

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN

Palavras-Chave: Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), Doença de Crohn (DC), Estresse de Retículo Endoplasmático (ER stress); Unfolded Protein Response (UPR)

Autores/as:

Gabriel Roza Silveira Batista (Aluno de Iniciação Científica), Laboratório de Investigação em Doença Inflamatória Intestinal (LabDII) - FCM UNICAMP
Prof.^a Dr.^a Raquel Franco Leal (Orientadora), LabDII – FCM UNICAMP
Bruno Lima Rodrigues (Doutorando), LabDII – FCM UNICAMP

INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) é uma Doença Inflamatória Intestinal (DII) de padrão inflamatório transmural da mucosa, podendo afetar todo o trato gastrointestinal (TGI), da boca ao ânus. Suas principais características clínicas incluem diarreia aquosa e perda de peso que perduram vários anos antes do diagnóstico (1-3).

Dado o grande impacto das DII, em especial DC, sobre a qualidade de vida dos pacientes, diferentes vias de sinalização celular presentes na doença tem sido alvo de estudos. Mais recentemente, a

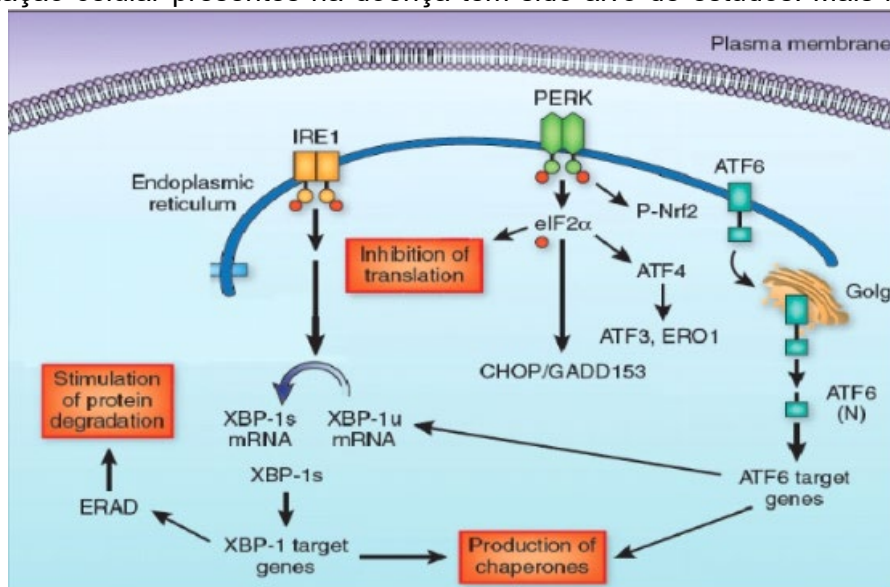


Figura 1- Vias de Ativação do Estresse de Retículo (ER Stress). A Oligomerização do IRE1, quando na presença de Proteínas Mal Formadas (UPR), promove o splicing do mRNA de XBP1, gerando um XBP1 funcional que regula a expressão de genes-alvo. A dissociação, e translocação, da ATF6 para o Complexo de Golgi, promove a geração de um ATF6 funcional que regula os genes da UPR. A via PERK, ao ser ativada, leva a fosforilação do eIF2alfa, resultando em uma translocação em bloco que, em última instância, tem o intuito de reduzir a quantidade de proteínas mal formadas e induzir a apoptose.

orquestração entre diversos fatores relacionados à resposta à proteínas mal formadas (UPR, de *unfolded protein response*), presentes em situações de estresse do retículo endoplasmático (ERE) tornou-se alvo de pesquisas (4, 5).

Há três principais vias de ativação do ERE que podem ser destacados como UPR: a via ATF6, via PERK e via IRE1. A ativação da transcrição de fator 6 (*Activating Transcription Factor 6*, ATF6) que, após sua translocação para o complexo de Golgi, sofre ação de proteases e tem seu domínio ATF6(N) translocado para o núcleo. Esse domínio induz uma série de genes alvos da UPR, tal como chaperonas do retículo e X-box-binding protein 1 (XBP1), que eventualmente induz a via de degradação de proteínas (ERAD), restaurando assim, a capacidade de conformação proteínas não formadas ou mal formadas, encaminhando-as para o citosol por meio do sistema proteossoma-ubiquitina (6).

Há também a sinalização via *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), uma proteína transmembrana, com atividade kinase, que também reconhece o acúmulo de proteínas mal formadas. Quando ativada, a via PERK atua na diminuição global de tradução, com o intuito de reduzir a quantidade de proteínas que adentram o retículo (7). Além disso, a PERK atua na fosforilação de eIF2 α , induzindo a tradução específica da proteína ATF4. O complexo PERK-eIF2 α -ATF4 está relacionado a duas funções biológicas: sobrevivência celular (ao ativar vários genes envolvidos nas vias de UPR) (8, 9), bem como apoptose (ativada pelo complexo PERK-eIF2 α -ATF4, de vias pró apoptóticas, como CHOP – esta aumenta a transcrição de fatores apoptóticos, tal como a p53 *upregulated modulator of apoptosis* [PUMA]) (10).

A via *Inositol-Requiring Transmembrane Kinase/Endorribonuclease*, denominada de IRE1, é uma proteína transmembrana com atividades serina/tironina kinase e Endorribonuclease (RNAase) em seu domínio C-terminal. Ela é responsável pela indução na expressão de proteínas chaperonas do ER: em sinalização de IRE1 para a sobrevivência celular (*Survival Signaling*), a ativação de IRE1 α induz, no citosol, o *splicing* do mRNA do XBP1 para expressar um potente fator transcripcional: XBP1. Este fator é responsável por aumentar a expressão de genes associados à UPR (dobramento de proteínas, controle de qualidade do dobramento de proteínas, secreção proteica, etc) (11, 12).

A Chaperona 4-Fenilbutirato de Sódio (PBA) é um ácido graxo de cadeia curta substituída por fenil, e utilizada clinicamente em uma ampla variedade de doenças (13-16). Estudos já demonstraram que a PBA, além de outras chaperonas, apresenta a capacidade de estabilizar a conformação de proteínas, aumentar o potencial de conformação proteica no Retículo Endoplasmático (RE), além de facilitar o tráfego de proteínas mal-conformadas (17). Em estudo recente, o PBA mostrou-se eficaz na redução da atividade de ERE de ratos com lesões renais secundárias à diabetes, diminuindo o estresse oxidativo e a hipertrofia glomerular (18). Achados como esse, entre outros, tornam a chaperona PBA alvo como meio terapêutico ao ERE observado em pacientes com DC.

O presente estudo teve por objetivo:

- Investigar a expressão de ERE por meio da expressão gênica das principais vias de ativação do ERE em biópsias intestinais de pacientes com DC e controles;
- Avaliar o efeito inibitório da ativação do ERE.
- Avaliar níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante do cultivo celular de biópsias intestinais de pacientes com DC e controles após o cultivo e tratamento com a chaperona química

METODOLOGIA

Foram selecionados 10 pacientes com DC submetidos a íleo-colonosopia de rotina para coleta de seis biópsias intestinais, após a concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa.

Pacientes que não apresentavam DII com íleo-colonosopia normal também foram submetidos à coleta de seis biópsias intestinais para formar o grupo controle. Os procedimentos foram realizados no Serviço de Colonoscopia – (Gastrocentro - Unicamp).

A análise da expressão gênica dos marcadores de ERE foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Doenças Inflamatórias Intestinais (LabDII), a partir das biópsias de tecido intestinal em todos os grupos.

Quantificando Expressão EIFK2A

A forma de determinação da expressão proteica a partir dos genes da UPR

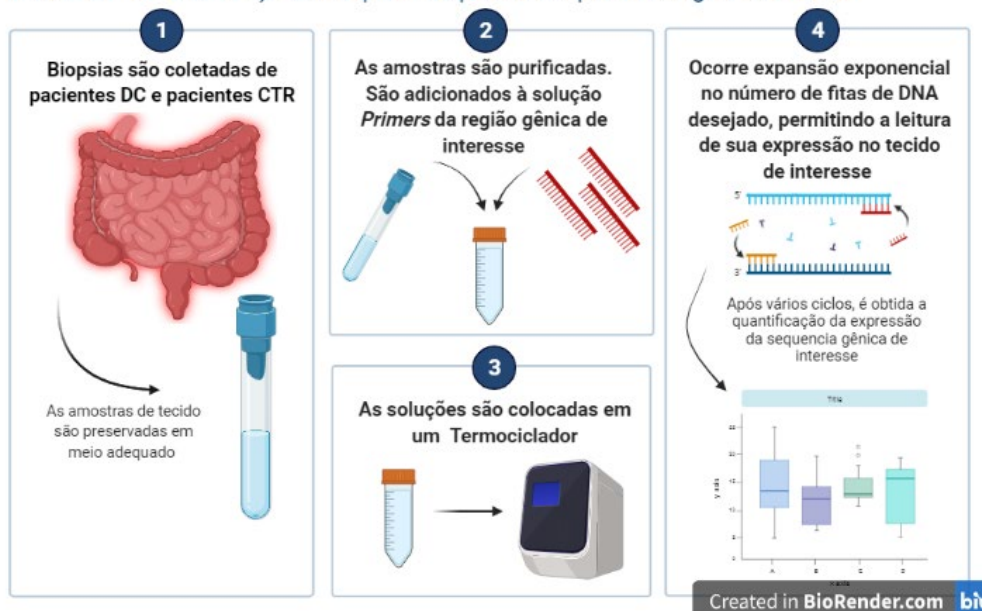


Figura 2 - Análise PCR dos genes relacionados à UPR; DC: Doença de Crohn; CTR: Pacientes Controle

Cultivo Celular das Biópsias

Após a coleta das biópsias intestinais, elas foram imediatamente imersas em meio de cultura RPMI, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) e cultivadas em incubadora de CO₂ a 37°C, 95% de umidade, e tensão de 5% de CO₂.

As biópsias de pacientes com DC foram tratadas com duas concentrações diferentes de chaperona química, além do tratamento com infliximabe, um agente biológico comumente utilizado no tratamento da DC. Após 6 horas, as culturas foram centrifugadas, sendo o pellet coletado para ensaios de expressão gênica, que foi armazenado em freezer à -80°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O pós-processamento das amostras de pacientes CTR e DC, através da análise quantitativa da expressão dos genes relacionados à ERE (rt-PCR), demonstrou que apenas a via PERK (EIF2KA) estava significativamente ativada na mucosa intestinal de pacientes com DC, isto quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Contrastados aos respectivos grupos CTR, as vias IRE1 (ERN1) e ATF6 (ATF6) não estavam modulados.

A análise de expressão gênica da via PERK (EIF2KA), da mucosa de pacientes DC, submetidas à ação da chaperona PBA, em duas diferentes concentrações, demonstrou uma diminuição da transcrição proteica quando as amostras foram tratadas com concentração menor de PBA, sendo que a ausência de resposta foi vista quando tratadas com maior concentração de PBA.

Quanto à resposta de genes relacionados à UPR (STC2, DNAJC3, CALR, HSP90B1, HSPA5, TDIT3), via rt-PCR, em amostras de mucosa intestinal de pacientes com DC, pôde-se observar significativo aumento da expressão desses genes, em detrimento de pacientes CTR. As amostras de ambos os grupos foram submetidas à tratamento com chaperona, sendo observada diminuição das transcrições em todas as sequências quando submetidas à PBA, exceto HSPA5, cuja diminuição de atividade foi observada apenas quando submetido à PBA (maior concentração), e não quando em menor concentração.

CONCLUSÕES:

O presente estudo avaliou a expressão de vias relacionadas à UPR (Unfolded Protein response) em tecido da mucosa intestinal de pacientes com DC quando comparados à pacientes CTR (controle). Foi observado significativo aumento da transcrição de proteínas relacionadas ao gene EIF2KA (PERK) em detrimento de outras vias relacionadas à UPR – ATF6 (ATF6) e ERN1 (IRE1). O tratamento com a chaperona química revelou significativa diminuição da expressão do gene PERK na menor concentração, enquanto que pôde ser visto diminuição global na expressão de genes relacionados à UPR, com exceção do HSPA5.

BIBLIOGRAFIA

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
2. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1979;77(4 Pt 2):898-906.
3. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*. 2003;88(11):995-1000.
4. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)*. 2013;4(3):306-33.
5. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:399-425.
6. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000;101(5):451-4.
7. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397(6716):271-4.
8. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):14-21.
9. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619-33.
10. Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipopoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(1):G236-43.
11. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest*. 2001;107(5):585-93.
12. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134(5):743-56.
13. Collins AF, Pearson HA, Giardina P, McDonagh KT, Brusilow SW, Dover GJ. Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood*. 1995;85(1):43-9.
14. Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med*. 1996;335(12):855-9.
15. Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D'Amico A, Colitto F, et al. Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(2):130-5.
16. Camacho LH, Olson J, Tong WP, Young CW, Spriggs DR, Malkin MG. Phase I dose escalation clinical trial of phenylbutyrate sodium administered twice daily to patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2007;25(2):131-8.
17. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):109-15.
18. Luo ZF, Feng B, Mu J, Qi W, Zeng W, Guo YH, et al. Effects of 4-phenylbutyric acid on the process and development of diabetic nephropathy induced in rats by streptozotocin: regulation of endoplasmic reticulum stress-oxidative activation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;246(1-2):49-57.