévios conduzidos em nosso laboratório onde utilizou-se um anticorpo anti-GCN2 fosforilado (fosfo-GCN2 Thr₈₉₈, Cell Signaling), mostraram em análises de *Western Blot* que o tratamento de MEFs WT com NaSal resulta na fosforilação de GCN2 (dados não mostrados). Entretanto, por razões desconhecidas, este anticorpo foi descontinuado pelo fabricante. Diante disto, outro anticorpo anti-GCN2 fosforilado (fosfo-GCN2 Thr₈₉₉ – Abcam) disponível comercialmente foi utilizado. A qualidade dos resultados de *Western-Blot* obtidos com esse novo anticorpo para a detecção de fosfo-GCN2 em extratos de células tratadas com NaSal apresentou-se bastante inferior quando comparado ao do outro fabricante, embora apresentasse maior especificidade. Como pode ser observado na Figura 15 A, MEFs WT e GCN2-KO foram estimulados por 30 minutos com NaSal e ASA (aspirina) e também por luz ultravioleta (UV) por 5 minutos. Os resultados mostram que GCN2 é fortemente fosforilada em células WT expostas à luz UV (canaleta 4), porém não foi detectada fosforilação de GCN2 nas amostras de células WT tratadas com os salicilatos. E como esperado, não pode ser observado nenhuma banda de GCN2 fosforilada, no tamanho esperado, nas células GCN2-KO tratadas nas mesmas condições. O “*stripping*” de membrana com GCN2 total demonstra a presença de bandas correspondentes ao tamanho de GCN2 total nas canaletas (1 a 4) nas células MEF WT tratadas por salicilatos e estimuladas por luz UV. Nas células GCN2 KO tratadas nas mesmas condições, não foi observado nenhuma banda para GCN2 total o que vem a confirmar a deleção do gene *gcn2* e consequente ausência da proteína GCN2, além da especificidade do anticorpo utilizado. Contudo, para melhor investigar se a fosforilação de GCN2 poderia ser detectada em extratos de células tratadas por diferentes intervalos de tempo com NaSal, foi realizado o western-blot conforme figura 15 B. Pode ser observado a presença de uma banda correspondente ao tamanho esperado para GCN2 fosforilada nas canaletas (6 e 7) em células WT tratadas por 20 mM NaSal nos tempos de 6 e 8 horas, respectivamente. O “*stripping*” de membrana com o anticorpo GCN2 total também foi observado a presença de bandas mais intensas nas canaletas (6 e 7) que correspondem ao tamanho esperado para GCN2 total.

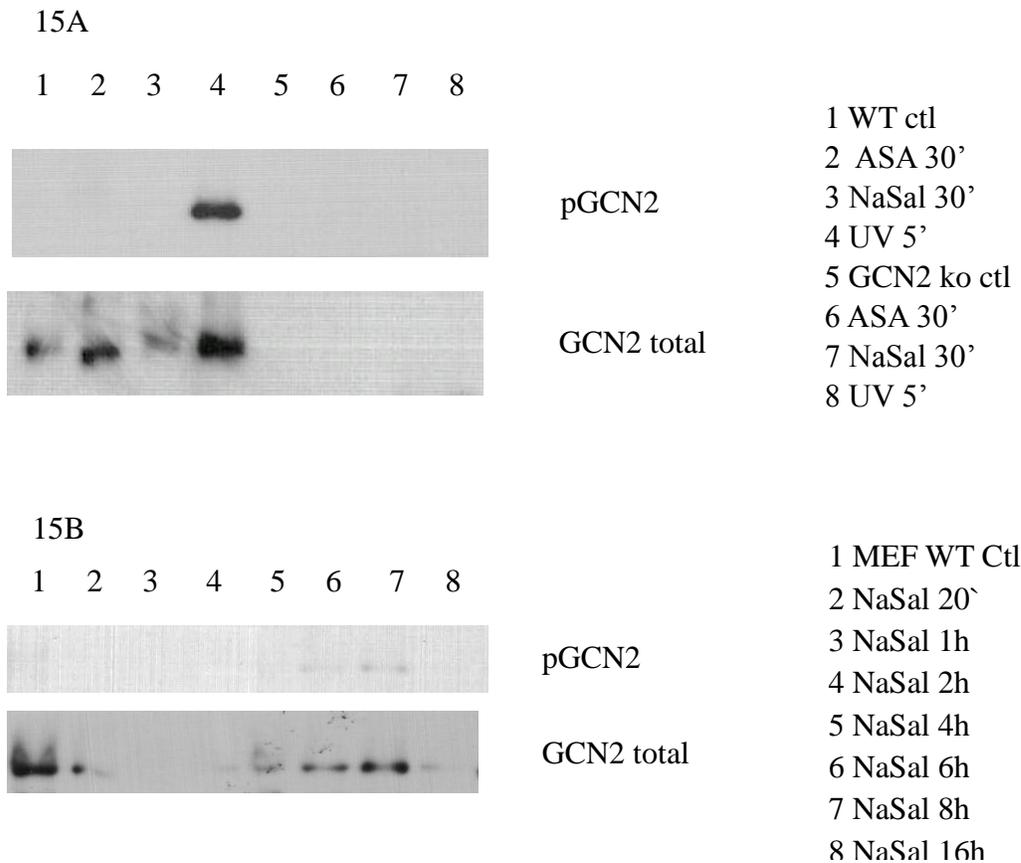


Figura 15: A fosforilação de GCN2 em células MEF WT e GCN2 KO tratadas com NaSal. (A) Células MEF WT e GCN2 KO foram estimuladas com 10mM ASA (aspirina) , 20 mM NaSal e luz ultravioleta nos tempos indicados. Após os tratamentos, os extratos foram coletados, fracionados em SDS-PAGE, transferidos para a membrana de PVDF e incubados com o anticorpo pGCN2 (1:1000) e GCN2 total (1:1000). Ctl (controle não tratado). (B) Células MEF WT foram tratadas com 20mM NaSal nos tempos indicados. Após os tratamentos, os extratos celulares foram coletados e processados como citado em (A).

5.7 - Requerimento de PERK e GCN2 na fosforilação de eIF2-alfa

Foi demonstrado por Silva e colaboradores que o tratamento de células humanas ou murinas com salicilatos resulta na fosforilação de eIF2-alfa (Silva et al, 2007). Para determinar se a fosforilação de eIF2-alfa induzida por NaSal requer o envolvimento de PERK ou GCN2, ou ambos, MEFs selvagens transfectados ou não com siRNA de GCN2 ou deficientes de PERK foram tratados nos tempos indicados, e os extratos celulares analisados. Como pode ser

observado, ocorre uma robusta fosforilação de eIF2-alfa em MEFs selvagens tratados com 20 mM NaSal nos tempos analisados (20, 60 e 120 minutos). Em MEFs transfectados com siRNA de GCN2 observa-se uma fosforilação atenuada de eIF2-alfa. Entretanto, nas células PERK nocaute tratadas com 20 mM NaSal não ocorreu fosforilação de eIF2-alfa, indicando que PERK está envolvida na a fosforilação de eIF2-alfa em MEF tratados com NaSal Figura 16. A validação da eficiência do silenciamento de GCN2 com os siRNAs utilizados está demonstrada no item 5.9, Figura 18.

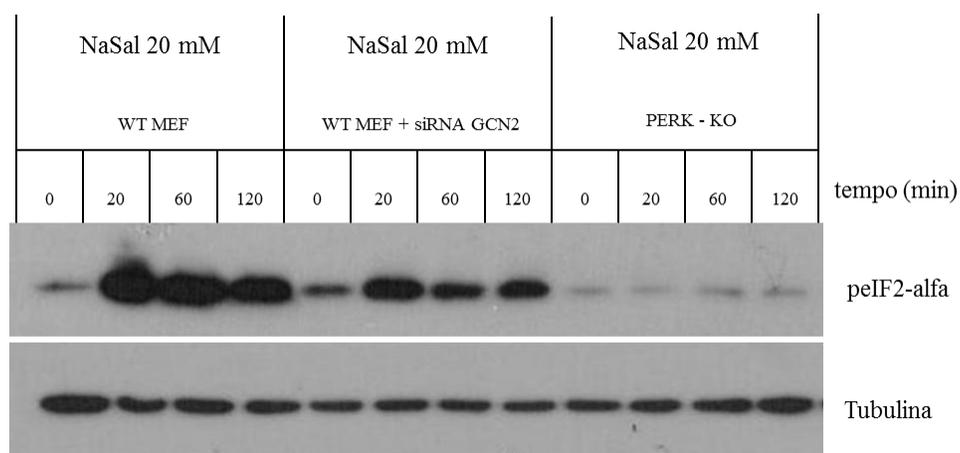


Figura 16: Requerimento parcial de GCN2, porém total de PERK para a fosforilação de eIF2-alfa induzida por NaSal. Células MEF selvagens e PERK KO foram tratadas com 20 mM de salicilato de sódio (NaSal) nos tempos indicados e MEF selvagens foram transfectados com siRNA para GCN2 por 24 horas e posteriormente tratados com 20 mM NaSal nos tempos indicados. Após os tratamentos os extratos celulares foram coletados, fracionados em SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e incubados com os anticorpos peIF2-alfa (1:1000) e Tubulina (1:2000). Controles: tempo zero células não tratadas.

5.8 - A inibição da síntese proteica em MEFs tratados com NaSal

A regulação da função de GCN2 sobre a fosforilação de eIF2-alfa pode ser demonstrada através de ensaio de inibição da síntese proteica. Portanto, decidimos investigar se a tradução do mRNA de um gene repórter transfectado como, por exemplo, a luciferase (clonada nos vetores pGL3-promoter ou pRL-TK) poderia ser medida nas células WT e GCN2 tratadas com NaSal. Ensaio semelhante a esse já foi descrito por Peters e colaboradores (Peters, Hartmann *et al.*, 2001) que demonstra o efeito bloqueador do ativador de PKR, PACT, sobre a tradução do mRNA de uma proteína repórter. Contudo, ao medir e normalizar a atividade da luciferase nos extratos obtidos de MEFs WT e GCN2-KO tratados ou não com NaSal ou DTT, pode ser observado na Figura 17 que as células WT tratadas com 20 mM NaSal ou 5 mM DTT

apresentaram uma redução da atividade do gene repórter de até 48% e 56% respectivamente, podendo ser devido a uma inibição da síntese proteica induzida por esses agentes. Entretanto, essa inibição não foi observada em células deficientes de GCN2, podendo indicar o envolvimento de GCN2 na inibição da síntese proteica em células tratadas com NaSal.

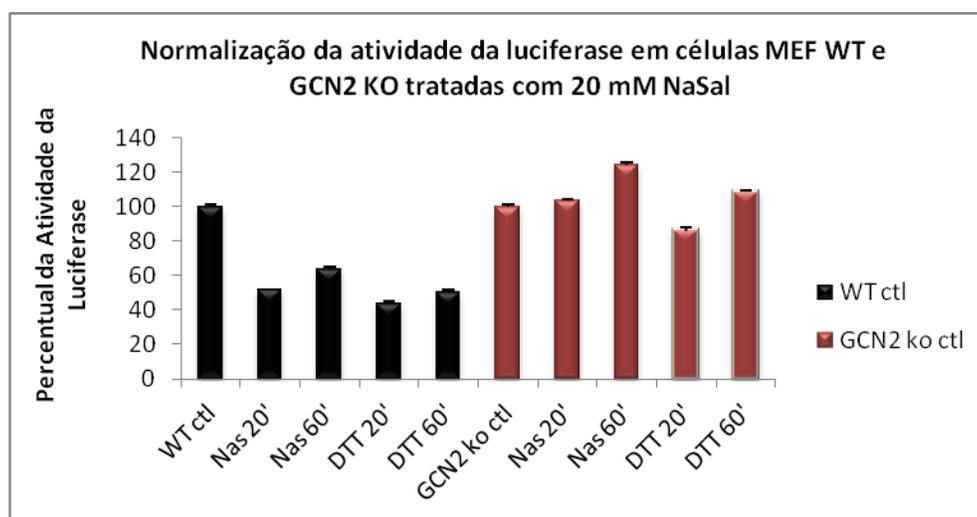


Figura 17: NaSal inibe a síntese proteica com a participação de GCN2. MEFs WT e GCN2-KO foram transfectados com os plasmídeos pGL3-promoter e pRL-TK por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com 20 mM NaSal ou 5 mM DTT nos tempos indicados, quando ao final os extratos foram obtidos para leitura em luminômetro. Os resultados foram primeiramente normalizados pela atividade da luciferase por micrograma de extrato utilizado. Em seguida, os extratos foram normalizados pela porcentagem de aumento ou diminuição das atividades das luciferases das amostras tratadas com a do controle WT ou GCN2-KO não tratado.

5.9 - O silenciamento de GCN2 por siRNAs

Neste experimento células HEK 293T (rim de embrião humano) foram transfectadas com siRNAs (356, 357, 358 e pool) com objetivo de testar e comprovar a eficiência do silenciamento de GCN2 com três sequências de siRNAs distintas que foram obtidos da Invitrogen. As células HEK 293T foram utilizadas devido sua alta permissividade à transfecção, permitindo, assim, uma análise mais precisa do silenciamento de GCN2. Após 24 horas de transfecção os extratos foram coletados e o imunoensaio realizado com os dois anticorpos: GCN2 total e anti-FLAG GCN2. O plasmídeo pGCN2-FLAG possui a sequência completa de GCN2 murino clonada “*in frame*” à uma sequência nucleotídica do peptídeo FLAG (DYKDDDDK) para detecção em ensaios de Western Blot. Observa-se que o silenciamento de GCN2 foi eficiente, quando comparado ao controle transfectado e sem siRNA. O siRNA 356 e o *pool* dos três apresentaram eficiência de silenciamento estimada em pelo menos 80% após 24 horas de transfecção. Estes resultados do silenciamento forneceram evidência da eficácia do silenciamento de GCN2, sendo importantes para aumentar o grau de confiabilidade nos resultados obtidos nos ensaios de silenciamento de GCN2 em MEFs.

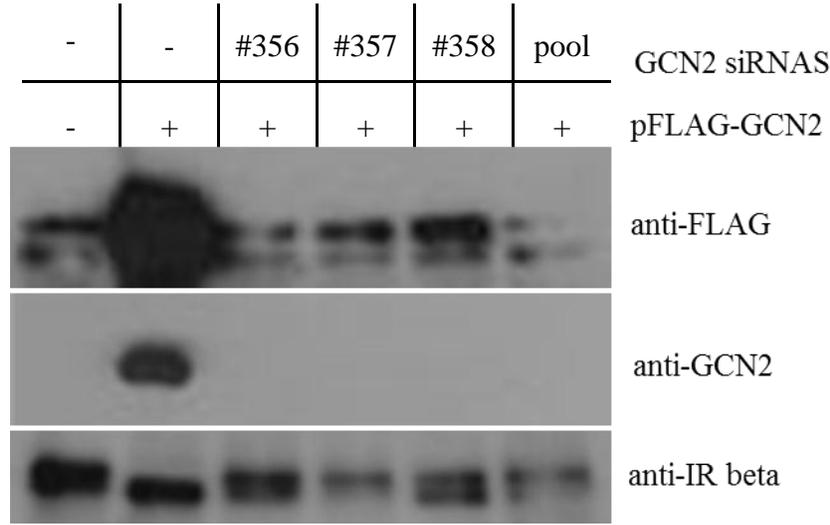


Figura 18: O silenciamento de GCN2 em células HEK 293T. Células HEK 293T não transfectadas (-), transfectadas com o plasmídeo pFLAG-GCN2 wt e co-transfectadas com o plasmídeo pFLAG-GCN2 wt + siRNAs de GCN2 (356,357,358, pool dos três siRNAs anteriores) por 24 horas. Os extratos celulares foram coletados, fracionados em SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e incubados com os anticorpos anti-GCN2 total (1:1000) e anti-FLAG-GCN2 (1:40.000). Stripping de membrana com anti-IR beta (receptor de insulina) (1:1000) utilizado como normalizador.

5.10 - A fosforilação de JNK induzida por NaSal

Os resultados do arranjo de PCR quantitativa em tempo real, demonstraram que o mRNA de *Mapk8* (*MAPK8/JNK*), foi induzido 3.2 vezes nas células MEF WT após tratamento com NaSal por 6 horas. Já foi demonstrado em vários trabalhos de Schwenger e colaboradores que os salicilatos podem ativar p38MAPK e JNK cinases e em alguns casos podem inibir a ativação de JNK (Schwenger, Skolnik *et al.*, 1996), (Schwenger, Bellosta *et al.*, 1997), (Schwenger, Alpert *et al.*, 1998), (Schwenger, Alpert *et al.*, 1999). Para determinar se PERK e GCN2 estão envolvidas na fosforilação de JNK, células MEF WT e PERK KO foram transfectadas ou não com siRNA para GCN2 e posteriormente tratadas com 20mM NaSal nos tempos de 20, 60 e 180 minutos para realização do Western Blot. Neste experimento observa-

se uma acentuada fosforilação de JNK1/2 em células MEF WT tratadas com 20 mM NaSal nos tempos de 20, 60 e 180 minutos. Os níveis de JNK total não tiveram variação frente ao tratamento com NaSal. Nas células PERK nocaute tratadas com NaSal nos tempos de 20 e 60 minutos, ocorre a fosforilação de JNK porém em níveis bem mais baixos quando comparados as células MEF WT o que sugere que PERK tem uma participação ativa na fosforilação desta cinase e também da cooperação de uma outra cinase, possivelmente GCN2, na fosforilação de JNK embora em níveis não tão expressivos quanto na presença de PERK Figura 19.

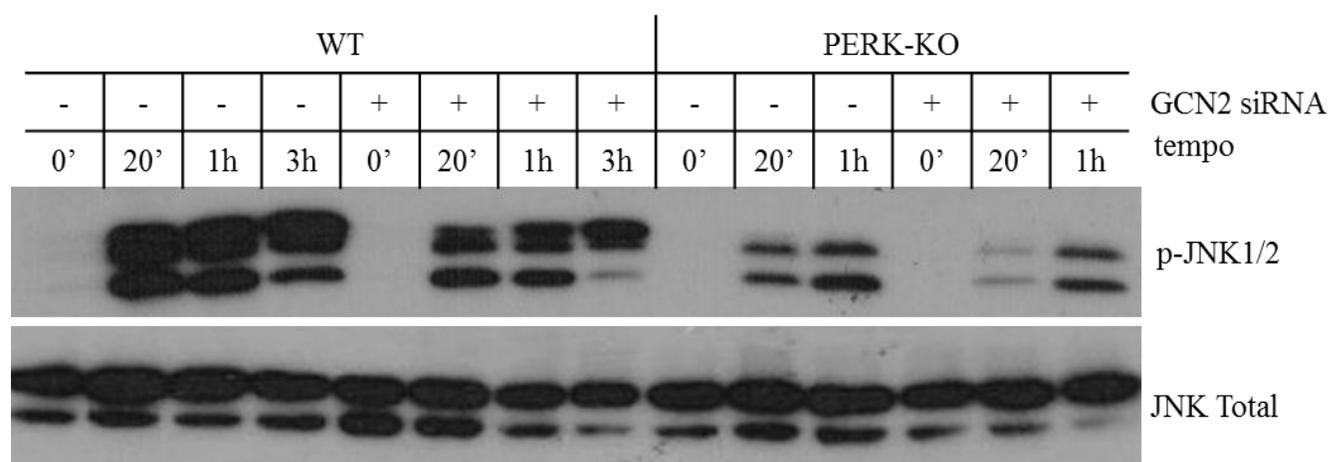


Figura 19: PERK é requerida para a fosforilação de JNK induzida por NaSal. Células MEF selvagens e PERK KO foram transfectadas ou não com siRNA para GCN2 e posteriormente tratadas com 20 mM de salicilato de sódio (NaSal) nos tempos indicados. Após os tratamentos, os extratos celulares foram coletados, fracionados em SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e incubadas com os anticorpos pJNK (1:1000), JNK total (1:1000). Controles: tempo zero células não tratadas.

Discussão

6 Discussão

Estudos com o salicilato de sódio indicam o potencial para utilização deste fármaco em terapias contra o câncer devido sua capacidade de inibir o crescimento celular (Shiff, Qiao *et al.*, 1995), da habilidade de induzir a diferenciação (Bunce, Mountford *et al.*, 1996) e de induzir a apoptose (Shiff, Koutsos *et al.*, 1996). A ativação de caspases, a diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 membro da família Bcl-2, e mudanças na expressão de genes apoptóticos foram descritos mais recentemente em células normais e cancerosas quando tratadas com salicilato de sódio e aspirina (Klampfer, Cammenga *et al.*, 1999; Masud, Mohapatra *et al.*, 2007; Iglesias-Serret, Pique *et al.*, 2010; Wei, Ding *et al.*, 2010). Foi demonstrado por Silva e colaboradores (Silva, Wang *et al.*, 2007) que os salicilatos podem levar a inibição da tradução de mRNAs através da cinase PERK. Além disto, foi também demonstrado que os salicilatos aumentam a expressão do fator de transcrição CHOP (gadd153/Ddit3). Entretanto, a indução de CHOP pelos salicilatos foi somente parcialmente dependente de PERK e não requeria a participação de PKR e também parecia não depender de IRE1 porque os salicilatos não induziram a clivagem de XBP-1 mediada por IRE1 (dados de PKR e de IRE1 obtidos no laboratório pelo Prof. Aristóblo). Estas observações sugerem que uma outra eIF2-alfa cinase, além de PERK, ou algum mediador paralelo ao estresse do RE poderia contribuir para a ativação de CHOP induzida pelos salicilatos. Nossos dados em ensaios de *Western Blot* demonstraram que GCN2 é fosforilada quando as células MEF são tratadas com NaSal. Com base nestas informações, nós investigamos se ao induzir a apoptose os salicilatos poderiam modular o padrão de expressão de genes relacionados a UPR de maneira dependente da eIF2-alfa cinase GCN2.

Os resultados obtidos com a marcação de anexina V e iodeto de propídeo, indicam que o NaSal induz a morte celular em células MEF WT após 16 horas de exposição. Entretanto, nas células nocaute de GCN2, os efeitos de NaSal na morte celular foram dramaticamente reduzidos. Embora GCN2 seja uma das cinases que fosforilam eIF2-alfa sob condições específicas de estresse tais como, deprivação de soro e aminoácidos, ou pela irradiação por luz ultravioleta

(Wek, Jackson *et al.*, 1989; Berlanga, Santoyo *et al.*, 1999; Kimball, 2001; Deng, Harding *et al.*, 2002), é possível que a inibição da tradução do mRNA mediada pela fosforilação de eIF2-alfa não represente um mecanismo pelo qual as células GCN2 KO tratadas com NaSal seriam mais resistentes à morte celular e sim, devido à menor indução de genes que respondem ao estresse do RE pela via UPR. Portanto, foi avaliado o perfil de expressão de uma variedade de genes os quais respondem ao estresse do RE/UPR, incluindo genes apoptóticos. Os resultados obtidos dos arranjos de PCR quantitativa em tempo real revelaram que as células GCN2 KO induziram um número bem menor de genes apoptóticos os quais respondem a indução do estresse no RE.

Os três genes que codificam os sensores da UPR, quais sejam: IRE1 alfa, ATF6 e PERK foram todos induzidos em níveis significativos nas células MEF WT após o tratamento com 20 mM NaSal (7,7; 8,7 e 3,3) vezes respectivamente.

Em relação a BiP/GRP78, não observamos nenhum aumento na expressão do mensageiro desta chaperona. É sabido que BiP é uma das proteínas críticas para a sobrevivência ao estresse do RE, a qual facilita o dobramento e montagem de proteínas, e pode agir como um sensor no RE através de sua atividade de ligação ao cálcio (Lee, 2007). Nenhum dos mRNAs de IRE1 α , ATF6, PERK e BiP tiveram a expressão aumentada nas células GCN2 KO tratadas com NaSal.

Analisando os dados obtidos no contexto de apoptose, IRE1 é um dos três sensores que sob estresse prolongado está diretamente associado a vias de morte celular. A ativação de ASK1/JNK (*apoptosis signaling-regulating kinase/c-jun-N-terminal kinase*) através do complexo IRE1 α /TRAF2 (*tumor necrosis associated factor 2*), pode pelo menos em parte, mediar a apoptose sob condições irreversíveis de estresse do RE de maneira análoga à sinalização do receptor de TNF (*tumor necrosis factor*) (Kanda e Miura, 2004; Mauro, Crescenzi *et al.*, 2006).

Foi bem estabelecido por Schwenger e colaboradores (Schwenger, Bellosta *et al.*, 1997; Schwenger, Alpert *et al.*, 1998; 1999) que os salicilatos induzem a fosforilação de JNK e p38 MAPK. Nossos dados demonstraram que o transcrito de Mapk8/JNK1 está aumentado nas

células MEF WT tratadas com NaSal. Os resultados de *Western Blot* mostraram claramente que PERK é requerida para a fosforilação de JNK induzida por NaSal, mas GCN2 também pode contribuir para a fosforilação de JNK. Isto é altamente indicativo de um processo de estabelecimento de apoptose. Tabas e Ron (2011), propuseram um mecanismo integrado de apoptose induzido pelo estresse do RE envolvendo principalmente IRE1, CHOP e ativação de outros genes pro-apoptóticos e inibição de genes pró-sobrevivência (Tabas e Ron, 2011). É de suma importância ressaltar que os fatores de transcrição CHOP e C/EBP beta, o qual forma heterodímeros com CHOP, foram marcadamente induzidos após o tratamento com NaSal nas células MEF WT. O mensageiro de CHOP nas células GCN2 KO tratadas com NaSal foi induzido, porém, em menor proporção (oito vezes menos) e o mensageiro de C/EBP beta não mostrou nenhum aumento em sua expressão nas células GCN2 KO tratadas com NaSal. Já foi demonstrado que CHOP se liga ao DNA de maneira similar à proteína FOS, porém não forma homodímeros estáveis (Ubeda, Wang *et al.*, 1996; Ubeda, Vallejo *et al.*, 1999). CHOP depende da heterodimerização com outras proteínas, dentre elas, C/EBP para exercer as funções de controle da transcrição gênica (Ron e Habener, 1992). Nossos estudos com o plasmídeo repórter contendo o elemento ERSE do promotor de CHOP resultou em aumento da atividade da luciferase nas células MEF WT, confirmando que o NaSal pode ativar o promotor de CHOP. Entretanto, na ausência de GCN2, a atividade da luciferase não aumentou de maneira significativa. A ativação residual da luciferase observada nas células GCN2 KO poderia ser uma ativação transcricional mediada por uma via dependente de PERK (Silva, Wang *et al.*, 2007). Ainda dentro do mecanismo proposto por Tabas e Ron acima citado, CHOP pode ter implicações na indução da apoptose no estresse oxidativo. O estresse prolongado do RE pode ocasionar tanto a hiperoxidação do lúmen do RE resultando no vazamento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para o citoplasma, quanto induzir diretamente espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma. A oxidação do lúmen do RE é induzida por CHOP o qual ativa a oxidase ERO1 alfa no RE (Marciniak, Yun *et al.*, 2004). Interessante mencionar que em condições fisiológicas normais, ERO1 promove a formação de pontes dissulfeto nas novas proteínas traduzidas mas, o silenciamento parcial de *ero-1* em *Caenorhabditis elegans* protege este organismo da morte induzida pela tunicamicina, um indutor de estresse do RE (Marciniak, Yun *et al.*, 2004). Isto leva a especulação de que sob estresse prolongado, ERO1 pode promover uma ambiente de alta oxidação o que leva a morte celular (Tabas e Ron, 2011). Dados recentes

in vitro e *in vivo* têm demonstrado que a apoptose induzida por CHOP envolve a ativação de vias pró-apoptóticas citoplasmáticas de sinalização de cálcio (Li, Mongillo *et al.*, 2009; Timmins, Ozcan *et al.*, 2009). Em particular, a apoptose induzida pela UPR-CHOP pode ser bloqueada pelo tamponamento de cálcio citoplasmático (Seimon, Obstfeld *et al.*, 2006). O cálcio citoplasmático induz a apoptose pela ativação da cinase sensora de cálcio CaMKII a qual, por sua vez, leva a ativação de uma cascata de vias apoptóticas (Timmins, Ozcan *et al.*, 2009; Li, Scull *et al.*, 2010). O papel de ERO1 alfa foi sugerido pela observação de que a indução de ERO1 alfa por CHOP ativa a liberação do canal de cálcio IP3R1 no RE, um evento crucial para ativar a sinalização em resposta ao cálcio citoplasmático (Li, Mongillo *et al.*, 2009). A ativação do canal IP3R1 por ERO1 alfa pode envolver a formação de pontes dissulfeto no domínio luminal de IP3R1 (Marciniak, Yun *et al.*, 2004; Higo, Hattori *et al.*, 2005). Nossos dados para ERO1 demonstram uma indução de 6.3 vezes deste mensageiro, o que pode dar suporte para o estabelecimento de apoptose induzida pelo NaSal.

Até então não há nenhum dado mostrando que NaSal pode induzir o mRNA do fator de transcrição ATF6. ATF6 tem papel principal na indução de chaperonas e pode também induzir transcricionalmente CHOP. Embora o papel de ATF6 na apoptose não seja muito claro, foi demonstrado que ATF6 pode mediar a apoptose através da redução de Mcl-1. Níveis mais baixos de ATF6 ativa função de defesa (*self-defense*) da UPR, porém em níveis mais elevados, ATF6 pode mediar a apoptose (Morishima, Nakanishi *et al.*, 2011).

Um outro alvo transcricional de CHOP, a fosfatase GADD34 que promove a desfosforilação do fator eIF2-alfa, restaurando assim a tradução de proteínas, pode representar um outro mecanismo pró-apoptótico sob prolongada expressão de CHOP. Dados obtidos no nosso arranjo mostram que o mRNA da fosfatase Ppp1R5b/CreP (*constitutively repressor of eIF2 alpha phosphorylation*) é induzido 6,5 vezes nas células MEF WT, mas não nas células GCN2 KO após tratamento com NaSal. Dados da inibição de Ppp1R5b/CreP por siRNA promoveram a sobrevivência de células de mamíferos (HT22) sob estresse oxidativo e de acúmulo de proteínas mal formadas (Jousse, Oyadomari *et al.*, 2003).

Em relação à fosforilação de eIF2-alfa, o tratamento das células WT com NaSal resultou numa forte fosforilação de eIF2-alfa. Os siRNAs específicos para GCN2 causaram uma redução na fosforilação de eIF2-alfa em todos os tempos investigados. Entretanto, as células PERK KO tratadas com NaSal tiveram um nível de fosforilação basal de eIF2-alfa bastante similar ao controle não tratado. Estes resultados indicam que embora GCN2 participe na fosforilação de eIF2-alfa induzida pelo tratamento com NaSal, PERK é requerida e parece representar o componente celular chave para a fosforilação de eIF2-alfa induzida pelo tratamento com NaSal. Entretanto, entre outros tipos de estresse como, por exemplo, sob hipóxia, MEFs GCN2 KO fosforilam eIF2-alfa e induzem ATF4. Por outro lado, MEFs PERK KO fosforilam eIF2-alfa e induzem ATF4 sob carência de glicina. Isto constitui um forte indicativo de que GCN2 e PERK cooperam entre si para conferir resistência sob diferentes formas de estresse (Ye, Kumanova *et al.*, 2010). A precisa função e contribuição de cada componente na via de resistência ao estresse e crescimento de tumor irá requerer mais análises da ativação de cada via, com marcadores específicos bem como a correlação com cada tipo de estresse *in vivo* (Ye, Kumanova *et al.*, 2010). Nós especulamos que o fato de que nas células PERK KO tratadas com NaSal não ocorra a fosforilação de eIF2-alfa nos tempos testados, isto pode caracterizar uma dependência inicial da ativação de PERK para lidar com o estresse causado pelo NaSal e que em tempos posteriores, GCN2 é ativada. Já foi demonstrado que a fosforilação de eIF2-alfa ocorre 20 minutos após o tratamento de células com NaSal (Silva, Wang *et al.*, 2007). Este resultado dá suporte à idéia de que primeiramente as células utilizam a UPR para reduzir o estresse através da indução de PERK, ATF6 e ATF4. Entretanto, se a ativação das vias de sobrevivência não forem capazes de lidar com o estresse e retomar o estágio fisiológico normal das células, ou até mesmo retornar a um nível baixo e controlado de estresse, isto acarretará numa mudança da programação para as vias de apoptose. Neste contexto, GCN2 parece ser a cinase que em tempos posteriores, tem mesmo função importante na coordenação de vias que levam a apoptose no RE.

Tendo esta premissa em mente, é importante mencionar que o fator de transcrição ATF4 exhibe uma diferença marcante de 14 vezes dos níveis transcricionais aumentados nas células GCN2 KO quando comparamos com as células MEF WT, ambas não tratadas por NaSal. O sítio IRES (*internal ribosomal entry site*) do mRNA de ATF4 pode escapar do bloqueio da tradução

dependente de eIF2-alfa (Schroder e Kaufman, 2005) permitindo, assim, que o mRNA de ATF4 seja somente traduzido após a fosforilação de eIF2-alfa. ATF4 promove a sobrevivência celular através da indução de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações oxidativas, resposta ao estresse e secreção de proteínas (Harding, Zhang *et al.*, 2003). Entretanto, nem todos os genes induzidos por ATF4 são anti-apoptóticos. CHOP pode ser regulado por ATF4. Em nosso arranjo, o mRNA de PERK é um dos poucos genes que está aumentado nas células GCN2 KO. É sabido que PERK induz ATF4 e que a via de PERK pode promover uma vantagem para a sobrevivência de células tumorais sob condições de hipóxia (Fels e Koumenis, 2006). Além dos níveis elevados do mRNA de PERK, os fatores de transcrição Srebf1 e Srebf2 estão também presentes em níveis elevados 3,6 e 3,7 vezes, respectivamente nas células GCN2 KO não tratadas com NaSal. Já foi demonstrado que o promotor de ATF4 possui sítios de ligações para estes fatores (Rome, Lecomte *et al.*, 2008). Isto pode explicar porque o mRNA de ATF4 está presente em níveis elevados nas células GCN2 KO. Por outro lado, não pode ser descartado que o aumento do mRNA de ATF4 não é somente devido ao aumento da transcrição mas sim devido a meia vida longa do mRNA de ATF4. Em células não estressadas, o mRNA de ATF4 tem uma meia vida relativamente pequena. Mas por outro lado, foi demonstrado que o programa NMR (*Nonsense-mediated RNA decay*) é inibido em células sob condições de hipóxia e que transcritos de genes relacionados a UPR, incluindo ATF4 podem ser estabilizados 2 a 3 vezes após a ocorrência da fosforilação de eIF2-alfa (Gardner, 2008). Nossos dados demonstram que a exposição de NaSal não aumenta os níveis basais do mRNA de ATF4 encontrados nas células GCN2 KO. Nas células MEF WT, o tratamento com NaSal aumenta o mRNA de ATF4 a níveis similares, 13 vezes, quando comparado às células GCN2 KO.

Alguns autores defendem que a via GCN2-ATF4 é crítica para manter a homeostase em células tumorais em resposta a carência de nutrientes, tornando este fato um atrativo em potencial para terapias antitumorais (Ye, Kumanova *et al.*, 2010). GCN2 pode ajudar células tumorais sob estresse a sobreviver melhor provavelmente pela diminuição da síntese protéica. Se isto for correto, nossos dados de algum modo contradizem esta afirmação porque muitos genes relacionados a UPR não podem ser ativados pelo tratamento com NaSal na ausência de GCN2. Num contexto de inibição de GCN2, ocorreria o favorecimento das células tumorais

sobreviverem ao estresse prolongado sem programar a apoptose. Bortezomib é um fármaco quimioterapêutico aprovado, que age inibindo o proteasomo 26S. ATF4 pode proteger as células pela indução da apoptose provocada por Bortezomib (Milani, Rzymiski *et al.*, 2009). Nós especulamos que em células nas quais ATF4 está elevado, como em GCN2 KO, o salicilato de sódio não induz apoptose de maneira eficiente. ATF4 é o fator principal induzido por hipóxia e anóxia, assim como na deficiência de nutrientes incluindo baixos níveis de glicose. A expressão de ATF4 é maior em células cancerosas quando comparado a células normais. Recentemente, foi demonstrado que ATF4 provoca resistência nas células a tratamentos com múltiplas drogas anti-cancer. Um dos poucos genes induzidos nas células GCN2 nocaute tratadas com NaSal foi Ugcg2 com função conhecida na resistência ao tratamento com múltiplas drogas (Igarashi, Izumi *et al.*, 2007).

Levando-se em consideração que NaSal pode aumentar a expressão de muitos genes pró-apoptóticos importantes e relacionados a UPR, poderia ser considerado o emprego dos salicilatos e seus derivados sozinhos, ou em combinação com outros conhecidos agentes quimioterápicos para aumentar a atividade antitumoral destes agentes. A baixa toxicidade dos salicilatos e seus derivados fazem com que estes compostos devam ser ainda mais investigados na pesquisa contra o câncer. E finalmente, os eventos moleculares que definem uma via em particular do RE estão dinamicamente evoluindo. Devido a homeostase do RE ser absolutamente requerida para a vida, as células eucarióticas desenvolveram vários mecanismos para a sobrevivência durante os tempos de estresse. Entretanto, mesmo após o conhecimento gerado na década passada, pode-se concluir que os fatores que governam a decisão entre a vida e morte celular durante o estresse do RE não são mutuamente exclusivos.

Conclusão

7 Conclusão

Após a realização deste trabalho, podemos inferir que o o salicilato de sódio leva a indução de genes relacionados à via de proteínas mal enoveladas (UPR), através da fosforilação de cinases como GCN2, culminando com a indução de genes com funções pró-apoptóticas. Dessa forma, este estudo contribui para o avanço no entendimento de vias moleculares específicas do retículo endoplasmático que levam à morte celular, demonstrando assim, a importância da continuação dos estudos com salicilato de sódio na pesquisa contra o câncer. O esquema abaixo sumariza os principais genes induzidos pelo salicilato de sódio que podem levar a ativação de vias apoptóticas no retículo endoplasmático.

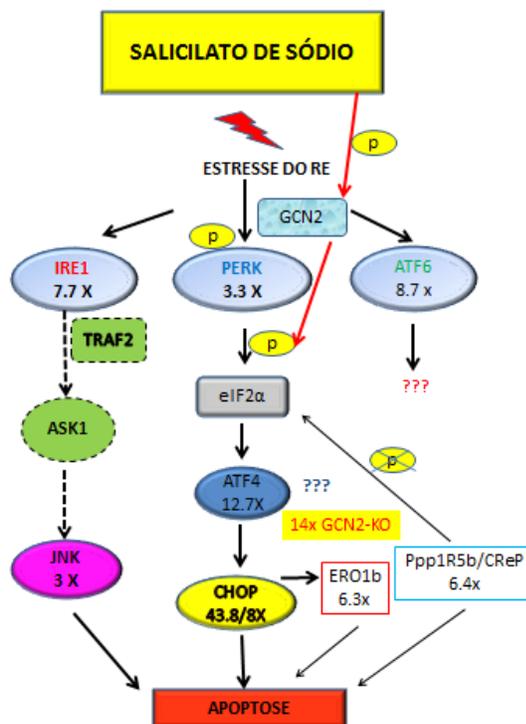


Figura 20: Representação esquemática de genes da UPR induzidos por NaSal

8 Anexo

GENE TABLE			
Position	Symbol	Gene Bank	Description
A01	Amfr	NM_011787	Autocrine motility factor receptor
A02	Armet	NM_029103	Arginine-rich, mutated in early stage tumors
A03	Atf4	NM_009716	Activating transcription factor 4
A04	Atf6	NM_001081304	Activating transcription factor 6
A05	Atf6b	NM_017406	Activating transcription factor 6 beta
A06	Atnx3	NM_029705	Ataxin 3
A07	Bax	NM_007527	Bcl2-associated X protein
A08	Carl	NM_007591	Calreticulim
A09	Canx	NM_007597	Calnexin
A10	Cct4	NM_009837	Chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta)
A11	Cct7	NM_007638	Chaperonin containing Tcp1, subunit 7 (eta)
A12	Cebpb	NM_009883	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
B01	Creb3	NM_013497	CAMP responsive element binding protein 3
B02	Creb3l3	NM_145365	CAMP responsive element binding protein 3-like 3
B03	Ddit3	NM_007837	DNA-damage inducible transcript 3
B04	Der1l	NM_024207	Der1-like domain family, member 1
B05	Der12	NM_033562	Der1-like domain family, member 2
B06	Dnajb2	NM_178055	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2
B07	Dnajb9	NM_013760	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
B08	Dnajc10	NM_024181	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10
B09	Dnajc3	NM_008929	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3

B10	Dnajc4	NM_020566	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4
B11	Edem1	NM_138677	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
B12	Edem3	NM_001039644	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3
C01	Eif2a	NM_001005509	Eukaryotic translation initiation factor 2a
C02	Eifak3	NM_010121	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
C03	Ern1	NM_023913	Endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1
C04	Ern2	NM_012016	Endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 3
C05	Ero1l	NM_015774	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
C06	Ero1lb	NM_026184	ERO1-like beta (<i>S. cerevisiae</i>)
C07	Erp44	NM_029572	Endoplasmic reticulum protein 44
C08	Fbx06	NM_015797	F-box protein 6
C09	Ganab	NM_008060	Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit
C10	Ganc	NM_172672	Glucosidase, alpha; neutral C
C11	H47	NM_024439	Histocompatibility 47
C12	Herpud1	NM_022331	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
D01	Hspa1l	NM_013558	Heat shock protein 1-like
D02	Hspa2	NM_008301	Heat shock protein 2
D03	Hspa4	NM_008300	Heat shock protein 4
D04	Hspa4l	NM_011020	Heat shock protein 4 like
D05	Hspa5	NM_022310	Heat shock protein 5
D06	Hspb9	NM_029307	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9
D07	Hsph1	NM_013559	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1
D08	Htra2	NM_019752	HtrA serine peptidase 2
D09	Htra4	NM_001081187	HtrA serine peptidase 4
D10	Insig1	NM_153526	Insulin induced gene 1
D11	Insig2	NM_178082	Insulin induced gene 2

D12	Mapk10	NM_009158	Mitogen-activated protein kinase 10
E01	Mapk8	NM_016700	Mitogen-activated protein kinase 8
E02	Mapk9	NM_016961	Mitogen-activated protein kinase 9
E03	Mbtps1	NM_019709	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
E04	Mbtps2	NM_172307	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 2
E05	Nploc4	NM_199469	Nuclear protein localization 4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
E06	Nuc1b	NM_008749	Nucleobindin 1
E07	Os9	NM_177614	Amplified in osteosarcoma
E08	Pdia3	NM_007952	Protein disulfide isomerase associated 3
E09	Pfdn2	NM_011070	Prefoldin 2
E10	Pfdn5	NM_027044	Prefoldin 5
E11	Ppia	NM_008907	Peptidylprolyl isomerase A
E12	Ppp1r15b	NM_133819	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b
F01	Prkesh	NM_008925	Protein kinase C substrate 80K-H
F02	Rnf139	NM_175226	Ring finger protein 139
F03	Rnf5	NM_019403	Ring finger protein 5
F04	Rpn1	NM_133933	Ribophorin I
F05	Scap	NM_001001144	SREBF chaperone
F06	Sec62	NM_027016	SEC62 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F07	Sec63	NM_153055	SEC63 like(<i>S. cerevisiae</i>)
F08	Sel1l	NM_001039089	Sel-1 suppressor of lin-12-like (<i>C. elegans</i>)
F09	Serp1	NM_030685	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
F10	Sil1	NM_030749	Endoplasmic reticulum chaperone SIL1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F11	Srebf1	NM_011480	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
F12	Srebf2	NM_033218	Sterol regulatory element binding factor 2
G01	Syvn1	NM_028769	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin

G02	Tcp1	NM_013686	T-complex protein 1
G03	Tor1a	NM_144884	Torsin family 1, member A (torsin A)
G04	Ube2g2	NM_019803	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2
G05	Ube2j2	NM_001039157	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 homolog (yeast)
G06	Ubxn4	NM_026390	UBX domain protein 4
G07	Ufd11	NM_011672	Ubiquitin fusion degradation 1 like
G08	Ugcgl1	NM_198899	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1
G09	Ugcgl2	NM_001081252	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2
G10	Usp14	NM_021522	Ubiquitin specific peptidase 14
G11	Vcp	NM_009503	Valosin containing protein
G12	Xbp1	NM_013842	X-box binding protein 1
H01	Gusb	NM_010368	Glucuronidase, beta
H02	Hprt1	NM_013556	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
H03	Hsp90ab1	NM_008302	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H04	Gapdh	NM_008302	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	Actb	NM_007393	Actin, beta
H06	MGDC	SA_00106	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	RTC	SA_00104	Reverse Transcription Control
H08	RTC	SA_00104	Reverse Transcription Control
H09	RTC	SA_00104	Reverse Transcription Control
H10	PPC	SA_00103	Positive PCR Control
H11	PPC	SA_00103	Positive PCR Control
H12	PPC	SA_00103	Positive PCR Control

9 Referências Bibliográficas

- Abraham, N., D. F. Stojdl, *et al.* Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. J Biol Chem, v.274, n.9, Feb 26, p.5953-62. 1999.
- Adibi, S. A. Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition. Metabolism, v.25, n.11, Nov, p.1287-302. 1976.
- Adrain, C., B. M. Murphy, *et al.* Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. J Biol Chem, v.280, n.6, Feb 11, p.4663-73. 2005.
- Amann, R. e B. A. Peskar. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. Eur J Pharmacol, v.447, p.1-9. 2002.
- Anthony, D. A., D. M. Andrews, *et al.* Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. Immunol Rev, v.235, n.1, May, p.73-92.
- Anthony, T. G., B. J. Mcdaniel, *et al.* Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. J Biol Chem, v.279, n.35, Aug 27, p.36553-61. 2004.
- Asada, R., S. Kanemoto, *et al.* The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. J Biochem, v.149, n.5, May, p.507-18. 2011.
- Aubry, J. P., A. Blaecke, *et al.* Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. Cytometry, v.37, n.3, Nov 1, p.197-204. 1999.
- Balachandran, S., P. C. Roberts, *et al.* Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. Immunity, v.13, n.1, p.129-41. 2000.
- Baron, S. H. Salicylates as hypoglycemic agents. Diabetes Care, v.5, n.1, p.64-71. 1982.
- Barr, R. K. e M. A. Bogoyevitch. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). Int J Biochem Cell Biol, v.33, n.11, Nov, p.1047-63. 2001.
- Belmont, P. J., A. Tadimalla, *et al.* Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. J Biol Chem, v.283, n.20, May 16, p.14012-21. 2008.
- Berlanga, J. J., S. Herrero, *et al.* Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. J Biol Chem, v.273, n.48, p.32340-6. 1998.

- Berlanga, J. J., J. Santoyo, *et al.* Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. Eur J Biochem, v.265, p.754-62. 1999.
- Berlanga, J. J., I. Ventoso, *et al.* Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. EMBO J, v.25, n.8, Apr 19, p.1730-40. 2006.
- Bernales, S., F. R. Papa, *et al.* Intracellular signaling by the unfolded protein response. Annu Rev Cell Dev Biol, v.22, p.487-508. 2006.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, *et al.* Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol, v.2, p.326-32. 2000.
- Bi, M., C. Naczki, *et al.* ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. Embo J, v.24, n.19, p.3470-81. Epub 2005 Sep 8. 2005.
- Botting, R. M. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. Pharmacol Rep, v.62, n.3, May-Jun, p.518-25. 2010.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-54. 1976.
- Bunce, C. M., J. C. Mountford, *et al.* Potentiation of myeloid differentiation by anti-inflammatory agents, by steroids and by retinoic acid involves a single intracellular target, probably an enzyme of the aldoketoreductase family. Biochim Biophys Acta, v.1311, n.3, May 28, p.189-98. 1996.
- Calfon, M., H. Zeng, *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature, v.415, n.6867, p.92-6. 2002.
- Chakrabarti, A., A. W. Chen, *et al.* A review of the mammalian unfolded protein response. Biotechnol Bioeng, v.108, n.12, Dec, p.2777-93. 2011.
- Charriaut-Marlangue, C., I. Margail, *et al.* Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. J Cereb Blood Flow Metab, v.16, n.2, Mar, p.186-94. 1996.
- Chefalo, P. J., J. Oh, *et al.* Heme-regulated eIF-2alpha kinase purifies as a hemoprotein. Eur J Biochem, v.258, p.820-30. 1998.
- Chen, J. J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. Blood, v.109, n.7, Apr 1, p.2693-9. 2007.
- Chen, J. J., J. S. Crosby, *et al.* Regulation of heme-regulated eIF-2 alpha kinase and its expression in erythroid cells. Biochimie, v.76, n.8, p.761-9. 1994.
- Chen, J. J. e I. M. London. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. Trends Biochem Sci, v.20, n.3, Mar, p.105-8. 1995.

- Chen, X., J. Shen, *et al.* The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. J Biol Chem., v.277, n.15, p.13045-52. Epub 2002 Jan 30. 2002.
- Chen, Z., Y. Benureau, *et al.* GB virus B disrupts RIG-I signaling by NS3/4A-mediated cleavage of the adaptor protein MAVS. J Virol., v.81, n.2, p.964-76. Epub 2006 Nov 8. 2007.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol Cell, v.8, n.3, Sep, p.705-11. 2001.
- Cheung, H. H., N. Lynn Kelly, *et al.* Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. Exp Cell Res, v.312, n.12, Jul 15, p.2347-57. 2006.
- Clemens, M. J. Protein kinases that phosphorylate eIF2 and eIF2B, their role in eukaryotic cell translational control. In: J. W. Hershey, M. B. Mathews, *et al* (Ed.). Translational Control. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. Protein kinases that phosphorylate eIF2 and eIF2B, their role in eukaryotic cell translational control, p.139-172
- Costa-Mattioli, M., D. Gobert, *et al.* Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. Nature, v.436, n.7054, Aug 25, p.1166-73. 2005.
- Cox, J. S., R. E. Chapman, *et al.* The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. Mol Biol Cell, v.8, n.9, Sep, p.1805-14. 1997.
- Cox, J. S., C. E. Shamu, *et al.* Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. Cell, v.73, n.6, Jun 18, p.1197-206. 1993.
- Cox, J. S. e P. Walter. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. Cell, v.87, n.3, Nov 1, p.391-404. 1996.
- Creagh, E. M., H. Conroy, *et al.* Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. Immunol Rev, v.193, Jun, p.10-21. 2003.
- Crosby, J. S., K. Lee, *et al.* Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase. Mol Cell Biol, v.14, n.6, Jun, p.3906-14. 1994.
- Cuervo, A. M. Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol, v.14, n.2, Feb, p.70-7. 2004.
- Dahmer, M. K. Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. J Neurosci Res, v.80, n.4, May 15, p.576-83. 2005.
- De Duve, C. e R. Wattiaux. Functions of lysosomes. Annu Rev Physiol, v.28, p.435-92. 1966.
- Demaurex, N. e C. Distelhorst. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. Science, v.300, n.5616, Apr 4, p.65-7. 2003.

- Deng, J., H. P. Harding, *et al.* Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. Curr Biol, v.12, n.15, p.1279-86. 2002.
- Donze, O., J. Deng, *et al.* The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. EMBO J, v.23, n.3, Feb 11, p.564-71. 2004.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, *et al.* Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem, v.68, p.383-424. 1999.
- Ebstein, W. Zur therapie des diabetes mellitus, insbesondere uber die anwendung des salicylsauren natron bei demselben. Berliner Klinische Wochenschrift, v.24, p.337-340. 1877.
- Eizirik, D. L., A. K. Cardozo, *et al.* The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocr Rev, v.29, n.1, Feb, p.42-61. 2008.
- Fawcett, T. W., J. L. Martindale, *et al.* Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. Biochem J, v.339 (Pt 1), Apr 1, p.135-41. 1999.
- Fels, D. R. e C. Koumenis. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. Cancer Biol Ther, v.5, n.7, Jul, p.723-8. 2006.
- Ferreira, S. H., S. Moncada, *et al.* Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. Nat New Biol, v.231, p.237-9. 1971.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, *et al.* Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta, v.1757, n.9-10, Sep-Oct, p.1371-87. 2006.
- Frank, S., B. Gaume, *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Dev Cell, v.1, n.4, Oct, p.515-25. 2001.
- Friedlander, R., E. Jarosch, *et al.* A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nat Cell Biol, v.2, n.7, Jul, p.379-84. 2000.
- Fu, H. Y., K. Okada, *et al.* Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. Circulation, v.122, n.4, Jul 27, p.361-9. 2010.
- Garcia, M. A., J. Gil, *et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. Microbiol Mol Biol Rev, v.70, n.4, Dec, p.1032-60. 2006.
- Gardner, L. B. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. Mol Cell Biol, v.28, n.11, Jun, p.3729-41. 2008.
- Gilgore, S. G. e J. J. Rupp. Response of blood glucose to intravenous salicylate. Metabolism, v.10, p.419-21. 1961.

- Golstein, P. e G. Kroemer. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci, v.32, n.1, Jan, p.37-43. 2007.
- Gotoh, T., S. Oyadomari, *et al.* Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. J Biol Chem., v.277, n.14, p.12343-50. Epub 2002 Jan 22. 2002.
- Gotoh, T., K. Terada, *et al.* hsp70-DnaJ chaperone pairs prevent nitric oxide-mediated apoptosis in RAW 264.7 macrophages. Cell Death Differ, v.8, n.4, Apr, p.357-66. 2001.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature, v.379, n.6560, Jan 4, p.88-91. 1996.
- Greten, F. R., L. Eckmann, *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell, v.118, n.3, Aug 6, p.285-96. 2004.
- Groenendyk, J. e M. Michalak. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. Acta Biochim Pol., v.52, n.2, p.381-95. Epub 2005 May 31. 2005.
- Guo, F. e D. R. Cavener. The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. Cell Metab, v.5, n.2, Feb, p.103-14. 2007.
- Gupta, R. A. e R. N. Dubois. Aspirin, NSAIDS, and colon cancer prevention: mechanisms? Gastroenterology, v.114, n.5, May, p.1095-8. 1998.
- Gutteridge, J. M. e J. Mitchell. Redox imbalance in the critically ill. Br Med Bull, v.55, n.1, p.49-75. 1999.
- Hai, T. W., F. Liu, *et al.* Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. Genes Dev, v.3, n.12B, Dec, p.2083-90. 1989.
- Halestrap, A. P., P. M. Kerr, *et al.* Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. Biochim Biophys Acta, v.1366, n.1-2, Aug 10, p.79-94. 1998.
- Han, A. P., C. Yu, *et al.* Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. Embo J, v.20, p.6909-18. 2001.
- Harding, H. P., I. Novoa, *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell, v.6, p.1099-108. 2000.
- Harding, H. P., H. Zeng, *et al.* Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. Mol Cell, v.7, p.1153-63. 2001.
- Harding, H. P., Y. Zhang, *et al.* Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Mol Cell, v.5, p.897-904. 2000.

_____. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature, v.397, p.271-4. 1999.

_____. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell, v.11, n.3, p.619-33. 2003.

Haynes, C. M., E. A. Titus, *et al.* Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. Mol Cell, v.15, n.5, Sep 10, p.767-76. 2004.

Haze, K., T. Okada, *et al.* Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. Biochem J, v.355, n.Pt 1, p.19-28. 2001.

Haze, K., H. Yoshida, *et al.* Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, v.10, n.11, p.3787-99. 1999a.

_____. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, v.10, n.11, Nov, p.3787-99. 1999b.

Hetz, C., P. Bernasconi, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. Science, v.312, n.5773, Apr 28, p.572-6. 2006.

Higo, T., M. Hattori, *et al.* Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. Cell, v.120, n.1, Jan 14, p.85-98. 2005.

Hinnebusch, A. G. The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. Semin Cell Biol, v.5, n.6, p.417-26. 1994a.

_____. Translational control of GCN4: an in vivo barometer of initiation-factor activity. Trends Biochem Sci, v.19, n.10, p.409-14. 1994b.

Hollander, M. C., Q. Zhan, *et al.* Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. J Biol Chem, v.272, n.21, May 23, p.13731-7. 1997.

Hollien, J., J. H. Lin, *et al.* Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. J Cell Biol, v.186, n.3, Aug 10, p.323-31. 2009.

Hollien, J. e J. S. Weissman. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. Science, v.313, n.5783, Jul 7, p.104-7. 2006.

Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell, v.140, n.6, Mar 19, p.900-17. 2010.

- Hu, P., Z. Han, *et al.* Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. Mol Cell Biol, v.26, n.8, Apr, p.3071-84. 2006.
- Huerta, S., E. J. Goulet, *et al.* Screening and detection of apoptosis. J Surg Res, v.139, n.1, May 1, p.143-56. 2007.
- Igarashi, T., H. Izumi, *et al.* Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene, v.26, n.33, Jul 19, p.4749-60. 2007.
- Iglesias-Serret, D., M. Pique, *et al.* Aspirin induces apoptosis in human leukemia cells independently of NF-kappaB and MAPKs through alteration of the Mcl-1/Noxa balance. Apoptosis, v.15, n.2, Feb, p.219-29. 2010.
- Iqbal, J., K. Dai, *et al.* IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. Cell Metab, v.7, n.5, May, p.445-55. 2008.
- Iwata, A., J. C. Christianson, *et al.* Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.37, Sep 13, p.13135-40. 2005.
- Iwawaki, T., A. Hosoda, *et al.* Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. Nat Cell Biol, v.3, n.2, p.158-64. 2001.
- Jiang, H. Y. e R. C. Wek. GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. Biochem J, v.385, n.Pt 2, Jan 15, p.371-80. 2005.
- Jimbo, A., E. Fujita, *et al.* ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. Exp Cell Res, v.283, n.2, Feb 15, p.156-66. 2003.
- Jousse, C., S. Oyadomari, *et al.* Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. J Cell Biol, v.163, n.4, p.767-75. 2003.
- Kanda, H. e M. Miura. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. J Biochem, v.136, n.1, Jul, p.1-6. 2004.
- Kaufman, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J Clin Invest, v.110, n.10, Nov, p.1389-98. 2002.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, *et al.* The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.6, p.411-21. 2002.
- Kerr, D. S., M. C. Stevens, *et al.* Fasting metabolism in infants: II. The effect of severe undernutrition and infusion of alanine on glucose production estimated with U-13C-glucose. Metabolism, v.27, n.7, Jul, p.831-48. 1978.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, v.26, n.4, Aug, p.239-57. 1972.

- Kimball, S. R. Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. Prog Mol Subcell Biol, v.26, p.155-84. 2001.
- Kiss, K., J. Kiss, *et al.* Sodium salicylate inhibits NF-kappaB and induces apoptosis in PC12 cells. J Biochem Biophys Methods, v.61, n.1-2, Oct 29, p.229-40. 2004.
- Klampfer, L., J. Cammenga, *et al.* Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. Blood, v.93, p.2386-94. 1999.
- Klionsky, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. J Cell Sci, v.118, n.Pt 1, Jan 1, p.7-18. 2005.
- Kopp, E. e S. Ghosh. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science, v.265, p.956-9. 1994.
- Koumenis, C. ER Stress, Hypoxia Tolerance and Tumor Progression. Curr Mol Med., v.6, n.1, p.55-69. 2006.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, *et al.* The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature, v.332, n.6163, Mar 31, p.462-4. 1988.
- Kujubu, D. A. e H. R. Herschman. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. J Biol Chem, v.267, n.12, Apr 25, p.7991-4. 1992.
- Kumar, K. U., S. P. Srivastava, *et al.* Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. Mol Cell Biol, v.19, p.1116-1125. 1999.
- Lane, J. D., J. Lucocq, *et al.* Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. J Cell Biol, v.156, n.3, Feb 4, p.495-509. 2002.
- Larner, S. F., R. L. Hayes, *et al.* Unfolded protein response after neurotrauma. J Neurotrauma, v.23, n.6, Jun, p.807-29. 2006.
- Leber, J. H., S. Bernales, *et al.* IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. PLoS Biol, v.2, n.8, Aug, p.E235. 2004.
- Lee, A. S. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. Cancer Res, v.67, n.8, Apr 15, p.3496-9. 2007.
- Lee, E. S., C. H. Yoon, *et al.* The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. FEBS Lett., v.581, n.22, p.4325-32. Epub 2007 Aug 14. 2007.
- Levesque, H. e O. Lafont. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. Rev Med Interne, v.21 Suppl 1, Mar, p.8s-17s. 2000.
- Levine, B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. Cell, v.120, n.2, Jan 28, p.159-62. 2005.

Levine, B. e D. J. Klionsky. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell, v.6, n.4, Apr, p.463-77. 2004.

Li, G., M. Mongillo, *et al.* Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J Cell Biol, v.186, n.6, Sep 21, p.783-92. 2009.

Li, G., C. Scull, *et al.* NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. J Cell Biol, v.191, n.6, Dec 13, p.1113-25. 2010.

Li, J., B. Lee, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. J Biol Chem, v.281, n.11, Mar 17, p.7260-70. 2006.

Lin, J. H., H. Li, *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. Science, v.318, n.5852, Nov 9, p.944-9. 2007.

_____. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. PLoS One, v.4, n.1, p.e4170. 2009.

Lipson, K. L., R. Ghosh, *et al.* The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. PLoS One, v.3, n.2, p.e1648. 2008.

Liu, N., V. L. Scofield, *et al.* Interaction between endoplasmic reticulum stress and caspase 8 activation in retrovirus MoMuLV-ts1-infected astrocytes. Virology, v.348, n.2, May 10, p.398-405. 2006.

Liu, Y., C. Laszlo, *et al.* Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation. Neoplasia, v.12, n.1, Jan, p.61-8. 2010.

Liu, Z. R., A. M. Wilkie, *et al.* Detection of double-stranded RNA-protein interactions by methylene blue-mediated photo-crosslinking. RNA, v.2, n.6, Jun, p.611-21. 1996.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods., v.25, n.4, p.402-8. 2001.

Lu, L., A. P. Han, *et al.* Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. Mol Cell Biol, v.21, p.7971-80. 2001.

Lum, J. J., R. J. Deberardinis, *et al.* Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.6, Jun, p.439-48. 2005.

Marciniak, S. J. e D. Ron. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. Physiol Rev, v.86, n.4, Oct, p.1133-49. 2006.

Marciniak, S. J., C. Y. Yun, *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. Genes Dev., v.18, n.24, p.3066-77. 2004.

Masferrer, J. L., K. M. Leahy, *et al.* Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer Res, v.60, n.5, Mar 1, p.1306-11. 2000.

Masson, D. e J. Tschopp. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. J Biol Chem, v.260, n.16, Aug 5, p.9069-72. 1985.

Masud, A., A. Mohapatra, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. J Biol Chem, v.282, n.19, May 11, p.14132-9. 2007.

Matsumoto, M., M. Minami, *et al.* Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. FEBS Lett, v.395, n.2-3, Oct 21, p.143-7. 1996.

Mattson, M. P. Hormesis defined. Ageing Res Rev, v.7, n.1, Jan, p.1-7. 2008.

Maurin, A. C., C. Jousse, *et al.* The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. Cell Metab, v.1, n.4, Apr, p.273-7. 2005.

Mauro, C., E. Crescenzi, *et al.* Central role of the scaffold protein tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J Biol Chem, v.281, n.5, Feb 3, p.2631-8. 2006.

Maytin, E. V., M. Ubeda, *et al.* Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. Exp Cell Res, v.267, n.2, Jul 15, p.193-204. 2001.

Mccracken, J. D., W. J. Wechter, *et al.* Antiproliferative effects of the enantiomers of flurbiprofen. J Clin Pharmacol, v.36, n.6, Jun, p.540-5. 1996.

Mccullough, K. D., J. L. Martindale, *et al.* Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol Cell Biol, v.21, p.1249-59. 2001.

Meijer, A. J. e P. Codogno. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol, v.36, n.12, Dec, p.2445-62. 2004.

Mellor, H., K. M. Flowers, *et al.* Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression. J Biol Chem, v.269, n.14, Apr 8, p.10201-4. 1994.

Milani, M., T. Rzymiski, *et al.* The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. Cancer Res, v.69, n.10, May 15, p.4415-23. 2009.

Mitchell, J. A., M. Saunders, *et al.* Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappaB) activation: role of arachidonic acid. Mol Pharmacol, v.51, n.6, Jun, p.907-12. 1997.

Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. Cell Death Differ, v.12 Suppl 2, Nov, p.1535-41. 2005.

Mizushima, N., B. Levine, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature, v.451, n.7182, Feb 28, p.1069-75. 2008.

Moretti, L., Y. I. Cha, *et al.* Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? Cell Cycle, v.6, n.7, Apr 1, p.793-8. 2007.

Mori, K., T. Kawahara, *et al.* Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. Genes Cells, v.1, n.9, Sep, p.803-17. 1996.

Mori, K., W. Ma, *et al.* A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. Cell, v.74, n.4, Aug 27, p.743-56. 1993.

Morishima, N., K. Nakanishi, *et al.* Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) via induction of WW domain binding protein 1. J Biol Chem, Aug 13. 2011.

_____. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. J Biol Chem, v.277, n.37, p.34287-94. Epub 2002 Jul 3. 2002.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Naidoo, N. ER and aging-Protein folding and the ER stress response. Ageing Res Rev, v.8, n.3, Jul, p.150-9. 2009.

Nakagawa, T. e J. Yuan. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J Cell Biol, v.150, n.4, p.887-94. 2000.

Nakagawa, T., H. Zhu, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature, v.403, n.6765, p.98-103. 2000.

Nakamura, T., M. Furuhashi, *et al.* Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. Cell, v.140, n.3, Feb 5, p.338-48. 2010.

Nakanishi, K., T. Sudo, *et al.* Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. J Cell Biol, v.169, n.4, p.555-60. Epub 2005 May 16. 2005.

Narasimhan, J., K. A. Staschke, *et al.* Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. J Biol Chem, v.279, n.22, May 28, p.22820-32. 2004.

Ng, D. T., E. D. Spear, *et al.* The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. J Cell Biol, v.150, n.1, Jul 10, p.77-88. 2000.

- Nguyen, D. T., S. Kebache, *et al.* Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, v.15, n.9, Sep, p.4248-60. 2004.
- Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ, v.6, n.11, Nov, p.1028-42. 1999.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods, v.139, n.2, Jun 3, p.271-9. 1991.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, *et al.* ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. Genes Dev, v.16, n.11, Jun 1, p.1345-55. 2002.
- Novikoff, A. B. e W. Y. Shin. Endoplasmic reticulum and autophagy in rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.75, n.10, Oct, p.5039-42. 1978.
- Novoa, I., H. Zeng, *et al.* Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. J Cell Biol, v.153, p.1011-22. 2001.
- Ohoka, N., S. Yoshii, *et al.* TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. EMBO J, v.24, n.6, Mar 23, p.1243-55. 2005.
- Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol, v.2, n.3, Mar, p.211-6. 2001.
- Oikawa, D., M. Tokuda, *et al.* Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1. Biochem Biophys Res Commun, v.360, n.1, Aug 17, p.122-7. 2007.
- Okada, T., K. Haze, *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, v.278, n.33, p.31024-32. Epub 2003 Jun 2. 2003.
- Okamura, K., Y. Kimata, *et al.* Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. Biochem Biophys Res Commun, v.279, n.2, Dec 20, p.445-50. 2000.
- Oyadomari, S., E. Araki, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. Apoptosis, v.7, n.4, p.335-45. 2002.
- Oyadomari, S., C. Yun, *et al.* Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. Cell, v.126, n.4, Aug 25, p.727-39. 2006.
- Peters, G. A., R. Hartmann, *et al.* Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. Mol Cell Biol, v.21, n.6, Mar, p.1908-20. 2001.

Pierce, J. W., M. A. Read, *et al.* Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. J Immunol, v.156, p.3961-9. 1996.

Podack, E. R., J. D. Young, *et al.* Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.24, Dec, p.8629-33. 1985.

Proud, C. G. PKR: a new name and new roles. Trends Biochem Sci, v.20, n.6, Jun, p.241-6. 1995.

Puthalakath, H., L. A. O'reilly, *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. Cell, v.129, n.7, Jun 29, p.1337-49. 2007.

Rafie-Kolpin, M., P. J. Chefaló, *et al.* Two heme-binding domains of heme-regulated eukaryotic initiation factor-2alpha kinase. N terminus and kinase insertion. J Biol Chem, v.275, p.5171-8. 2000.

Rao, C. V. e B. S. Reddy. NSAIDs and chemoprevention. Curr Cancer Drug Targets, v.4, n.1, Feb, p.29-42. 2004.

Rao, R. V., S. Castro-Obregon, *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem, v.277, n.24, Jun 14, p.21836-42. 2002.

Rao, R. V., H. M. Ellerby, *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ, v.11, n.4, Apr, p.372-80. 2004.

Rao, R. V., E. Hermel, *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. J Biol Chem, v.276, n.36, Sep 7, p.33869-74. 2001.

Ravikumar, B., C. Vacher, *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet, v.36, n.6, Jun, p.585-95. 2004.

Reid, J., A. I. Macdougall, *et al.* Aspirin and diabetes mellitus. Brit. Med.J., v.2, p.1071-1074. 1957.

Robertson, A. M., C. C. Bird, *et al.* Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. J Pathol, v.126, n.3, Nov, p.181-7. 1978.

Rome, S., V. Lecomte, *et al.* Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. Physiol Genomics, v.34, n.3, Aug 15, p.327-37. 2008.

Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. J Clin Invest, v.110, n.10, Nov, p.1383-8. 2002.

Ron, D. e J. F. Habener. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. Genes Dev, v.6, n.3, Mar, p.439-53. 1992.

Ron, D. e S. R. Hubbard. How IRE1 reacts to ER stress. Cell, v.132, n.1, Jan 11, p.24-6. 2008.

Ron, D. e P. Walter. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.7, Jul, p.519-29. 2007.

Ruegsegger, U., J. H. Leber, *et al.* Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. Cell, v.107, n.1, Oct 5, p.103-14. 2001.

Rutkowski, D. T. e R. J. Kaufman. A trip to the ER: coping with stress. Trends Cell Biol, v.14, n.1, Jan, p.20-8. 2004.

Rzymiski, T., M. Milani, *et al.* Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. Cell Cycle, v.8, n.23, Dec, p.3838-47. 2009.

Sakurai, T., S. Maeda, *et al.* Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.28, Jul 11, p.10544-51. 2006.

Samuel, C. E. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. J Biol Chem, v.268, n.11, Apr 15, p.7603-6. 1993.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, *et al.* Growing roles for the mTOR pathway. Curr Opin Cell Biol, v.17, n.6, Dec, p.596-603. 2005.

Sato, Y., S. Nadanaka, *et al.* Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. Cell Struct Funct, v.36, n.1, p.35-47. 2011.

Savill, J. e V. Fadok. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature, v.407, n.6805, Oct 12, p.784-8. 2000.

Scheuner, D., R. Patel, *et al.* Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. J Biol Chem, v.281, n.30, Jul 28, p.21458-68. 2006.

Scheuner, D., B. Song, *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Mol Cell, v.7, n.6, Jun, p.1165-76. 2001.

Schroder, M. e R. J. Kaufman. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem, v.74, p.739-89. 2005.

Schulz, J. B., R. T. Matthews, *et al.* The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. Mol Cell Biochem, v.174, n.1-2, Sep, p.193-7. 1997.

Schwenger, P., D. Alpert, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I kappaB alpha phosphorylation and degradation. Mol Cell Biol, v.18, p.78-84. 1998.

_____. Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates. J Cell Physiol, v.179, p.109-14. 1999.

Schwenger, P., P. Bellosta, *et al.* 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, v.94, p.2869-73. 1997.

Schwenger, P., E. Y. Skolnik, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-induced p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by sodium salicylate. J Biol Chem, v.271, p.8089-94. 1996.

Scorrano, L. Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. Cell Death Differ, v.10, n.12, Dec, p.1287-9. 2003.

Scorrano, L., S. A. Oakes, *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. Science, v.300, n.5616, Apr 4, p.135-9. 2003.

Seglen, P. O. e P. Bohley. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia, v.48, n.2, Feb 15, p.158-72. 1992.

Seimon, T. A., A. Obstfeld, *et al.* Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.52, Dec 26, p.19794-9. 2006.

Shamu, C. E. e P. Walter. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. EMBO J, v.15, n.12, Jun 17, p.3028-39. 1996.

Shao, J., T. Fujiwara, *et al.* Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. Oncogene, v.19, n.6, Feb 10, p.726-36. 2000.

Shen, J., X. Chen, *et al.* ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell, v.3, n.1, p.99-111. 2002.

Sheng, H., J. Shao, *et al.* Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res, v.58, n.2, Jan 15, p.362-6. 1998.

Shi, Y., K. M. Vattem, *et al.* Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. Mol Cell Biol, v.18, n.12, p.7499-509. 1998.

Shiff, S. J., M. I. Koutsos, *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. Exp Cell Res, v.222, n.1, Jan 10, p.179-88. 1996.

Shiff, S. J., L. Qiao, *et al.* Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. J Clin Invest, v.96, n.1, Jul, p.491-503. 1995.

Shintani, T. e D. J. Klionsky. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science, v.306, n.5698, Nov 5, p.990-5. 2004.

Silva, A. M., D. Wang, *et al.* Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a PKR-Like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. J Biol Chem, v.282, n.14, p.10164-71. 2007.

Silva, R. M., V. Ries, *et al.* CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. J Neurochem, v.95, n.4, Nov, p.974-86. 2005.

Simmons, D. L., R. M. Botting, *et al.* Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev, v.56, n.3, Sep, p.387-437. 2004.

Smith, J. B. e A. L. Willis. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. Nat New Biol, v.231, n.25, Jun 23, p.235-7. 1971.

Snapp, E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. Curr Protoc Cell Biol, v.Chapter 21, Jul, p.Unit 21 4. 2005.

Song, B., D. Scheuner, *et al.* Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. J Clin Invest, v.118, n.10, Oct, p.3378-89. 2008.

Sood, R., A. C. Porter, *et al.* Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. Biochem J, v.346 Pt 2, p.281-93. 2000.

_____. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. Genetics, v.154, p.787-801. 2000.

Spear, E. D. e D. T. Ng. Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. Mol Biol Cell, v.14, n.7, Jul, p.2756-67. 2003.

Stark, G. R., I. M. Kerr, *et al.* How cells respond to interferons. Annual Review of Biochemistry, v.67, p.227-264. 1998.

Stark, L. A. e M. G. Dunlop. Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-kappaB-driven transcription and apoptosis. Mol Cell Biol, v.25, n.14, Jul, p.5985-6004. 2005.

Stevens, F. J. e Y. Argon. Protein folding in the ER. Semin Cell Dev Biol, v.10, n.5, Oct, p.443-54. 1999.

Stojdl, D. F., N. Abraham, *et al.* The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. J Virol, v.74, n.20, Oct, p.9580-5. 2000.

Szegezdi, E., S. E. Logue, *et al.* Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep, v.7, n.9, Sep, p.880-5. 2006.

Tabas, I. e D. Ron. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Nat Cell Biol, v.13, n.3, Mar, p.184-90. 2011.

Tait, J. F. Imaging of apoptosis. J Nucl Med, v.49, n.10, Oct, p.1573-6. 2008.

Takada, Y., A. Bhardwaj, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. Oncogene, v.23, n.57, Dec 9, p.9247-58. 2004.

Tegeder, I., J. Pfeilschifter, *et al.* Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. Faseb J, v.15, p.2057-72. 2001.

Thun, M. J., S. J. Henley, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. J Natl Cancer Inst, v.94, n.4, Feb 20, p.252-66. 2002.

Timmins, J. M., L. Ozcan, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. J Clin Invest, v.119, n.10, Oct, p.2925-41. 2009.

Tirasophon, W., K. Lee, *et al.* The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. Genes Dev, v.14, n.21, Nov 1, p.2725-36. 2000.

Travers, K. J., C. K. Patil, *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell, v.101, n.3, Apr 28, p.249-58. 2000.

Tsuji, M. e R. N. Dubois. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell, v.83, n.3, Nov 3, p.493-501. 1995.

Ubeda, M. e J. F. Habener. CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. Nucleic Acids Res, v.28, n.24, Dec 15, p.4987-97. 2000.

Ubeda, M., M. Vallejo, *et al.* CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. Mol Cell Biol, v.19, n.11, Nov, p.7589-99. 1999.

Ubeda, M., X. Z. Wang, *et al.* Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. Mol Cell Biol, v.16, p.1479-89. 1996.

Urano, F., X. Wang, *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, v.287, n.5453, p.664-6. 2000a.

_____. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, v.287, n.5453, Jan 28, p.664-6. 2000b.

Van Huizen, R., J. L. Martindale, *et al.* P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. J Biol Chem, v.278, n.18, p.15558-64. 2003.

- Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol, v.231, p.232-5. 1971.
- Vane, J. R. e R. M. Botting. The mechanism of action of aspirin. Thromb Res., v.110, n.5-6, p.255-8. 2003.
- Vattem, K. M. e R. C. Wek. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.31, Aug 3, p.11269-74. 2004.
- Ventura, J. J., A. Hubner, *et al.* Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. Mol Cell, v.21, n.5, Mar 3, p.701-10. 2006.
- Vercammen, D., P. Vandenameele, *et al.* Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. Cytokine, v.9, n.11, Nov, p.801-8. 1997.
- Wang, H. G., N. Pathan, *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. Science, v.284, n.5412, Apr 9, p.339-43. 1999.
- Wang, X. Z. e D. Ron. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. Science, v.272, n.5266, May 31, p.1347-9. 1996.
- Wei, L., D. Ding, *et al.* Salicylate-induced degeneration of cochlea spiral ganglion neurons-apoptosis signaling. Neuroscience, v.168, n.1, Jun 16, p.288-99. 2010.
- Wek, R. C. eIF-2 kinases: regulators of general and gene-specific translation initiation. Trends Biochem Sci, v.19, n.11, Nov, p.491-6. 1994.
- Wek, R. C. e D. R. Cavener. Translational control and the unfolded protein response. Antioxid Redox Signal, v.9, n.12, Dec, p.2357-71. 2007.
- Wek, R. C., B. M. Jackson, *et al.* Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling GCN4 expression to amino acid availability. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.12, Jun, p.4579-83. 1989.
- Wek, R. C., H. Y. Jiang, *et al.* Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. Biochem Soc Trans, v.34, n.Pt 1, Feb, p.7-11. 2006.
- Wek, R. C., M. Ramirez, *et al.* Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of GCN4 expression. Mol Cell Biol, v.10, n.6, Jun, p.2820-31. 1990.
- Wek, R. C. e K. A. Staschke. How do tumours adapt to nutrient stress? EMBO J, v.29, n.12, Jun 16, p.1946-7. 2010.
- Williams, B. R. Signal integration via PKR. Sci STKE, v.2001, p.RE2. 2001.
- Williamson, R. T. e M. D. Lond. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. Brit. Med. J., v.1, p.760-762. 1901.

Wu, C., Y. Ohmori, *et al.* Interferon-stimulated response element and NF kappa B sites cooperate to regulate double-stranded RNA-induced transcription of the IP-10 gene. J Interferon Res., v.14, n.6, p.357-63. 1994.

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

Wu, S., M. Tan, *et al.* Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkkappaBalpha synthesis. J Biol Chem., v.279, n.33, p.34898-902. Epub 2004 Jun 7. 2004.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr, *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol, v.68, p.251-306. 1980.

Xia, Z., M. Dickens, *et al.* Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science, v.270, n.5240, Nov 24, p.1326-31. 1995.

Xie, W. L., J. G. Chipman, *et al.* Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.7, Apr 1, p.2692-6. 1991.

Yamaguchi, H. e H. G. Wang. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. J Biol Chem, v.279, n.44, Oct 29, p.45495-502. 2004.

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

Yamamoto, K., H. Yoshida, *et al.* Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J Biochem (Tokyo). v.136, n.3, p.343-50. 2004.

Yamamoto, Y., M. J. Yin, *et al.* Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. J Biol Chem, v.274, n.38, Sep 17, p.27307-14. 1999.

Yang, H., S. H. Park, *et al.* The integrated stress response-associated signals modulates intestinal tumor cell growth by NSAID-activated gene 1 (NAG-1/MIC-1/PTGF-beta). Carcinogenesis, v.31, n.4, Apr, p.703-11. 2010.

Ye, J., M. Kumanova, *et al.* The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. EMBO J, v.29, n.12, Jun 16, p.2082-96. 2010.

Ye, J., R. B. Rawson, *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell., v.6, n.6, p.1355-64. 2000.

Yoneda, T., K. Imaizumi, *et al.* Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem, v.276, n.17, Apr 27, p.13935-40. 2001.

Yorimitsu, T. e D. J. Klionsky. Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ, v.12 Suppl 2, Nov, p.1542-52. 2005.

Yorimitsu, T., U. Nair, *et al.* Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. J Biol Chem, v.281, n.40, Oct 6, p.30299-304. 2006.

Yoshida, H., K. Haze, *et al.* Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem, v.273, n.50, p.33741-9. 1998.

Yoshida, H., T. Matsui, *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell, v.107, n.7, Dec 28, p.881-91. 2001.

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

Yoshida, H., M. Oku, *et al.* pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. J Cell Biol, v.172, n.4, Feb 13, p.565-75. 2006.

Zhan, Q., K. A. Lord, *et al.* The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. Mol Cell Biol, v.14, n.4, Apr, p.2361-71. 1994.

Zhang, K. e R. J. Kaufman. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.455-62. 2008a.

_____. Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo. Methods Enzymol, v.442, p.395-419. 2008b.

Zhang, K., H. N. Wong, *et al.* The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. J Clin Invest, v.115, n.2, Feb, p.268-81. 2005.

Zhang, P., B. C. Mcgrath, *et al.* The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. Mol Cell Biol, v.22, n.19, p.6681-8. 2002.

Zhang, X., S. G. Morham, *et al.* Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts. J Exp Med, v.190, n.4, Aug 16, p.451-59. 1999.

Zhou, A., J. M. Paranjape, *et al.* Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. Virology, v.258, n.2, Jun 5, p.435-40. 1999.

Zinszner, H., M. Kuroda, *et al.* CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev, v.12, p.982-95. 1998.