

UCA-FC
Biotecnología
A 339
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

UTILIZACIÓN DE LA CHAPERONA QUÍMICA TUDCA PARA DISMINUIR EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO PROVOCADO POR CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN CÉLULAS ACINARES

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

NICOLÁS IGNACIO ALBORNOZ VERGARA

**DIRECTOR SEMINARIO DE TÍTULO: DRA. MARÍA JULIETA GONZÁLEZ BURGOS
CO-DIRECTOR: DRA. MARÍA JOSÉ BARRERA ALVARADO
PATROCINANTE: DR. JUAN FERNÁNDEZ HIDALGO**

Santiago-Chile

2017



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr:

NICOLÁS IGNACIO ALBORNOZ VERGARA

“UTILIZACIÓN DE CHAPERONA QUÍMICA TUDCA PARA DISMINUIR EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN CÉLULAS ACINARES PROVOCADOS POR EL USO DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. María Julieta González
Directora Seminario de Título

Dra. María José Barrera
Co-Directora Seminario de Título

Dr. Juan Fernández Hidalgo
Patrocinante

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra Lorena Norambuena
Presidente Comisión:

Dra. Daniela Sauma
Evaluadora

Santiago de Chile, marzo de 2017

BIOGRAFÍA



Nicolás Ignacio Albornoz Vergara

Nacido el 27 de febrero de 1992. Cuarto hijo de un modesto matrimonio entre Tulio Albornoz y Juana Vergara. Ingresó en 1997 a un colegio municipal, finalizó sus estudios de enseñanza media en 2009. En 2011 ingresó a la Universidad de Chile, a la Facultad de Ciencias, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Lugar y Fecha de Nacimiento: Santiago de Chile, 27/02/1992

Padres: Tulio Albornoz Muñoz (Mecánico automotriz) y Juana Vergara Hernández (Costurera). Hermanos: Johanna Albornoz Vergara (Vendedora de seguros), Tulio Albornoz Vergara (Ing. en ejecución civil) y Claudio Albornoz (Supervisor en Minerías).

Dirección de vivienda: Abtao 338, Estación Central

Nombre de Colegio de enseñanza Básica: Sagrada Familia, Quinta Normal.

Nombre de Colegio de enseñanza Media: Liceo Alberto Hurtado, Quinta Normal.

Carrera: Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Fecha de ingreso a la Universidad: 2011

Financiamiento: (Beca o préstamo)

-AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han ayudado en mi formación durante el desarrollo de esta tesis:

La profesora María Julieta González por aceptarme en su laboratorio y soportar mis errores, enseñarme la rigurosidad que hay que tener para hacer ciencia y su contribución hacia mi enseñanza.

Al Dr. Sergio Aguilera, por su noble y profesional dedicación a los pacientes que padecen del síndrome de Sjögren.

Agradecer muy especialmente a María José por enseñarme tanto y siempre estar dispuesta a seguir ayudándome y también por su infinita paciencia en soportar mis falencias.

A Claudio Molina y Sergio González, por su participación en la toma de biopsias, que pese a que no las utilicé en mi tesis, participé en este proceso aprendiendo de ellos como respetar y acoger a los pacientes. Como también por hacer gratos estos momentos complejos para el paciente.

A mi patrocinante Prof Dr. Juan Fernández por guiarme en términos académicos en el buen desarrollo de esta tesis.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio que han estado conmigo durante este tiempo Isabel, Juan, Verónica, Sergio, Seba, Carolina, Patricia y María José por su ayuda en mi formación científica y/o desarrollo de tesis, además de todos los ratos amenos compartidos en el laboratorio. En particular a Isabel por apoyarme en los momentos que requerí de su ayuda.

A Osvaldo Almeyda y Javier Esparza por su colaboración permanente en entregar todo el apoyo logístico, de tal manera de hacer más fácil nuestro trabajo en el laboratorio.

Al profesor Julio Tapia y los integrantes de su laboratorio especialmente a Valentina por su buena disposición.

Dra Stefana Petruscu por la donación del anticuerpo anti-EDEM1

A la Dra Ida. Biunno por la donación del anticuerpo anti-SEL1L.

A mi querida familia y amigos por estar siempre conmigo, apoyándome en todo este proceso.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Molecular y Celular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por los proyectos FONDECYT 1120062 y 1160015. Este laboratorio está dirigido por la Dra. María Julieta González.

Los pacientes que se estudian en este laboratorio son diagnosticados y seleccionados por el Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, médico Reumatólogo de la Clínica INDISA e investigador alterno de los proyectos Fondecyt 1160015 y 1120062. El Dr. Aguilera es el director médico de las investigaciones de este grupo de estudio.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
<i>Aspectos generales sobre el síndrome de Sjögren</i>	3
<i>Homeostasis en GSL de pacientes con SS</i>	5
<i>Respuesta a estrés de RE: UPR.</i>	6
<i>ERAD</i>	8
<i>ERAD tuning</i>	10
<i>UPR y ERAD en el SS.</i>	10
<i>La chaperona química: ácido tauroursodeoxicólico</i>	12
<i>TUDCA y UPR.</i>	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
<i>I. Materiales</i>	18
1. Sales y reactivos	18
2. Partidores	18
3. Anticuerpos	18
<i>II. Métodos</i>	21
1. Cultivo de células HSG en dos dimensiones (2D)	21
2. Tratamientos	21
3. Determinación de los niveles de transcritos por PCR en tiempo real	21
4. Análisis de los niveles proteicos por inmunoquímica	23
5. Inmunofluorescencia	25
6. Viabilidad celular	25
7. Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
<i>1.1-Disminuir el estrés de RE en células acinares provocado por el uso de citoquinas pro-inflamatorias, mediante la utilización de la chaperona química TUDCA</i>	27
1.1.1-Determinar los niveles de transcritos y proteína de dos moléculas que participan en ERAD: SEL1L y EDEM1	27
1.1.2-Determinar los niveles de transcrito y proteína de MUC1	34
1.1.3-Determinar la localización subcelular de las proteínas SEL1L y EDEM1	38

DISCUSIÓN	45
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN	52
REFERENCIAS	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acumulación de MUC1 y dilatación de cisternas del RER en pacientes con SS _____	5
Figura 2. Esquema de las tres vías de UPR y lo que se ha observado en pacientes con SS _____	7
Figura 3: Esquema de las vías de regulación de TUDCA _____	14
Figura 4: Niveles proteicos de moléculas que participan en ERAD en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con TUDCA _____	28
Figura 5. Niveles proteicos de SEL1L y EDEM1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con concentraciones intermedias de TUDCA _____	29
Figura 6. Detección de RNA total en geles denaturantes de agarosa-formaldehído _____	30
Figura 7. Niveles de transcritos de SEL1L y EDEM1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con TUDCA _____	31
Figura 8. Gel representativo de productos de qPCR de SEL1L y EDEM1 _____	32
Figura 9. Niveles proteicos de SEL1L en GSL de pacientes con SS y controles _____	33
Figura 10. Evaluación de la acción de TUDCA, las citoquinas pro-inflamatorias o tunicamicina en la viabilidad celular _____	34
Figura 11. Niveles de transcritos de MUC1 y MUC1/SEC en HSG estimuladas con citoquinas pro inflamatorias y co-incubadas con TUDCA _____	36
Figura 12. Gel representativo de los productos de qPCR de MUC1 y MUC1/SEC _____	37
Figura 13. Niveles proteicos de MUC1 en HSG estimuladas con citoquinas pro inflamatorias y co-incubadas con TUDCA _____	38
Figura 14: Patrones de localización subcelular de EDEM1 _____	40
Figura 15. Patrones de localización subcelular de SEL1L y EDEM1 _____	41
Figura 16: Inmunofluorescencia doble para SEL1L y EDEM1 en células HSG _____	43
Figura 17: Caracterización de la localización subcelular de EDEM1 con marcadores de compartimientos subcelulares _____	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados	19
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios	20

LISTA DE ABREVIATURAS

4-PBA	4-Fenilbutirato	4-phenylbutyrate
ANA	Anticuerpos anti-nucleares	Antinuclear antibodies
ASK	Quinasa 1 regulante de la señal de apoptosis	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF6	Factor de transcripción activante 6	Activating transcription factor6
BAFF	Factor activador de linfocitos B	B cells activating factor
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina	Immunoglobulin binding protein
BSA	Seroalbúmina de bovino	Bovine Serum albumin
Bsep	Bomba exportadora de sales biliares	Bile salt export pump
DISC	Complejo de señalización inducido por muerte	Death-inducing signaling complex
EDEM1	Lectina tipo α -manosidasa 1 potenciadora de la degradación en RE	ER degradation-enhancing α -mannosidase-like lectins
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Epidermal growth factor receptor
eIF2α	Factor 2 de la iniciación de la traducción eucariótico	Eukaryotic Initiation Factor 2
ERAD	Degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas	Fas-associated death domain
GS	Glándula salival	Salivary gland
GCDC	Ácido glicoquenodesoxicólico	Glycochenodeoxycholic acid
HLA	Antígeno leucocitario humano	Human leukocyte antigen
HRD1	Degradación 1 de HMG-CoA reductasa	HMG-CoA reductase degradation 1
HSG	Glándula submandibular humana	Human submandibular gland
ICAM-1	Molécula 1 de adhesión intercelular	Intracelular adhesion molecule 1

IFN-γ	Interferón- γ	Interferon- γ
IKK	Quinasa de I κ B α	I κ B α kinase
IRE1	Enzima 1 requiere inositol	Inositol-requiring enzyme-1
kDa	kiloDalton	kiloDalton
JNK	Quinasa NH ₂ -terminal c-jun	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
MPK-1	Proteína quinasa activada por mitógeno	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	ARN mensajero	Messenger RNA
MRP2	Proteína 2 asociada a resistencia de Múltiples drogas	Multidrug resistance-associated protein 2
Ntcp	Polipeptido co-transportador de taurocolato de sodio	sodium taurocholate co-transporting polypeptide
NO	Óxido nítrico	Nitric oxide
NOS	Óxido nítrico sintasa	Nitric oxide synthase
PKA	Proteína quinasa A	Protein kinase A
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PFA	p-formaldehído	Paraformaldehyde
PBS	Amortiguador fosfato salino	Phosphate-buffered saline
PERK	Quinasa de retículo endoplásmico tipo proteína quinasa RNA	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
RER	Retículo endoplásmico rugoso	Rough Endoplasmic reticulum
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
RNA	Ácido ribonucleico (ARN)	Ribonucleic acid
RNaseout	Inhibidor de ribonucleasas	Ribonuclease Inhibitor
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Dodecil sulfato de sodio	Sodium dodecil sulphate



SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	SDS- polyacrylamide gel electrophoresis
SEL1L	Potenciador supresor de Lin12 tipo 1	Suppressor enhancer of Lin12 1 like
SEM	Promedio del error estándar	Standard error mean
SLR	Repetidos tipo SEL1L	SEL1L-like repeated
SS	Síndrome de Sjögren	Sjögren's syndrome
SSp	Síndrome de Sjögren primario	Primary Sjögren's syndrome
SSs	Síndrome de Sjögren secundario	Secondary Sjögren's syndrome
TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA	Tris-acetate-EDTA buffer
TBS	Amortiguador salino-Tris	Tris-buffered saline buffer
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α	Tumor necrosis factor α
TLR	Receptor de tipo Toll	Toll-like receptor
TRAF-2	Factor asociado al receptor del Factor tumoral de necrosis 2	<i>Tumoral necrosis factor receptor-associated factor 2</i>
TUDCA	Ácido tauroursodeoxicólico	Tauroursodeoxycholic acid
UDCA	Ácido ursodesoxicólico	Ursodeoxycholic Acid
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas	Unfolded protein response
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	Vascular endothelial growth factor
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem	Variable number of tandem repeats
XBP-1	Proteína 1 de unión a la caja X	X-box binding protein 1
XBP-1s	XBP-1 procesado	Spliced XBP-1
XBP-1u	XBP-1 no procesado	Unspliced XBP-1

RESUMEN

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, crónica, que afecta principalmente a las glándulas salivales (GS) y lacrimales. Las células acinares de GS presentan estrés de retículo endoplásmico rugoso (RER) evidenciado por acumulación intracelular de mucinas (MUC1 y MUC7), dilatación de las cisternas de RER y altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ . Para atenuar el estrés de RER, las células eucariontes activan la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) a través de 3 transductores de membrana del RER: ATF6 α , PERK e IRE1 α . En pacientes SS se ha observado disminución en la activación de la vía IRE1 α /XBP-1s, activación de la vía PERK y aumento en la activación de la vía ATF6 α , relacionada con un aumento en la maquinaria de degradación de proteínas asociada a RER (ERAD). Además, TNF- α e IFN- γ inducen estrés de RER en células de glándula submandibular humana (células HSG), promoviendo un aumento en la expresión de MUC1 y reproduciendo los hallazgos de la UPR encontrados en pacientes SS.

El ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) es un derivado de un ácido biliar endógeno que actúa como chaperona química, contrarrestando el estrés de RER al potenciar el plegamiento de las proteínas. Actualmente, TUDCA se está usando en pruebas clínicas de fase 2 en pacientes con diabetes tipo I para prevenir la enfermedad, al disminuir el estrés de RER. Así, su utilización en otras enfermedades autoinmunes tal como el SS, eventualmente podría disminuir el estrés de RER producido por citoquinas pro-inflamatorias. La hipótesis de este trabajo es que "TUDCA disminuye los niveles de expresión de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1, y de la mucina MUC1, inducidos por citoquinas pro-inflamatorias". Así, el objetivo de este trabajo es evaluar si TUDCA disminuye la expresión de estos marcadores de ERAD y de MUC1 inducido por citoquinas pro-inflamatorias en células HSG.

En este estudio se utilizó un cultivo de células HSG incubadas con TNF- α o IFN- γ , y posteriormente tratadas con TUDCA. Se analizaron dos marcadores de la UPR relacionados con ERAD, SEL1L y EDEM1, así como también la mucina MUC1, todos ellos aumentados en GS de pacientes SS, a través de qPCR, Western blot y/o inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos mediante Western blot y qPCR muestran un aumento significativo de los niveles proteicos y de transcritos respectivamente, de SEL1L y EDEM1 en células tratadas con citoquinas pro-inflamatorias. Por el contrario, se observó una disminución significativa en los niveles de transcritos y proteínas de ambas moléculas en células co-incubadas con concentraciones crecientes de TUDCA, sugiriendo una disminución del estrés de RER. Al observar la localización de EDEM1 y SEL1L, se observó un aumento en la intensidad de señal cuando las células fueron tratadas con citoquinas pro-inflamatorias o tunicamicina, sin embargo, la señal disminuyó al co-incubar con TUDCA. También se observaron distintos patrones de localización de EDEM1 y SEL1L, siendo más punteado en las células no tratadas o incubadas con TUDCA, mientras que en células tratadas con citoquinas o tunicamicina se observó un patrón *reticular* que se distribuyó por todo el citoplasma. Por otro lado, en células aisladas la señal inmunofluorescente se distribuyó por el citoplasma, mientras que en

células agrupadas se observó una señal intensa en las regiones de interacción célula-célula.

En células HSG tratadas con citoquinas pro-inflamatorias, los niveles proteicos y de transcritos de MUC1 aumentaron significativamente, y disminuyeron en presencia de TUDCA, sin embargo no se alcanzaron los niveles basales. Por otro lado, las concentraciones de citoquinas, tunicamicina y TUDCA utilizadas en estos experimentos no resultaron tóxicas para las células HSG, ya que no hubo cambios en la viabilidad celular al incubarlas con cada compuesto por separado. Interesantemente, se observó una mayor viabilidad celular cuando TUDCA se co-incubó con alguna citoquina, sugiriendo que TUDCA favorecería mecanismos de supervivencia celular.

En conclusión, TUDCA es capaz de aliviar el estrés de RER inducido por citoquinas pro-inflamatorias, al disminuir el aumento en componentes de ERAD y la acumulación de MUC1 en células epiteliales de glándulas salivales.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales sobre el síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, crónica, que se caracteriza por una disfunción de las glándulas exocrinas, principalmente las glándulas salivales (GS) y lacrimales (Ferro et al., 2016). Esto resulta finalmente en síntomas de sequedad oral y ocular, aunque manifestaciones sistémicas pueden encontrarse en un 30-40% de los pacientes (Bowman and Fisher, 2015). Este síndrome puede presentarse aislado como SS primario (SSp) o asociado a otras enfermedades reumáticas como SS secundario (SSs) (Bowman and Fisher, 2015).

Se ha reportado que la prevalencia del SS en la población general es de 0,5-3%. Sin embargo, esta información estaría subestimada dado que en estadios tempranos los pacientes no presentan síntomas claros. Además, es una enfermedad multifacética y de curso insidioso, factores que dificultan el correcto y temprano diagnóstico (Fernandez Castro et al., 2016). Esta condición se presenta más frecuentemente en mujeres que en hombres y principalmente entre los 50-60 años. El carácter autoinmune de este síndrome está dado por la presencia de autoanticuerpos séricos en los pacientes con SS, tales como anticuerpos anti-nucleares (ANA), anti-Ro/SSA, anti-LA/SSB y factor reumatoideo. Sin embargo, muchos de estos anticuerpos también son detectados en otras enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide (Bowman and Fisher, 2015).

Aún no se conocen los mecanismos etiopatogénicos por los cuales se gatillaría esta enfermedad, aunque se han descrito diversos elementos o factores que podrían contribuir o incidir en su desarrollo. Respecto a las células implicadas, los linfocitos B tendrían una gran relevancia en la patogenia del SS, ya que se ha observado hiperactividad de linfocitos de sangre periférica y un 5% de los pacientes pueden desarrollar linfomas (Bowman and Fisher, 2015). Un marcador para esta hiperactividad de los linfocitos B son los niveles aumentados del factor de activación de linfocitos B (BAFF, del inglés *B-cell activating factor*). Además de las células B, otras células del sistema inmune tendrían un importante rol en la patogenia, tales como células T, células dendríticas y células natural killer. Sin embargo, existen numerosos estudios que dan cuenta de la importancia de las células epiteliales de las GS (GS labiales humanas, líneas celulares y ratones NOD, un modelo experimental que remeda algunas características de este síndrome) (Robinson et al., 1998). Los interferones de tipo I (α/β) y tipo II (γ) también jugarían un importante rol en su patogenia.

Estudios genéticos han mostrado la existencia de genes candidatos predisponentes en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, el número de genes es variado y hasta el momento no existe ninguna asociación directa. Los genes que se han asociado con la enfermedad, son algunos haplotipos de la familia HLA (del inglés *Human leukocyte antigen*) (Sun et al., 1998). Otros son IRF5 (del inglés *Interferon Regulatory Factor 5*) que estaría involucrado en la inducción de interferones de tipo I, CXCR5 (del inglés *Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 5*) receptor que guía a las células B y T a los ganglios linfáticos, STAT4 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*) factor de transcripción requerido para la diferenciación de células T CD4⁺ virgenes a

células Th1 y en la producción de IFN- γ , y BAFF que promueve la supervivencia y proliferación de células B, entre otros genes (Nezos and Mavragani, 2015). Aparte del locus HLA, los otros genes tendrían un débil o moderado efecto en la patogenia de la enfermedad, ya que la mayoría de estos genes también están involucrados en otras enfermedades autoinmunes. Con lo cual estudios posteriores podrían centrarse en las interacciones genéticas, epigenéticas y ambientales para tener mayor claridad de la patogenia del SS (Nezos and Mavragani, 2015).

También habría una contribución a la enfermedad de factores epigenéticos como microRNAs (por ejemplo mir146a) que regulan la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata (Mavragani and Moutsopoulos, 2014). Además, en GS de pacientes con SS se ha observado una sobreexpresión de enzimas metilantes *de novo* y de mantención, probablemente como una respuesta compensatoria a la inadecuada sobreexpresión de retroelementos endógenos LINE-1 (Mavragani and Moutsopoulos, 2014). A su vez, factores ambientales como el estrés, los virus y alteraciones hormonales también podrían favorecer el desarrollo de esta enfermedad (Mavragani and Moutsopoulos, 2014).

Actualmente, el criterio de diagnóstico más utilizado en el SS es el Americano-Europeo-2002 (Vitali et al., 2002), que se basa en la presencia de signos y síntomas de sequedad ocular y oral. Este criterio considera seis puntos: I. Síntomas de sequedad ocular, II. Síntomas de sequedad bucal, III. Signos de sequedad ocular, IV. Biopsia de GS labial (GSL), V. Flujo salival y VI. Presencia de autoanticuerpos (SSA y SSB). Para que un paciente sea diagnosticado con SSp no debe presentar otra enfermedad autoinmune asociada y debe cumplir con 4 de los 6 parámetros anteriores, siempre y cuando la biopsia o la serología sean positivas. La biopsia es positiva cuando se observa sialoadenitis crónica focal con score de foco ≥ 1 por 4mm² de tejido glandular, donde un foco está definido como el acúmulo de más de 50 células inflamatorias mononucleares alrededor de un ducto. Actualmente el *EULAR SS Disease Activity Index* (ESSDAI) y el *EULAR Sjögren's syndrome patient-reported index* (ESSPRI) también son usados como criterios de inclusión y punto final para ensayos clínicos durante la evaluación de terapias para el SS (Ferro et al., 2016).

En cuanto al tratamiento para la cavidad oral y dientes, en pacientes con sequedad oral, moderada o severa, pero con una función residual de las GS, se recomienda el uso de agonistas muscarínicos orales (pilocarpina o cevimefina). Además, se indica el uso de fluoruros tópicos para prevenir las caries. En la sequedad ocular y la inflamación de la superficie ocular, los fármacos anti-inflamatorios tópicos pueden ser útiles en estos pacientes (Saraux et al., 2016). En el caso de una disfunción de la glándula de Meibomio, se incluyen en su uso terapéutico, las lágrimas artificiales con componentes lipídicos, compresión y masajes calientes, azitromicina tópica, entre otros. Sin embargo, otras manifestaciones del síndrome deben ser tratadas sistémicamente. En la actualidad las terapias biológicas son escasas y poco efectivas para este síndrome, pero existen otras terapias biológicas que se están evaluando actualmente anticuerpos contra IL-6, CTLA4, CD40, BAFF, CD11a, receptor de linfotóxina β y PI3K δ (Saraux et al., 2016).

Homeostasis en GSL de pacientes con SS

Las células acinares de las GSL de pacientes SS presentan pérdida de la homeostasis celular dada por alteraciones en la polaridad celular, maquinaria exocítica, secreción de mucinas, entre muchas otras (Barrera et al., 2012; Ewert et al., 2010; Goicovich et al., 2003; Sung et al., 2015). Algunos de estos cambios son indicadores de alteraciones en organelos de la ruta secretora, en especial del retículo endoplásmico rugoso (RER), el cual es un organelo que está muy desarrollado en las células acinares de las GS (Gidalevitz et al., 2013). El RER está involucrado en diversas funciones celulares tales como síntesis, plegamiento y procesamiento de proteínas, y mantención de la homeostasis del Ca^{+2} intracelular y del potencial de óxido-reducción (Gidalevitz et al., 2013). Alteraciones en la homeostasis del RER puede gatillar estrés de RER, que es cuando proteínas desplegadas o mal plegadas se acumulan en el lumen de este organelo (Gidalevitz et al., 2013). Las GSL de los pacientes con SS son susceptibles a experimentar estrés de RER debido a la alta demanda de síntesis proteica y a la complejidad estructural de sus productos de secreción, como las mucinas. Cabe destacar que en pacientes con SS se han observado distintas alteraciones relacionadas a una condición de estrés de RER: 1) dilatación de las cisternas del RER (Goicovich et al., 2003) (Figura 1A). 2) acumulación intracelular de las mucinas MUC1 y MUC7 (Bahamondes et al., 2011; Castro et al., 2013; Sung et al., 2015), glicoproteínas que presentan una alta complejidad estructural y que permiten la hidratación de la mucosa oral. MUC1 se localizó en la superficie apical de acinos serosos y ductos de GSL de controles, mientras que en pacientes SS se distribuyó por todo el citoplasma. En pacientes la señal inmunofluorescente de MUC1 colocalizó con el marcador de RE GRP78, también conocida como BiP (del inglés *Binding immunoglobulin protein*) (Figura 1B), sugiriendo acumulación de esta mucina en el RER. 3) aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Fox et al., 1994) y de los niveles de óxido nítrico (NO) (Caulfield et al., 2009; Konttinen et al., 1997). 4) alteraciones en la señalización de Ca^{+2} (Cardozo et al., 2005).

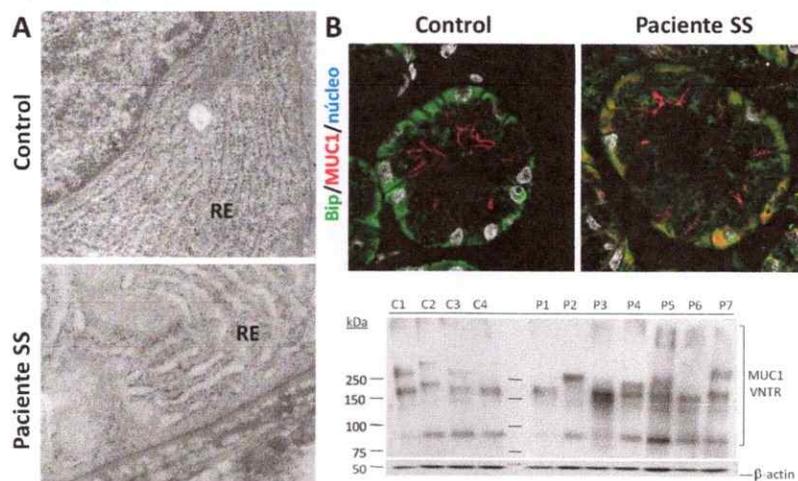


Figura 1. Acumulación de MUC1 y dilatación de cisternas del RER en pacientes con SS. A) GSL de un individuo control y un paciente con SS observada mediante MET. El RER en la célula acinar de la GSL del paciente con SS se observa dilatado. B) En nuestro laboratorio se ha observado un aumento significativo en los niveles de MUC1 en secciones de GSL determinados por inmunofluorescencia y en extractos proteicos de GSL de pacientes con SS medidos por Western blot (Imagen modificada de Oral Dis. 2015 Sep; 21 (6):730-8).

En varios tipos celulares, así como en GS de pacientes con SS, se ha observado que citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ pueden inducir estrés de RER (Cardozo et al., 2005; Gade et al., 2012; Savic et al., 2014). Se postula que estas citoquinas pro-inflamatorias inducirían la liberación de Ca²⁺ desde el RER y promoverían la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que finalmente interferiría con el plegamiento de proteínas en el RER (Cardozo et al., 2005; Zhang and Kaufman, 2008). Así, los altos niveles de citoquinas, NO y alteraciones en la señalización de Ca²⁺ descritas en pacientes con SS podrían provocar la acumulación de mucinas y la dilatación de las cisternas del RER observadas.

Respuesta a estrés de RE: UPR.

Frente a una condición de estrés de RER las células activan un conjunto de vías de señalización que se conoce como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR del inglés *Unfolded protein response*) (Figura 2), con el fin de resolver el problema de plegamiento de proteínas y restablecer la homeostasis (Ron and Walter, 2007). En células eucariontes, se han descrito tres vías de señalización en base a distintos transductores de UPR presentes en la membrana del RER como son: ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*), IRE1 (del inglés *inositol-requiring kinase 1*) y PERK (pancreatic ER eIF2 α kinase) (Hetz, 2012). A estos transductores de UPR, se les une por su porción luminal, una proteína chaperona del RE conocida como BiP/GRP78, la cual inhibe su activación y posterior señalización. También se postula que los mismos transductores podrían sensar directamente a las proteínas mal plegadas o desplegadas (Martino et al., 2013).

Una de las vías de UPR más conservadas es IRE1, la cual es una proteína de transmembrana de tipo I, que posee dominios quinasa y RNasa citosólicos, además de una región N-terminal luminal (Martino et al., 2013). En mamíferos IRE1 posee dos isoformas α y β , siendo IRE1 α de expresión ubicua, mientras que IRE1 β se expresa principalmente en tejido gastro-intestinal y en vías respiratorias. En condiciones de estrés de RER, IRE1 α forma complejos oligoméricos que lleva a la trans-autofosforilación de su región quinasa, activando al transductor. IRE1 α fosforilado (pIRE1 α), realiza el splicing alternativo del mRNA XBP-1 (del inglés *X-box binding protein 1*), llevando a la expresión de XBP-1s. Este factor de transcripción es capaz de inducir la expresión de un conjunto de genes de UPR relacionados con la biosíntesis de lípidos, biogénesis del RER, control de calidad, plegamiento de proteínas, entre otras funciones, en definitiva, contribuyendo a la adaptación de células secretoras (Hetz et al., 2011). IRE1 α activado interactúa con TRAF2 (del inglés *tumoral necrosis factor receptor-associated factor 2*), lo que permite que se activen quinasas relacionadas con apoptosis tales como ASK1 (del inglés *Apoptosis signal-regulating kinase 1*) y JNK (del inglés *c-Jun NH2-terminal Kinase*) (Arshad et al., 2013). IRE1 α también puede activar vías inflamatorias al interactuar con IKK (quinasa de I κ B α), la cual fosforila a I κ B α y hace que disminuyan sus niveles. Esto produce que NF- κ B no sea inhibido y pueda translocar al núcleo y cumplir su función como factor de transcripción (Tam et al., 2012).

Otra vía es PERK, que al igual que IRE1 α es una proteína de transmembrana de tipo I con un dominio quinasa citosólico y otro dominio N-terminal luminal. Cuando se produce estrés de RER, BiP se disocia de PERK, permitiendo que éste se autotransfosforile y active. PERK fosforilado (pPERK) fosforila a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF2 α), inhibiendo de este modo la traducción

general de proteínas en el RER (Hetz et al., 2011). La fosforilación de eIF2 α permite que se induzca la expresión selectiva del mRNA de ATF4, que codifica para un factor de transcripción que permite la regulación positiva de genes involucrados en la regulación de la apoptosis, metabolismo de aminoácidos, respuesta antioxidante y autofagia. Además, PERK facilita la síntesis y movilización de ATF6 desde el RER al Golgi para la proteólisis intermembrana (Teske et al., 2011).

Y por último está la vía ATF6 α , que es una glicoproteína de transmembrana de tipo II formada por 670 aminoácidos y un solo dominio transmembrana (Haze et al., 1999; Li et al., 2000). En el dominio luminal, ATF6 α humano tiene tres sitios de glicosilación (Hong et al., 2000). En ausencia de estrés de RER, ATF6 α se encuentra retenido en el RER, ya que BiP se une al dominio luminal de ATF6 y bloquea sus señales de localización en el aparato de Golgi. Sin embargo, en condiciones de estrés de RER, la disociación de BiP, permite que el sensor sea transportado desde el RER a Golgi, donde es procesado por dos proteasas (S1P y S2P) para liberar un fragmento citosólico N-terminal que actúa como factor de transcripción (ATF6f). ATF6f induce la expresión de genes relacionados con el plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas asociada a RER (ERAD del inglés *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Ruggiano et al., 2014).

Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que en GS de pacientes SS la vía PERK se encuentra activa, que la activación de la vía ATF6 se encuentra aumentada, mientras que la activación de la vía IRE1/XBP1 está disminuida (Fig. 2)

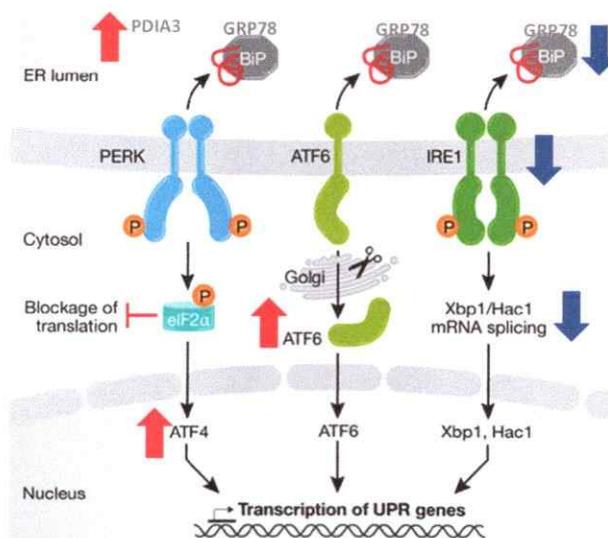


Figura 2. Esquema de las tres vías de UPR y lo que se ha observado en pacientes con SS. Para restablecer la homeostasis del RER frente a estrés, las células activan la UPR que consiste en diferentes vías de señalización conducidas por los transductores IRE1, ATF6 y PERK, localizados en la membrana del RER. Adaptada desde EMBO Rep. 2009 Nov; 10(11): 1206–1210).

ERAD

ERAD es esencial tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y considera el reconocimiento, retrotraslocación, ubiquitinación y degradación de sustratos ERAD en el proteosoma 26S (Christianson and Ye, 2014; Vembar and Brodsky, 2008). La remoción de proteínas mal plegadas desde el RER hacia el citosol, permite la mantención de la homeostasis celular. El reconocimiento de proteínas mal plegadas se da cuando éstas exponen zonas hidrofóbicas, interactuando así con PDI, lectinas tales como EDEM1 o con la misma chaperona BiP. Posteriormente, las proteínas son retrotranslocadas y ubiquitinadas por E3 ubiquitina ligasas (Christianson and Ye, 2014; Smith et al., 2011). La ubiquitinación es esencial para la retrotraslocación y entrega del sustrato al proteosoma, estando estos últimos dos procesos altamente acoplados (Adhikari and Chen, 2009).

Tanto en levaduras como en mamíferos se han identificado una gran cantidad de componentes que participan en ERAD, lo que dió lugar a una mejor comprensión de esta vía y a toda la secuencia de acontecimientos que conduce a la degradación de diversos sustratos por ERAD (Ruggiano et al., 2014). En varios modelos se ha observado que la especificidad de las proteínas E3 ligasas estaría determinada por la localización de la zona mal plegada en el sustrato con respecto a la membrana del RER, existiendo los siguientes tipos de sustratos ERAD: proteínas de membrana cuyo dominio mal plegado está en la cara citoplasmática (sustratos ERAD-C), proteínas mal plegadas en su dominio luminal (sustratos ERAD-L); o proteínas mal plegadas en su dominio intermembrana (sustratos ERAD-M) (Ruggiano et al., 2014). En mamíferos se ha descrito un mayor número de proteínas que participan en ERAD respecto a levadura tales como EDEMs (del inglés *ERAD-enhancing mannosidase-like protein 1*), OS-9 (del inglés *Osteosarcoma 9*), SEL1L (del inglés *Suppressor Of Lin-12-Like Protein*), Derlinas, Ubc6 y 7, HRD1 (del inglés *HMG-CoA reductase degradation 1*), March6 (TEB4), gp78, p97, Npl4 y Ufd1, entre otras. Además, en mamíferos se ha observado que existen vías alternativas de ERAD, evidenciando la complejidad de este proceso (Morito and Nagata, 2015)

El sistema ERAD se encarga de discriminar y segregar las proteínas mal plegadas de las proteínas intermediarias en su proceso de plegamiento, proteínas que están siendo exportadas fuera del RER y de las proteínas que residen establemente en el RER. Errores en este control de detección, pueden llevar a la acumulación de proteínas y afectar la función celular (Stevenson et al., 2016). La mayoría de las proteínas de la ruta secretora están N-glicosiladas, donde el ciclo calnexina y calreticulina, juega un rol relevante en el control de calidad del plegamiento (Stevenson et al., 2016). Uno de los potenciales candidatos encargados del reconocimiento de glicoproteínas mal plegadas es EDEM1, aunque también EDEM2 y EDEM3 estarían involucradas en este reconocimiento, pero de porciones específicas de las cadenas de oligosacáridos. Por otra parte, EDEM1 forma un complejo con Erdj5, una reductasa del RER que reduce los puentes disulfuro de las proteínas mal plegadas, extendiendo el polipéptido, facilitando su retranslocación a la membrana (Morito and Nagata, 2015). Otra lectina involucrada en el reconocimiento de sustratos ERAD es OS9, que reconoce glicoproteínas con N-glicanos que han sufrido el recorte progresivo de los residuos de manosa terminales. OS9 entrega el sustrato ERAD al complejo ubiquitina ligasa HRD1 embebido en la membrana a través de una interacción directa con SEL1L (Morito and Nagata, 2015). Por otra parte, los mecanismos por los cuales se degradan proteínas no

glicosiladas, son aún poco claros. Sin embargo, se ha observado que, EDEM1 puede interactuar con proteínas no glicosiladas de una manera independiente de glicanos, asociándose con calnexina y BiP. Otras lectinas que también podrían interactuar con estas proteínas son, OS-9 y XTP-3, las cuales se asocian con un complejo proteico, involucrado en la ubiquitinación de sustratos, retrotranslocación y orientación al proteosoma. Además, se ha observado que algunos de estos sustratos de ERAD no glicosilados, interactuarían con la chaperona BiP, en lugar de calreticulina y calnexina, y algunos de estos sustratos no glicosilados requieren de la proteína HERP, que está asociada a la maquinaria de ERAD (Shenkman et al., 2013).

La translocación retrógrada de sustratos ERAD está mediada por un supuesto canal de importe de proteínas. Uno de los posibles candidatos que formarían este canal es Derlin, el cual contribuye directamente al proceso de dislocación de proteínas. Otro candidato es HRD1, que se encarga de ubiquitinar los sustratos junto con las enzimas de conjugación a ubiquitina, Ubc6e/Ube2j1 y Ubc7/Ube2g. Otro posible candidato es el complejo Sec61, el cual también tiene función de translocación, pero en el sentido contrario, es decir desde el RER al citosol. Durante la dislocación, los sustratos ERAD son ubiquitinados en la base citosólica de la membrana del RER y son degradados por el proteosoma citosólico 26S. Es muy probable que el proceso de dislocación y ubiquitinación ocurran simultáneamente. En el proceso de retrotranslocación quienes proveerían la fuerza impulsora serían la ATPasa p97/ VCP y los cofactores Npl4 y Ufd1 (Christianson and Ye, 2014; Morito and Nagata, 2015).

La ubiquitinación y des-ubiquitinación, son muy importantes, ya que son requeridas para la degradación de muchas proteínas de vida corta. La ubiquitinación, es una modificación post-traducciona, que se produce en el citosol y el nucleoplasma de las células eucariontes. A grandes rasgos, el mecanismo de la ubiquitinación consiste, en la activación de una ubiquitina por la enzima activante de ubiquitina (E1), en una manera dependiente de ATP. Posteriormente, la ubiquitina es transferida a una cisteína específica de la enzima conjugante de ubiquitina (E2). Finalmente la proteína ubiquitina ligasa (E3), confiere la especificidad al sustrato y reconoce la proteína que necesita ser marcada y cataliza la transferencia de la ubiquitina a esta proteína (Popovic et al., 2014). Dependiendo de la naturaleza de la marca de ubiquitina el sustrato puede sufrir distintos procesos, esta especificidad estaría dada por la cadena de poli-Ub formada en la proteína blanco. Las cadenas de poli-Ub asociadas a K48 típicamente destinan el sustrato a degradación proteosomal en el citosol, mientras que la modificación de proteínas con una única Ub o cadenas de poli-Ub asociadas a K63 están usualmente involucradas en endocitosis, degradación lisosomal, reparación de DNA, activación de NF- κ B o transducción de señales, entre otras (Adhikari and Chen, 2009). Por otra parte, la desubiquitinación, permitiría la remodelación constante de las cadenas poliubiquitinadas sobre los sustratos, haciendo que el reconocimiento de los sustratos y el transporte hacia el proteosoma sea más selectivo y eficiente. Este proceso ocurre en combinación con las acciones de ubiquitinación. Es más, procesos de ubiquitinación y desubiquitinación, también se dan en la maquinaria ERAD, lo que podría asociarse a una regulación en la homeostasis celular y en la degradación de los componentes de la maquinaria, cuando no son requeridos (Lemus and Goder, 2014).

La maquinaria ERAD también ha sido utilizada por virus, dado que durante la infección estos pueden secuestrar la maquinaria traduccional del huésped y saturar el RER con proteínas virales, lo que puede causar estrés de RER. ERAD transporta proteínas mal plegadas o desplegadas desde el RER al citosol para ser degradadas por el proteosoma. Esta capacidad es aprovechada por los virus para degradar varios factores del huésped y favorecer su propagación. Además, los virus interfieren con muchas de las diferentes etapas de maduración y translocación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I, por degradación de ERAD. De esta manera eluden el sistema inmunológico del huésped. En este secuestro de la maquinaria, los virus utilizan la ATPasa p97 y utilizan ubiquitininas ligasas alternativas a HRD1, para que el sistema ERAD del huésped no pueda degradar proteínas del patógeno (Morito and Nagata, 2015). Aun así el sistema ERAD se caracteriza por tener un rol antiviral y de protección de patógenos, ya que la proteínas virales son los principales objetivos de ERAD, pero aun así los virus y bacterias han evolucionado para manipular la UPR y ERAD de los huéspedes, y así optimizar su replicación (Frabutt and Zheng, 2016).

ERAD tuning

ERAD tuning es un mecanismo postraduccional controlado por la carga de proteínas mal plegadas en el RER y la capacidad de ERAD. Cuando hay proteínas mal plegadas o desplegadas en el lumen del RER, EDEM1 y OS9 contribuyen a la entrega de estas proteínas a SEL1L y a la maquinaria de translocación, HRD1. Posteriormente, esta proteína es retrotranslocada a través de la membrana del RER, poliubiquitinada y degradada por el proteosoma. Por otro lado, cuando los componentes de ERAD no son requeridos, es posible que la enzima E3 ubiquitina ligasa, poliubiquitine a los otros componentes de la maquinaria ERAD. Esto provoca que la proteína HERP sea dirigida hacia el proteosoma, mientras que SEL1L es segregada en regiones periféricas del RER y/o en vesículas conocidas como ERAD tuning o EDEMosomas asociada con los factores EDEM1 y OS9, además de la proteína citosólica LC3-I (Noack et al., 2014). LC3-I es el precursor soluble de la proteína lipídica asociada a membrana LC3-II. Durante la macroautofagia, LC3-I se convierte en LC3-II. Curiosamente ERAD tuning sería una nueva vía, en la que LC3-I tendría un rol independiente de la autofagia (Noack et al., 2014).

UPR y ERAD en el SS.

En GSL de pacientes con SS hay un estrés constante (crónico) (Sepúlveda et al, 2015, manuscrito en revisión) y se ha encontrado acumulación de MUC1 en el RER (Castro et al, manuscrito en preparación) y alteración en las vías de señalización de la UPR. Respecto a la UPR se ha observado un aumento en la activación de la vía ATF6 α (Barrera et al., 2016), la disminución en la activación de la vía IRE1 α (Sepúlveda y cols, manuscrito en revisión), y activación del transductor PERK (Bahamondes y cols, manuscrito en revisión). Sin embargo, hay un aumento del factor de transcripción ATF4 que se correlacionó con un aumento en parámetros de sobrevida (Bahamondes y cols, manuscrito en revisión), sugiriendo la existencia de una condición crónica de estrés de RE (Wu et al., 2007; Zhang and Kaufman, 2008). Por otra parte, el aumento en la activación de la vía ATF6 α se relacionó con un aumento en la expresión de componentes de la maquinaria ERAD tales como p97, SEL1L, HERP, gp78, UBE2J1, UBE2G2 y DERLIN1 (Barrera et al., 2016). También se reportó un aumento en los niveles proteicos de EDEM1 que se correlacionaron con el aumento en los niveles proteicos de ATF6f

(Barrera et al., 2016). El aumento de la activación de la vía ATF6 α y de la maquinaria ERAD se correlacionó con un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en GSL de pacientes con SS. Las observaciones relacionadas con aumento en los niveles de transcrito y proteína de MUC1 fueron reproducidas en cultivo de células de glándula submandibular humana (células HSG) tratado con TNF- α e IFN- γ (Castro y cols, manuscrito en preparación; Sung et al., 2015). Del mismo modo, las observaciones relacionadas con la vía ATF6 α y ERAD fueron corroboradas en un cultivo de acinos en 3D de células HSG tratadas con TNF- α e IFN- γ . En este modelo *in vitro* se observó un aumento en la expresión y activación del transductor ATF6 α y de componentes de la maquinaria ERAD tales como EDEM1 y SEL1L bajo condiciones de estrés.

SEL1L, es una proteína adaptadora de una de las E3 ubiquitina ligasas de ERAD, HRD1. Se ha descrito que tiene un rol relevante en la mantención de la homeostasis en el RER de mamíferos, en la traducción de proteínas y también en la sobrevivencia celular. En ratones knockout heterocigoto para el gen SEL1L, disminuye la actividad de HRD1 y se activa una progresiva respuesta de la UPR. Es más, su delección en un estado embrionario, resulta letal. (Sun et al., 2014). SEL1L es una proteína de membrana de tipo I, que posee un largo dominio luminal que comprende 11 motivos repetidos tipo SEL1L (SLR, del inglés *Sel1-like repeat*). También posee un dominio de fibronectina tipo II en el N-terminal y un solo dominio de membrana en el C-terminal. Estos 11 motivos de SLR, pueden ser agrupados en SLR-N (del motivo 1-4), SLR-M (del motivo 5-9) y SLR-C (del motivo 10-11). Hay evidencia que el dominio luminal de SEL1L, estaría involucrado en el reconocimiento de sustratos o en la formación de complejos con chaperonas, mientras que el motivo SLR-C sería el que interactuaría directamente con el fragmento luminal de HRD1, en el lumen del RER (Jeong et al., 2016).

Por otra parte, EDEM1 es crucial en la regulación de ERAD, ya que reconocería sitios mal plegados tanto de proteínas glicosiladas como no glicosiladas y participaría en ERAD de sustratos de membrana y de sustratos solubles (Olivari and Molinari, 2007; Sokolowska et al., 2015). EDEM1, es parte de la familia glicosil hidrolasa 47, las cuales están involucradas en la eliminación de glicoproteínas mal plegadas en el lumen del RER. Posee un dominio de membrana y un dominio conservado de homología de manosidasas. El gen de EDEM1 en ratones es transcrito en 2 especies de mRNA de 2.4 y 6 kb, originados de distintos sitios de poliadenilación. Mientras que EDEM2 y EDEM3 han sido identificados por búsqueda en base de datos. Las tres son expresadas en distintos órganos. Sin embargo, sus niveles de expresión son los que varían. La función exacta de las proteínas EDEMs no está clara, pero su sobreexpresión acelera la liberación de glicoproteínas mal plegadas desde el sistema de control de calidad calnexina-calreticulina, para así acelerar su degradación. En cambio, la disminución en los niveles de expresión de EDEM1, produce que las proteínas nacientes escapen de ERAD, si es que se pliegan antes de la hidrólisis final por EDEM1 o EDEM3, lo que finalmente compromete la capacidad secretora de la célula (Olivari and Molinari, 2007; Xu and Ng, 2015).

Chaperona química: el ácido tauroursodeoxicólico.

Tanto el estrés de RER como la UPR tienen un gran impacto en múltiples enfermedades metabólicas en humanos. Las proteínas mal plegadas exponen segmentos hidrofóbicos, los cuales promueven la formación de enlaces intermoleculares y la posterior acumulación de proteínas. Para evitar esta acumulación, las células poseen un sistema de control de calidad de proteínas. Uno de los principales participantes en este sistema, son las chaperonas, que evitan la degradación o agregación de proteínas, asegurando así un correcto tráfico y función de la proteína. Frente a estrés de RER, la UPR detiene la síntesis de proteínas, entre otras funciones y aumenta la producción de chaperonas, involucradas en el plegamiento de proteínas (Cortez and Sim, 2014). En base a esto es de suma importancia evaluar estrategias terapéuticas que contrarresten el estrés de RER. En este sentido existen chaperonas químicas que son de bajo peso molecular, las cuales se unen específicamente a las proteínas e inducen su replegamiento o la estabilización, disminuyendo la agregación de proteínas y restaurando así su función. Investigaciones recientes han demostrado que la utilización de chaperonas químicas exógenas puede disminuir el estrés de RER y actualmente están siendo utilizadas en tratamientos de trastornos metabólicos asociados a estrés de RER, tales como resistencia a la insulina y diabetes tipo 1 (Engin et al., 2013). Entre ellos, uno de los que es más ampliamente utilizado es el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) (Cortez and Sim, 2014).

Estudios previos han reportado que TUDCA (Figura 3A), un derivado de ácido biliar endógeno y la forma taurina conjugada del ácido ursodeoxicólico (UDCA), puede actuar como chaperona química, disminuyendo significativamente el estrés de RER. TUDCA es un ácido biliar anfifílico al cual se le atribuyen junto a UDCA, un amplio efecto terapéutico, entre ellos ser inhibidores de la apoptosis al interferir con la cascada de señalización de muerte celular en la mitocondria, inhibir la producción de radicales de oxígeno, reducir el estrés de RER y estabilizar la UPR (Vang et al., 2014).

En un modelo animal experimental de colestasis, se ha descrito que en una célula normal, TUDCA ingresaría al hepatocito mediante un co-transportador de taurinas llamado Ntcp (del inglés *sodium taurocholate co-transporting polypeptide*) (Beuers, 2006). También se ha descrito que TUDCA podría interactuar en el espacio extracelular con una integrina $\beta 1$, la cual activaría a las proteínas de señalización tirosina quinasa no receptoras, FAK y Src. Estas quinasas activan río abajo a las vías ERK1/2 y p38 respectivamente, las cuales incrementan la excreción de ácidos biliares mediante la inserción canicular de Bsep (del inglés *bile salt export pump*) y a la bomba de exportación de conjugados Mrp2 (del inglés *Multidrug resistance-associated protein 2*). Los efectos anti-colestásicos de TUDCA involucrarían una interacción con la proteína quinasa C (cPKC), a través de un mecanismo cooperativo con la proteína quinasa A (PKA), lo que previene la endocitosis de los transportadores de ácidos biliares inducidos por drogas colestásicas (Roma et al., 2011) (Figura 3B).

TUDCA es capaz de inhibir la apoptosis de hepatocitos inducida por el ácido glicoquenodesoxicólico (GCDC), una sal biliar citotóxica endógena que induce apoptosis a través de la activación del receptor de muerte CD95, independiente del ligando. GCDC gatilla la activación de la NADPH oxidasa, produciendo especies reactivas de oxígeno que permiten la activación de JNK. JNK es requerida para que CD95 intracelular se una a EGFR (del inglés *epidermal growth factor receptor*). El complejo CD95/EGFR trafica

hasta la membrana plasmática, donde se forma el complejo DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*) al reclutar a FADD (del inglés *Fas-associated death domain*) y caspasa 8. El efecto anti-apoptótico de TUDCA estaría dado por dos vías, en una se produce una rápida generación de AMPc dependiente de la integrina $\beta 1$ y una inducción de la expresión de MPK-1 (del inglés *Mitogen-activated protein kinase 1*), dependiente de PKA, que inhibe la activación de las JNK inducidas por GDCD, lo que impide la posterior asociación de EGFR y CD95. La otra vía involucra a la integrina $\beta 1$ y la fosforilación de residuos de serina/treonina de CD95 por parte de PKA, lo que impide desencadenar la señalización interna en CD95 (Sommerfeld et al., 2015). En cultivos de astrocitos, neuronas de rata y en hepatocitos, se ha observado que TUDCA inhibe la permeabilización transitoria de la mitocondria, impidiendo la liberación de citocromo c (Fernandez-Sanchez et al., 2015). Además, también inhibiría a Bax, una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2, que transloca desde el citosol a la membrana mitocondrial y que conduce a la pérdida del potencial de membrana y a la liberación de citocromo c. TUDCA fosforila a Bad, otro gen pro-apoptótico perteneciente a la familia Bcl-2, a través de la acción de PI3K (del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*), una enzima involucrada en crecimiento, proliferación, diferenciación, supervivencia celular y tráfico intracelular. TUDCA a su vez activa la vía Akt de supervivencia celular, disminuyendo la expresión de Bad (Amaral et al., 2009). También se ha sugerido que TUDCA disminuiría el estrés de RER al inhibir la activación de caspasa 12, caspasa involucrada en la inducción de apoptosis frente a condiciones de estrés de RER o perturbaciones nucleares y de las caspasas 3/7 que tienen un rol clave en la inducción de apoptosis y de la caspasa 4, de la cual se desconoce su función, pero tendría un rol específico en inducir apoptosis (Adams, 2003; Amaral et al., 2009; Miller et al., 2007). Además, modula los niveles de Ca^{+2} intracelulares, inhibiendo así la función de calpaínas, cisteína proteasas dependientes de calcio que son activadas en varias condiciones apoptóticas y necróticas (Fernandez Castro et al., 2016) (Figura 3C). En un modelo de ratas de neuropatía diabética inducida por estreptozotocina, TUDCA disminuye la expresión de moléculas importantes en inflamación y en respuesta inmune tales como ICAM-1, óxido nítrico sintasa (NOS), NF- κ B, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la retina. De esta manera, TUDCA contrarrestaría la inflamación y protegería a los vasos retinales (Wang et al., 2016)

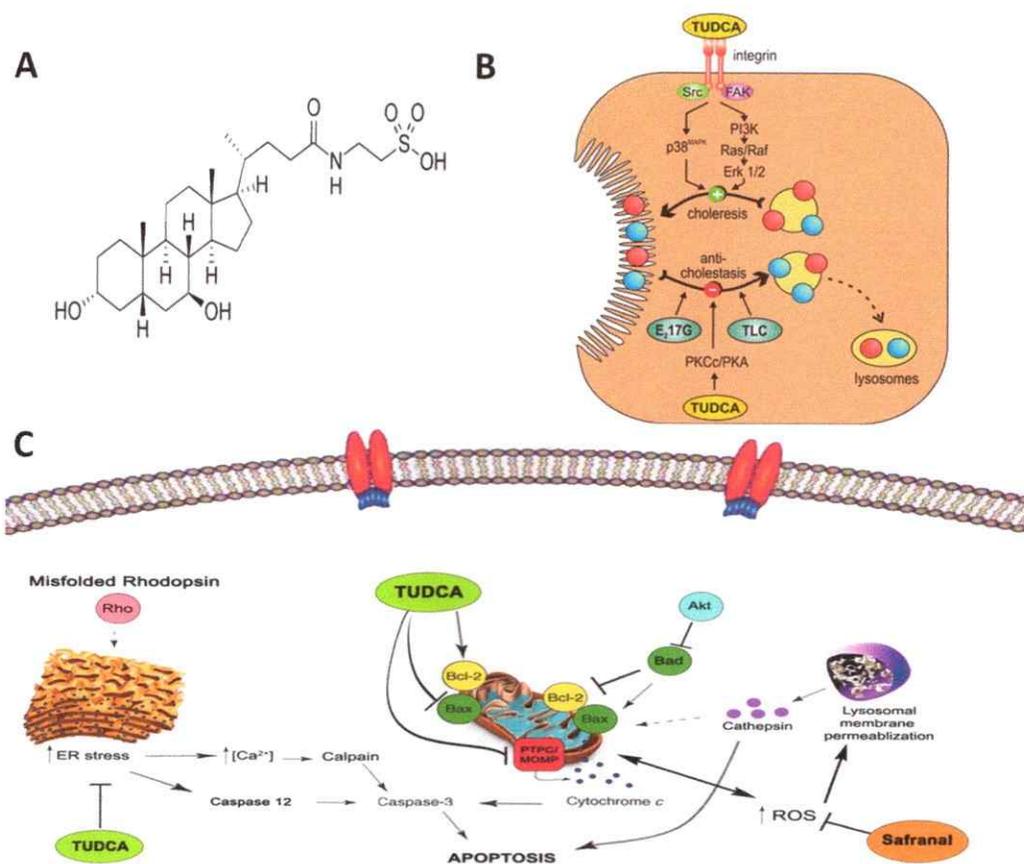


Figura 3: Esquema de las vías de regulación de TUDCA. A) Estructura de TUDCA, un ácido biliar anfifílico que es la forma taurina conjugada de UDCA. Se encuentra presente endógenamente en bajas cantidades en humanos. B) Regulación de TUDCA en células de hígado normal o con coleostasis, TUDCA en ambos casos es capaz de estimular a la bomba de exportación de sales biliares Bsep y a la bomba de exportación de conjugados Mrp2, TUDCA ingresa a la célula por un co-transportador de taurocólato, Ntcp. En un hepatocito normal, TUDCA interactúa con una integrina la que posteriormente desencadena una cascada de señalizaciones a partir de FAK y Src, lo que termina finalmente en la secreción de ácidos biliares por parte de Bsep. En un hepatocito con coleostasis, TUDCA interactuaría directamente con cPKC- α en cooperación con PKA, revirtiendo la coleostasis (Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology (2006) 3, 318-328). C) En Retina, TUDCA disminuiría el estrés de RE, debido a que es capaz de bloquear la activación de calpaínas que llevan a la apoptosis y también de estabilizar a la membrana externa de la mitocondria, deteniendo de esta forma la apoptosis mediada por caspasas (*Molecules* 2015, 20 (8), 13875-13893; doi:10.3390/molecules200813875).



TUDCA y UPR.

TUDCA, al tener una estructura anfifílica, previene eficazmente la agregación de proteínas no glicosiladas, ya que la porción hidrofóbica de TUDCA enmascara los componentes hidrófobos de las proteínas denaturadas. A su vez suprime la agregación de proteínas al potenciar la actividad de otras chaperonas como α -cristalina; lo mismo podría ocurrir con BiP (Song et al., 2011).

En estudios *in vitro*, en etapas de estrés agudo, se ha observado que TUDCA es capaz de inhibir la activación de las vías de la UPR, al prevenir la formación de los respectivos factores de transcripción de cada vía y la unión de éstos a los elementos ERSE y UPRE en el promotor de BiP para su posterior inducción transcripcional (Berger and Haller, 2011). Muchos de los efectos citoprotectores de TUDCA son atribuidos a 1) reducir la formación de especies reactivas de oxígeno, 2) la prevención de la disfunción mitocondrial y 3) la inhibición de la apoptosis (Cortez and Sim, 2014). En estudios relacionados con obesidad, se ha observado que TUDCA es capaz de mejorar la función del tejido adiposo, debido en parte, a la reducción del estrés de RE, la estabilización de la UPR, la mantención de la autofagia de adipocitos e inhibición de la adipogénesis (Vang et al., 2014).

En diabetes, muchos estudios han demostrado la capacidad de TUDCA para disminuir la hiperglicemia. Los altos niveles de glucosa causan estrés de RER y una autofagia defectuosa. Tratamientos con TUDCA redujeron el estrés de RER y la inflamación, aunque el defecto en la autofagia no fue totalmente revertido (Yoshizaki et al., 2012). El estrés de RER contribuye también con la insensibilidad a la insulina. En biopsias de pacientes obesos que fueron tratados con TUDCA por 4 semanas, se observó un aumento en un 30% de la sensibilidad a la insulina con respecto a los controles. Además, TUDCA restaura la capacidad de los islotes y la secreción de insulina, al disminuir el estrés. En islotes pancreáticos de cerdo, TUDCA también aumentó el contenido de ATP, lo que resultó beneficioso en la protección de los islotes que son utilizados en transplantes (Vang et al., 2014).

Un ejemplo de cómo la UPR disminuye bajo tratamiento con TUDCA, es lo que ocurre en un modelo de hipertensión espontánea, donde se observó un aumento de la expresión de BiP. Sin embargo, su expresión disminuyó cuando las células fueron tratadas con TUDCA. Algo similar se observó con la activación de las tres vías de UPR, IRE1 α , ATF6, PERK, y con la expresión de CHOP y eIF2 α , las que aumentaron en las arterias coronarias de hipertensión espontánea y disminuyeron en presencia de TUDCA (Choi et al., 2016). Otro ejemplo, en la formación de una neointima, una cicatriz en el tejido que se da en los vasos sanguíneos y que puede ser resultado de una cirugía vascular, produce la activación de las tres vías de UPR, además de inflamación. En un modelo Knockdown para XBP-1^{+/-}, se encontró que la supresión de esta vía de UPR, aumenta el engrosamiento de la neointima y la respuesta proliferativa y migratoria de las células musculares lisas de la arteria coronaria. Al utilizar TUDCA y 4-PBA (del inglés *4-phenylbutyrate*), una sal de ácido graso aromático que posee propiedades similares a TUDCA (Kolb et al., 2015), disminuyó el radio de lesión de la íntima, además de la reducción en los marcadores de estrés de RER (Ishimura et al., 2014).

En otro estudio se observó que TUDCA previene la agregación de albúmina de suero bovino inducido por el agente reductor ditioneitol (DTT), es decir, estabiliza las proteínas desplegadas y reduce la agregación de proteínas inducida por estrés en células HepG2 (Gani et al., 2015). Sin embargo, a diferencia de otros estudios también se ha observado que promueve la activación de PERK en células HepG2 tratadas con tunicamicina o UV. PERK activado promueve la fosforilación de eIF2- α , atenúa la traducción de proteínas e induce la transcripción de chaperonas. Estos eventos reducen la carga del RER, para plegar las proteínas y la disminución de la traducción puede resultar en la supervivencia celular (Gani et al., 2015).

Considerando todos los antecedentes mencionados, el objetivo de este estudio fue evaluar si TUDCA disminuye la expresión de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1, y MUC1 inducido por citoquinas pro-inflamatorias en células HSG. Hay que considerar que el aumento en ERAD es un reflejo de una condición crónica de estrés de RER como ha sido observado previamente (Barrera et al., 2016) y que la disminución de estas dos moléculas sería un reflejo de una condición basal de estrés de RER. Para ello se utilizó cultivos de células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y posteriormente co-incubadas con concentraciones crecientes de TUDCA. Se estimuló con citoquinas pro-inflamatorias TNF- α o IFN- γ , dado que estas citoquinas inducen estrés y reproducen la mayoría de los cambios relacionados con estrés de RER y UPR observados en GSL de pacientes con SS (Barrera et al., 2016). Se determinó los niveles de transcritos y de proteínas de dos marcadores de UPR relacionados con la maquinaria ERAD que son SEL1L y EDEM1, las que aumentan con la estimulación con estas citoquinas. Se espera que la administración de TUDCA disminuya el estrés de RER producido por las citoquinas en cultivo de células HSG en 2D. Además, se observó si TUDCA es capaz de disminuir los niveles de transcrito y proteína de MUC1, una mucina de transmembrana presente en las GS que se acumula en pacientes con SS. A su vez se determinó la localización subcelular de las proteínas SEL1L y EDEM1 en los cultivos de células HSG en 2D por inmunofluorescencia.

HIPÓTESIS

TUDCA disminuye los niveles de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1, y de la mucina MUC1, inducidos por citoquinas pro-inflamatorias en células HSG.

OBJETIVOS

Objetivo General:

-Evaluar si TUDCA disminuye la expresión de SEL1L, EDEM1 y MUC1 inducida por citoquinas pro-inflamatorias en células HGS.

Objetivos específicos:

En células HSG estimuladas con TNF- α o IFN- γ en presencia o ausencia de TUDCA se procedió a:

1. -Determinar los niveles de transcritos y proteínas de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1.
2. - Determinar los niveles de transcrito y proteína de MUC1.
3. - Determinar la localización subcelular de las proteínas SEL1L y EDEM1.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

Sales y reactivos

La totalidad de las sales, solventes orgánicos y reactivos generales utilizados fueron adquiridos en las empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Merck (Darmstadt, Germany), BioRad Laboratories (Hercules, CA, EEUU) y US Biological (Swampscott, MA, EEUU). La membrana de nitrocelulosa es de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EEUU). Los reactivos de quimiluminiscencia "SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate" y "SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate" son de Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU). El medio de cultivo DMEM: Ham's F12 (1:1) (DMEM-F-12) y el PBS pH 7,2 sin CaCl₂ ni MgCl₂ son de Gibco, Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU). El suero fetal caracterizado es de Hyclone (South Logan, UT, EEUU). Las soluciones de penicilina-estreptomina (penicilina 10.000 U/mL y estreptomina 10 mg/mL) y tripsina/EDTA 0,05% v/v son de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Las placas para cultivo celular son de BD Falcon (San Jose, CA, EEUU). Las placas de 35 mm con fondo de vidrio "Glass Bottom Microwell Dishes" son de MatTek Corporation (Ashland, MA, EEUU). Las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ son de BioLegend (San Diego, CA, EEUU). El kit para extracción de RNA "RNeasy Mini kit" y la DNasa I son de Qiagen (Valencia, CA, EEUU). El Cocktail de inhibidores de proteasas "*complete Mini*, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets" es de Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA). La parafina Histosec es de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). Hoechst 33342 es de Life Technologies (Eugene, OR, EEUU). Las enzimas RNasa out (recombinant ribonuclease inhibitor) y la transcriptasa reversa Super Script II junto con el amortiguador 5X y DTT 0,1 M son de Invitrogen™ de Life Technologies (Carlsbad, California, EEUU). Los oligo (dT), random primers, agua libre de nucleasas, dNTPs y el kit para el ensayo de viabilidad MTS® son de Promega (Madison, WI, EEUU). El kit Brilliant® II Sybr® Green QPCR Master Mix es de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU). TUDCA es de Calbiochem (Darmstadt, Germany). y Tunicamicina es de Sigma Aldrich (EEUU).

2. Partidores

Para las reacciones de PCR en tiempo real se diseñaron partidores para cada gen en estudio (Tabla 1), considerando que fueran específicos, que no formaran estructuras secundarias ni dímeros (Integrated DNA Technologies, Fermelo SA). Se utilizaron las secuencias de los genes disponibles en el banco de genes (GenBank, NCBI, NIH) y se diseñaron los partidores utilizando el programa AmplifX 1.4 (Institut Jean Roche, Francia).

3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 2, donde se entregan los datos correspondientes a la especie de procedencia, inmunógeno y la aplicación en la cual se utilizaron. Los anticuerpos son de las empresas: MP Biomedicals (Santa Ana, CA,

EEUU), Abcam (Cambridge, MA, EEUU), Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EEUU), Novus Biologicals, LLC. (Littleton, CO, EEUU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, EEUU), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU), Molecular Probes Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) y Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU). Uno de los anticuerpos contra EDEM1 es un anticuerpo policlonal no comercial generosamente donado por la Dra. Stefana-Maria Petrescu (Institute of Biochemistry of Romanian Academy, Bucharest, Rumania). Uno de los anticuerpos contra SEL1L es no comercial, generosamente donado por la Dra. Ida Biunno (ISENET Stem Cell Bank, Milan 20138, Italy).

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados

Genes	Nº Acceso	Secuencia	Producto (pb)
EDEM1	NM_014674.2	F: 5'-CATGGACTGTGCACGTGACACTTA-3' R: 5'-GAAACAAGGCCCTCAGATTGCACA-3	150
SEL1L	NM_005065.5 NM_001244984.1	F: 5'-CCATTGAAGGCACAGCACAT-3' R: 5'-AAGCCCCACTTTTCATCTGC-3'	151
MUC1*	NM_001204290.1 NM_001204294.1 NM_001044393.2 NM_001044390.2 NM_001044391.2 NM_001018017.2 NM_001204293.1 NM_002456.5 NM_001204285.1 NM_001204289.1 NM_001204291.1 NM_001204292.1 NM_001204296.1 NM_001044392.2 NM_001204295.1 NM_001204288.1 NM_001018016.2 NM_001204297.1 NM_001204287.1 NM_001204286.1	F:: 5'-GCCACTTCTGCCAACTTGTA-3' R: 5'-TGAGCTTCCACACACTGAGA-3'	202
MUC1/SEC	M61170.2	F: 5'-CTGATGCCAGTAGCACTCACCATA-3' R: 5'-TGGGGAAGGAAAGGCCGATACTCA-3'	219
h18S	NM_022551.2	F: 5'-GATATGCTCATGTGGTGTGTTG-3' R: 5'-AATCTTCTTCAGTCGCTCCA-3'	236

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios. Listado de anticuerpos usados y sus condiciones de incubación

Anticuerpo primario	Origen	Dilución y Bloqueo	Inmudógeno	Empresa	Incubación
Anti-EDDEM1, policlonal	Conejo	WB: 1:300IF: 1:150 Bloqueo: 8%	proteína EDDEM1 completa de ratón	Donación Dra. Petrescu, Rumania	WB: 2 h, TA IF: 22h, 4°C
Anti-SEL1L, monoclonal (clon MSe11), IgG1	Ratón	WB: 1:2000 Bloqueo: 5%	SEL1L humana recombinante	Enzo Life Sciences, Inc., ALX-804-579	WB: 2 h, TA
Anti-SEL1L, monoclonal	Ratón	IF: 1:300 Bloqueo: 10%	SEL1L humana recombinante	Donación Dra. Ida Blunno, Italia	IF: 22 h, 4°C
Anti-MUC1, monoclonal (LICRlonM8), IgG1	Ratón	WB: 1:10 Bloqueo 5%	Epitope DTR del dominio glicosilado de MUC1	Dra. Dallas Swallow	WB: 20 h, 4°C
Anti-PDI, monoclonal (clon 1D3), IgG1	Ratón	IF: 1:200 Bloqueo: 10%	Péptido sintético correspondiente a la secuencia C-terminal de PDI de rata	Enzo Life Sciences, Inc., ADI-SPA-891	IF: 22h, 4°C
Anti-Sintaxina 4 monoclonal, clon 49, isotopo IgG1	Ratón	IF: 1:100 Bloqueo: 10%	Sintaxina 4 humana aa 1-280	BD Biosciences, San José, CA, USA	IF: 22h, 4°C
Anti-p62, monoclonal isotopo IgG2a	Ratón	IF: 1:100 Bloqueo: 10%	Proteína recombinante de longitud completa, correspondiente a los aminoácidos 1-441 de p62 humana	Abcam, USA	IF: 22h, 4°C
Anti-β-actina, monoclonal (clon C4)	Ratón	WB:1:10.000 Bloqueo: 55	Actina de molienda de pollo	MP Biomedicals, 69100	WB: 30 min, TA.
Anticuerpo Secundario					
Anti-IgG (H+L) conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP)			Empresa Pierce® de Thermo Scientific, 31462	Origen Cabra	Dilución WB: 1:10.000
Anti-IgG (H+L) ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP)			Pierce® de Thermo Scientific, 31432	Cabra	WB: 1:10.000
Anti-IgG (H+L) conejo-Alexa fluor (488-546)			Molecular Probes®, A-11008 (488) y A-11010 (546)	Cabra	IF: 1:200-1:100
Anti-IgG (H+L) ratón- Alexa fluor (488-546)			Molecular Probes®, A-11001 (488) y A 11003 (546)	Cabra	IF: 1:200-1:100

II Métodos

1. Cultivo de células HSG en dos dimensiones (2D)

La línea celular de glándula submandibular humana (HSG) fue gentilmente donada por el Profesor Dr. Bruce Baum (NIDCR, NIH, Bethesda, MD, USA). Las células HSG son de origen epitelial, transformadas y aisladas desde células ductales intercalares de una glándula submandibular humana irradiada (Sato. M. et.al. 1985). Las células se cultivaron a 37°C y 5% CO₂, en medio de cultivo DMEM F-12 suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino, penicilina 10.000 U/mL y estreptomycinina 10 mg/mL. Las células se cosecharon usando tripsina/EDTA 0,25% v/v y se suspendieron en medio de cultivo con 5% SFB v/v. Las células (2X10⁵ células/pocillo) se sembraron en placas de seis pocillos. Después de 24 h, las células HSG se lavaron tres veces con PBS y se privaron de suero por 24 h para inducir diferenciación funcional. La eficacia de esta estrategia ha sido corroborada en nuestro laboratorio (Barrera et al., 2016; Barrera et al., 2015). Luego de 24 h de privación, las células se sometieron a diferentes condiciones experimentales.

2. Tratamientos

El efecto del medio ambiente inflamatorio en la inducción de proteínas que participan en ERAD se evaluó en células HSG estimuladas separadamente con TNF- α , IFN- γ o tunicamicina. Para ello células HSG 2D privadas de suero por 24 h se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α o IFN- γ o 100 ng/mL de tunicamicina en medio sin suero por 24 h. También se probaron estimulaciones por 6 h, luego de las cuales se co-incubó con TUDCA (50, 100, 150, 250 o 500 μ M) hasta completar 24 h. Posteriormente, las células se procesaron para extraer RNA, proteínas, realizar inmunofluorescencia o ensayos de viabilidad como se describe más abajo.

3. Determinación de los niveles de transcritos por PCR en tiempo real

3.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó empleando el método de extracción por afinidad en columnas de sílica gel RNeasy (RNeasy mini kit) acoplado a la digestión de DNA genómico, según las indicaciones del fabricante (Qiagen).

La extracción de RNA total a partir de células HSG (crecidas en placas de 6 pocillos) se realizó con 600 μ L de amortiguador de lisis RLT con β -mercaptoetanol al 1% v/v, luego de lavar dos veces con PBS. El volumen total de homogeneizado se pasó cinco veces por una jeringa de tuberculina. El lisado se centrifugó durante 2 min a 12.000 rpm (Centrifuge 5415 C, radio 7,3 cm, Eppendorf, EEUU). Al sobrenadante obtenido se le agregó 700 μ L de etanol al 70% con el objeto de aumentar la afinidad y favorecer la unión selectiva del RNA a la columna de afinidad. La mezcla se depositó en columnas de afinidad RNeasy y centrifugó durante 15 s a 12.000 rpm. El RNA unido a la membrana de sílica se lavó con 350 μ L de amortiguador RW1 (RNeasy Mini Kit, composición protegida por patente N° 5.234.809), centrifugando durante 15 s a 12.000 rpm. Para eliminar el DNA genómico, se realizó un tratamiento con DNasa, para ello se adicionó 80 μ L de una mezcla de digestión que contiene 10 μ L de DNasa I más 70 μ L de

amortiguador RDD (presente en el set de la DNasa I). La mezcla de digestión se agregó en el centro de la membrana y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se lavó con 350 μ L de amortiguador RW1 y se centrifugó durante 15 s a 12.000 rpm, descartando el eluido. Luego se realizó un lavado con 500 μ L de amortiguador RPE (RNeasy Mini Kit, composición protegida por patente No. 5.234.809) con etanol al 70%, centrifugando a 12.000 rpm durante 2 min. Finalmente, el RNA se eluyó con 30 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA se determinó midiendo la absorbancia de cada muestra (dilución 1:200) a 260 y 280 nm y calculando la relación 260/280. Todas las muestras que se utilizaron presentaron una relación de 1,5 a 2,0 y no generaron productos específicos al amplificarlas por PCR al usar partidores para h18S (gen de referencia). La concentración de RNA se determinó empleando la fórmula:

$$[\text{RNA}] = 200 (\text{factor de dilución}) \times (\text{Abs. } 260 \text{ nm}) \times 40 (\mu\text{g/mL}).$$

3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa formaldehído

Con el propósito de verificar la calidad del RNA extraído y descartar aquellas preparaciones que pudiesen presentar degradación y/o contaminación con DNA genómico, se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes. Un microgramo de RNA total se diluyó en amortiguador de carga de RNA 6X (azul de bromofenol 0,04% p/v, xileno cianol 0,04% p/v, formaldehído 6% v/v, formamida 40% v/v, glicerol 3% v/v y bromuro de etidio 0,1 μ g/ μ L en amortiguador MOPS, pH 8) y se denaturó durante 5 min a 72°C en baño termoregulado. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1% p/v y formaldehído al 8% v/v en amortiguador MOPS (MOPS 0,2 M: acetato de sodio 0,05 M, EDTA 1 mM, pH 8). La separación electroforética se realizó a 110 V por 40 min con amortiguador de corrida MOPS. Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador UV (FBTIV-816 Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EEUU), empleando una cámara digital Nikon coolpix S230.

3.3. Síntesis de cDNA

Inicialmente 1 μ g de RNA total se mezcló con 1 μ L de RNasa out, 0,5 μ L de oligo (dT), 0,5 μ L de random primers y un volumen de agua libre de nucleasas adecuado para llegar a un volumen final de reacción de 12 μ L. Esta solución se calentó a 70 °C por 10 min. Consecutivamente, se agregaron 4 μ L de amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ L de DTT 0,1 M y 1 μ L de dNTPs 10 mM y la mezcla se calentó a 42°C por 2 min. Se agregó 1 μ L de la enzima Super Script II (200U) y se incubó a 42°C durante 60 min. El procedimiento finalizó con una incubación a 70°C por 15 min.

3.4. PCR en Tiempo Real

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit Brilliant® II Sybr® Green QPCR Master Mix y un termociclador modelo MxPro-Mx 3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un volumen final de 20 μ L conteniendo 10 μ L del Brilliant® II Sybr® Green QPCR Master Mix 2 X (enzima SureStart® Taq polimerasa, Sybr Green® I Dye, MgCl₂ 2,5 mM y

dNTPs), 0,4 µL de cada partidor (200 nM concentración final, Tabla 1) y 7,2 µL de agua libre de nucleasas. Se empleó un protocolo con 10 min de denaturación inicial a 95°C para activar la enzima y 40 ciclos consecutivos de denaturación a 95°C por 15 s, apareamiento de partidores a 60°C por 15 s y elongación a 72°C por 15 s. La especificidad y temperatura de denaturación (T_m) de los amplicones se obtuvo usando un ciclo adicional que consistió de denaturación a 95°C por 10 s, apareamiento a 70°C por 1 s e incrementos de temperatura de 0,02°C/s hasta 95°C durante 10 min. Los valores de Ct se obtuvieron con el programa MxPro QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

La razón de transcritos relativa de un gen blanco se expresó en comparación al gen de referencia h18S. La razón de transcritos relativa de un gen de interés se calculó usando el modelo calibrado de la eficiencia (Pfaffl et al., 2002). Este modelo matemático considera la eficiencia de reacción y la diferencia de Ct (ΔCt) entre la muestra control y la muestra experimental tanto para el gen de interés como el gen de referencia, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Razón de transcrito relativa} = \frac{(E_{\text{interés}})^{\Delta Ct (\text{promedio control} - \text{promedio muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct (\text{promedio control} - \text{promedio muestra})}}$$

Para cada par de partidores se utilizó un control negativo sin templado y para descartar contaminación del RNA extraído con DNA genómico se utilizó un control con RNA (1:10) como templado.

3.5. Detección de los productos de amplificación

Los productos de PCR en tiempo real se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v en amortiguador TAE (Tris-HCl 0,04 M, ácido acético 0,04 M, EDTA 2 mM, pH 8,0) teñidos con GelRed (Biotium, Inc, Hayward, CA, EEUU). En cada bolsillo del gel se cargaron alícuotas de 5 µL de los productos de PCR diluido en buffer de carga 6X. La electroforesis se efectuó a 110 V por 45 min, con amortiguador de corrida TAE. El gel de agarosa se analizó en un transiluminador UV y fue fotografiado, con el objetivo de comprobar la presencia de productos únicos y de tamaño esperado.

4. Análisis de los niveles proteicos por inmunquímica

4.1. Extracción de proteínas

Células HSG crecidas en placas de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS y se homogeneizaron con 100 µL de amortiguador RIPA (Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, Deoxicolato de sodio 1%, pH 7,4), en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas en una relación 1:5 (p/v). Luego, la suspensión se succionó con una jeringa de tuberculina de 1 mL. Finalmente, los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm (Centrifuge Universal 32R, radio 13,7 cm, Marca Hettich, EEUU) por 5 min a 4°C. El sedimento se descartó, mientras que la fracción soluble se utilizó para cuantificar las proteínas.

4.2. Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford M.M 1976). Diluciones seriadas del extracto de proteínas se incubaron con reactivo de Bradford en una relación 1:5 (v/v), durante 2 min a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia de la muestra a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV---VIS, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU). La curva de calibración de concentraciones conocidas de proteínas se realizó utilizando albúmina de suero bovino (BSA). Las concentraciones de las muestras extraídas se determinaron utilizando la ecuación de la recta que fue obtenida con la curva de calibración de BSA.

4.3. Western blot

Las muestras se separaron de acuerdo a sus pesos moleculares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones denaturantes y reductoras. Inicialmente 20 µg de proteína total se diluyeron en relación 1:1 con amortiguador de carga 2X (Tris-HCl 125 mM, SDS 4,6% p/v, glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 5% v/v, pH 6,8) y calentaron a 100°C durante 5 min. La separación electroforética se realizó en mini geles de poliacrilamida al 8% en amortiguador de corrida (Glicina 192 mM, Tris Base 25 mM, SDS 0,1% p/v). Se aplicó una corriente continua de 12 mA hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador, a partir de ese punto, la separación de las proteínas se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45µm), usando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 20 mM, Glicina 154 mM, metanol 20% v/v; para MUC1 al buffer se le agregó SDS 0,05 % p/v) y corriente continua de 60 mA durante 15 h a 4°C. Para evaluar la calidad de la transferencia, las membranas se lavaron con agua destilada y tiñeron con rojo Ponceau al 5% p/v durante 10 min a temperatura ambiente.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5-8% p/v (ver condiciones para cada molécula en la Tabla 2) en amortiguador TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% v/v, pH 7,4) durante 1 h a temperatura ambiente. Para identificar las proteínas en estudio se utilizaron los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 2, los cuales se disolvieron en TBS-T. Estos anticuerpos primarios se incubaron en las condiciones óptimas para cada uno de ellos, luego de estandarizar la concentración de proteína a utilizar, la dilución del anticuerpo, temperatura y tiempo de incubación (Tabla 2). Como control de carga se utilizó la proteína β-actina. Luego de cinco lavados de 5 min cada uno con TBS-T, las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Se determinó una dilución de anticuerpo secundario que reconociera específicamente la banda a analizar (Tabla 2). A continuación, las membranas se lavaron cinco veces por 5 min cada uno con TBS-T y revelaron mediante quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron durante 5 min con solución quimioluminiscente (1:1 solución A y solución B) y se revelaron utilizando el sistema de captura digital C-DiGit® blot scanner (LI-COR Inc, Lincoln, Nebraska EEUU). La intensidad de las bandas se determinó por densitometría usando el mismo software disponible en el C-DiGit® blot scanner (LI-COR Inc, Lincoln,

Nebraska, EEUU). Los niveles de expresión proteica se normalizaron en relación con los niveles de β -actina.

5. Inmunofluorescencia

5.1. Inmunofluorescencia en células HSG.

Se cultivaron 15.000 células HSG sobre cubreobjetos. Luego de los tratamientos respectivos, las células se fijaron en PFA al 3,7% (para inmunofluorescencia de SEL1L, EDEM1, PDI, sintaxina-4) por 20 min a temperatura ambiente. Consecutivamente, las muestras se lavaron dos veces con HEPES 100 mM y dos veces con PBS. Luego las células se permeabilizaron y bloquearon con un buffer que contenía 0,05% de saponina, 10% de suero de cabra, 10 mM de HEPES y 15 mM de glicina de por 20 minutos (Bernasconi. R y cols 2012). Luego las células fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 2) por 22 h a 4°C. Después de lavar 3 veces con buffer PS (10% suero de cabra, 10 mM de HEPES y 15 mM de glicina), las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 o 546 (Tabla 2) y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, 1:1.000, por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con buffer PS y 1 vez con H₂O, las muestras se montaron con Mowiol® y se observaron con un microscopio confocal Olympus modelo FluoView FV10i.

5.2. Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia.

Se tomaron microfotografías con aumento 60X de las inmunofluorescencias en células o con aumento 60X y un zoom digital de 3X, utilizando el microscopio confocal Olympus modelo FluoView FV10i. Los parámetros de intensidad de láser, sensibilidad del detector y tamaño del pinhole se mantuvieron constantes para la obtención de todas las microfotografías analizadas. Cada canal de las imágenes obtenidas, se almacenó independientemente en formato TIFF de 8 bit. Posteriormente utilizando el programa ImageJ (NIH, EEUU), se cuantificó la intensidad de fluorescencia por área en las microfotografías completas. Se midió así la intensidad de señal por canales, tanto para EDEM1 como para SEL1L en las distintas condiciones experimentales y esas fueron comparadas entre sí. La intensidad de fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias (u.a.) por área (μm^2).

6. Ensayo de viabilidad MTS®

Se cultivaron 4.000 células HSG en placas de 96 pocillos durante 24 horas y luego se privaron de suero por 24 h. Posteriormente, las células se estimularon por 24 h con TNF- α o IFN- γ (10 ng/mL) o tunicamicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 100 ng/ml). Otros pocillos fueron estimulados por 6 horas con citoquinas o tunicamicina y posteriormente co-incubados con 250 μM de TUDCA hasta completar las 24 h. Otros pocillos se dejaron sin estimulación y otros pocillos se estimularon sólo con TUDCA, además de los respectivos blancos sólo con medio, sin células. A cada pocillo conteniendo un volumen de 100 μL , se le agregó 20 μL de una mezcla 20:1 de MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetil-fenil)-2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio; MTS /metosulfato de fenazina; PMS)

por 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂. Finalmente, se determinó la reducción del compuesto MTS a formazán por medición de la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA (ELX800, BioTek, Winooski, VT, EEUU). Cada condición experimental se realizó en cuadruplicado para cada experimento. Los valores promedio de absorbancia se expresaron como porcentaje de viabilidad celular, luego de asignar un valor de 100% al promedio de la absorbancia registrada por la condición no tratada.

7. Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado y para cada uno de ellos se realizaron ensayos en cuadruplicado. Los gráficos presentan el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM, del inglés *standard error mean*), las comparaciones se hicieron utilizando el test no paramétrico Mann-Whitney. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

OBJETIVO ESPECIFICO N°1

Determinar los niveles de transcritos y proteínas de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1, en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias en presencia o ausencia de TUDCA.

Estudios previos en el laboratorio, permitieron determinar los niveles de expresión de moléculas que participaban en la vía ERAD, entre ellos EDEM1 y SEL1L en GSL de pacientes con SS. Los niveles de mRNA de EDEM1 no cambiaban entre pacientes y controles, mientras que sus niveles proteicos aumentaban en pacientes respecto a controles, tanto en sus niveles totales como en su forma deglicosilada. Respecto a SEL1L sólo se determinaron sus niveles de transcrito, encontrándose un aumento en GSL de pacientes (Barrera et al., 2016).

En un modelo de acinos 3D formado a partir de células HSG, estimulados con TNF- α o IFN- γ , se reprodujeron varios de los hallazgos encontrados en pacientes, tales como un aumento en la expresión de SEL1L y EDEM1 (Barrera et al., 2016). Considerando esto, en este trabajo se utilizaron células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias, para ver si TUDCA era capaz de disminuir o revertir el aumento de estas dos moléculas de la vía ERAD.

Las células HSG fueron estimuladas por 6 horas con TNF- α o IFN- γ , ya que a ese tiempo se ha observado inducción de marcadores de UPR tales como EDEM1 (Barrera et al., 2016). Luego de esas 6 horas iniciales de inducción de estrés, se agregó TUDCA a distintas concentraciones hasta completar las 24 h. Posteriormente se midió los niveles proteicos de SEL1L y EDEM1, observándose un aumento de estos marcadores de ERAD bajo estimulación con IFN- γ (Fig. 4 A-C) o TNF- α (Fig. 4 D-F). La co-incubación con concentraciones crecientes de TUDCA disminuyó significativamente el aumento en los niveles proteicos de estos marcadores. Más aun, la co-incubación con una concentración de 500 μ M resultó en una disminución mayor para SEL1L y EDEM1, alcanzando incluso niveles proteicos significativamente menores a los encontrados en la condición basal (Fig. 4 A-C para IFN- γ y Fig. 4 D-F para TNF- α). Frente a esta situación se decidió repetir las condiciones experimentales, pero esta vez usando concentraciones intermedias de TUDCA, entre 100 μ M y 500 μ M, las que fueron 150 μ M y 250 μ M. Se analizaron los niveles proteicos nuevamente y se volvió a observar un aumento de SEL1L y EDEM1 en presencia de IFN- γ (Figura 5 A-C) o TNF- α (Fig. 5 D-F). Sin embargo, los niveles proteicos disminuyeron en presencia de ambas concentraciones de TUDCA, acercándose a los niveles basales tanto en presencia de IFN- γ (Fig. 5 A-C) o TNF- α (Fig.5 D-F).

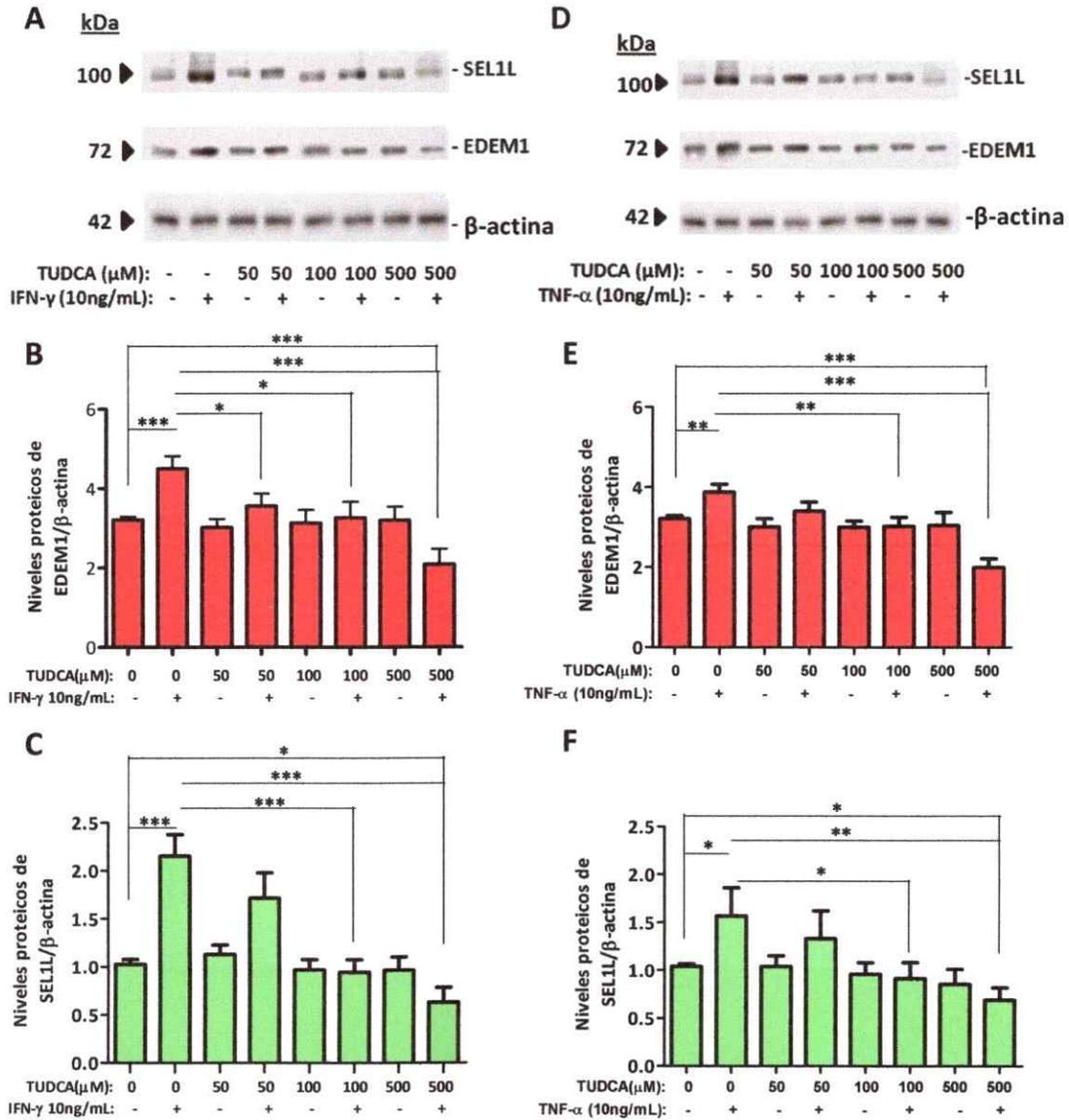


Figura 4: Niveles proteicos de moléculas que participan en ERAD en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con TUDCA. Imagen representativa de la detección de las proteínas SEL1L y EDEM1 mediante Western blot en extractos de células HSG estimuladas con IFN-γ (A) o TNF-α (D) por 24 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de TUDCA. Análisis densitométrico de las moléculas evaluadas en A (B y C) o evaluadas en D (E y F), normalizando con respecto a β-actina. Se realizaron cuatro experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$).

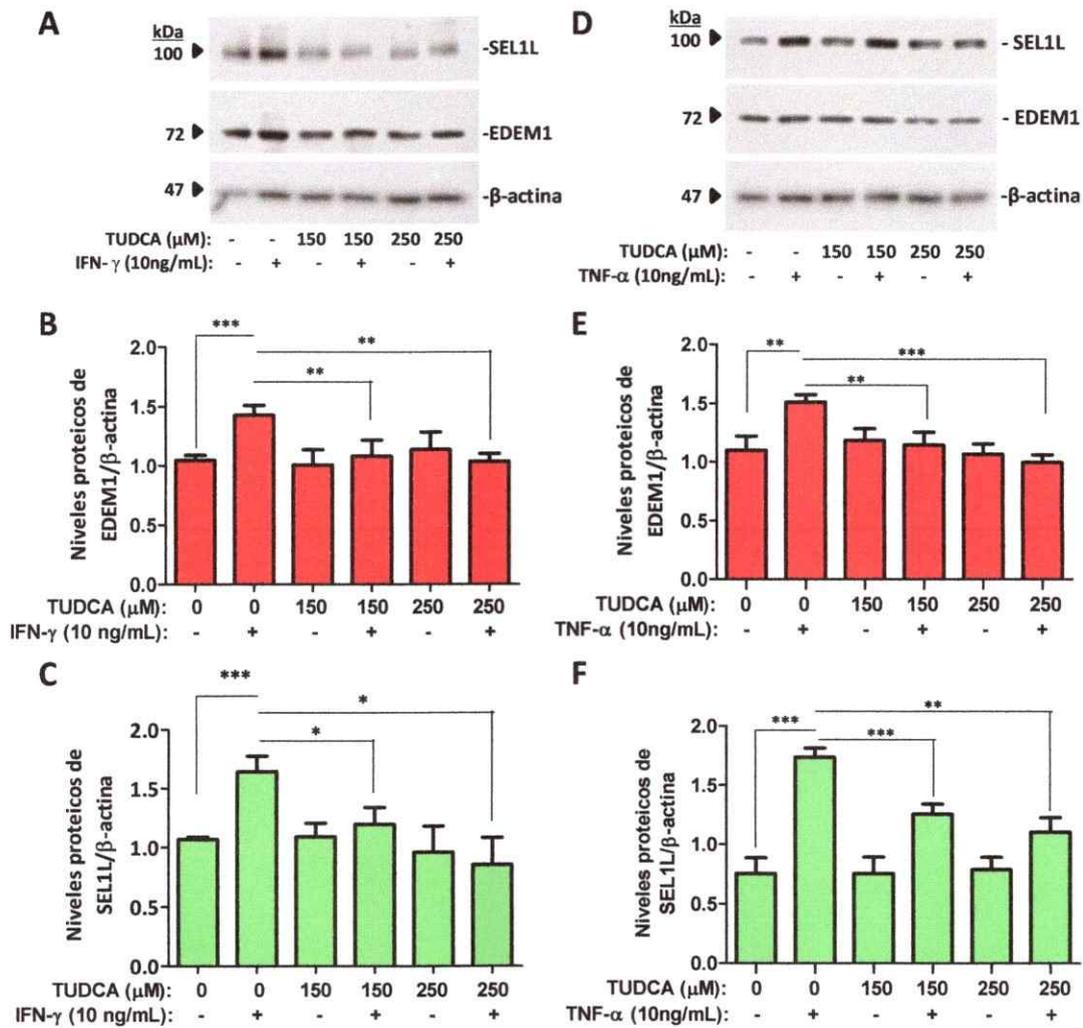


Figura 5. Niveles proteicos de SEL1L y EDEM1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con concentraciones intermedias de TUDCA. . Imagen representativa de la detección de las proteínas SEL1L y EDEM1 mediante Western blot en extractos de células HSG estimuladas con IFN- γ (A) o TNF- α (D) por 24 h en ausencia o presencia de concentraciones intermedias de TUDCA. Análisis densitométrico de las moléculas evaluadas en A (B y C) o evaluadas en D (E y F) normalizando con respecto a β -actina. Se realizaron tres experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$).

Ambas concentraciones intermedias de TUDCA, 150 y 250 μ M, redujeron los niveles proteicos de SEL1L y EDEM1 inducidos por las citoquinas pro-inflamatorias a un nivel cercano al basal. Considerando este resultado, las siguientes determinaciones fueron realizadas con estas dos concentraciones.

Luego de determinar los niveles de proteínas en las condiciones experimentales evaluadas, se procedió a determinar los niveles de transcrito de EDEM1 y SEL1L. Para ello, inicialmente se evaluó la calidad e integridad de los RNAs extraídos, cargando las muestras en geles denaturantes de agarosa-formaldehído. Como muestra la Figura 6 no hubo degradación de los RNAs extraídos (bandas 28S y 18S), aunque las bandas de dos carriles parecían más tenues, lo que podría indicar una menor cantidad de RNA cargado. En general, las bandas de RNA se ven bastante similares entre células estimuladas con IFN- γ (Fig. 6A) o TNF- α (Fig. 6B)

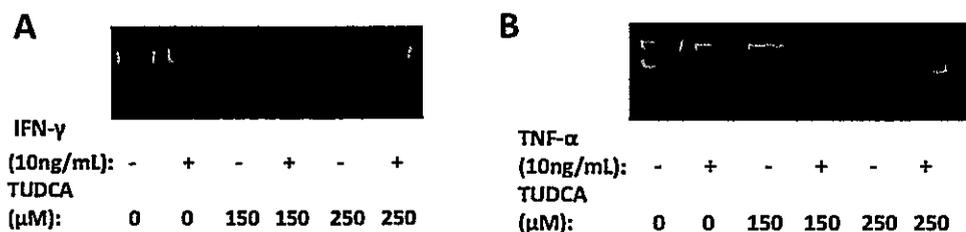


Figura 6. Detección de RNA total en geles denaturantes de agarosa-formaldehído. Imagen representativa que muestra la calidad del RNA total extraído en células no tratadas, tratadas con IFN- γ (A) o TNF- α (B) en ausencia o presencia de TUDCA.

Los niveles de transcrito de SEL1L y EDEM1 mostraron un aumento luego de la estimulación con citoquinas. Sin embargo, la co-incubación con TUDCA mostró una disminución en los niveles de transcritos tanto en la condición bajo estimulación con IFN- γ (Fig. 7 A-B), como con TNF- α (Fig. 7 C-D), lo cual a su vez fue concordante con los niveles proteicos. Además, al incubar las células HSG con distintas concentraciones de TUDCA en ausencia de citoquinas, no mostraron cambios significativos en los niveles de proteínas (Fig. 5) o de transcritos (Fig. 7). El efecto en la inducción de componentes de la maquinaria ERAD por TNF- α o IFN- γ parece ser similar.

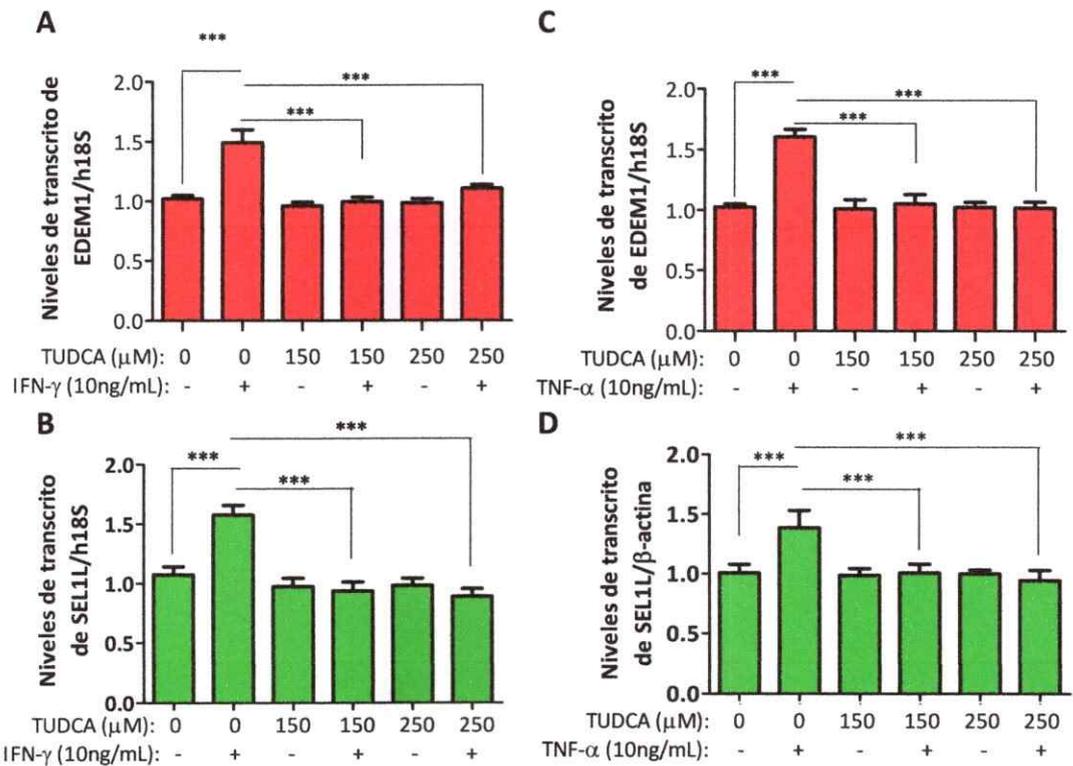


Figura 7. Niveles de transcritos de SEL1L y EDEM1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y co-incubadas con TUDCA. Los niveles de transcritos de EDEM1 (A y C) y SEL1L (B y D) fueron determinados a partir de extractos de RNA de células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- γ (A y B) o TNF- α (C y D) y co-incubadas con 150 o 250 μ M de TUDCA, mediante PCR en tiempo real y normalizado con el gen de h18S. Se realizaron tres experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$).

En estudios previos del laboratorio, los partidores para SEL1L y EDEM1 habían sido sintetizados y validados. Aún así, para determinar que el producto obtenido fuese único, sin contaminación y que la banda sea del tamaño esperado, se corrieron los productos de qPCR en un gel de agarosa. Se observó que la banda de h18S (Fig. 8, carriles 1 al 3) tuvo un tamaño mayor a 200 pb, lo cual fue esperado, ya que tiene 236 pb. Mientras que los productos de EDEM1 (Fig. 8, carriles 4 al 6) y SEL1L (Fig. 8, carriles 7 al 9) se observaron entre los 100 y 200 pb, debido a que presentan 150 y 151 pb, respectivamente. Por otro lado, no se observaron diferencias en la intensidad de las bandas, esto se debe a que la muestra fue obtenida al final del qPCR cuando la reacción alcanzó la saturación. Además, no se observaron dímeros de primers por debajo de los productos. Lo que indicó, que la concentración de partidores utilizada fue la necesaria y no favoreció la formación de dímeros de primers.

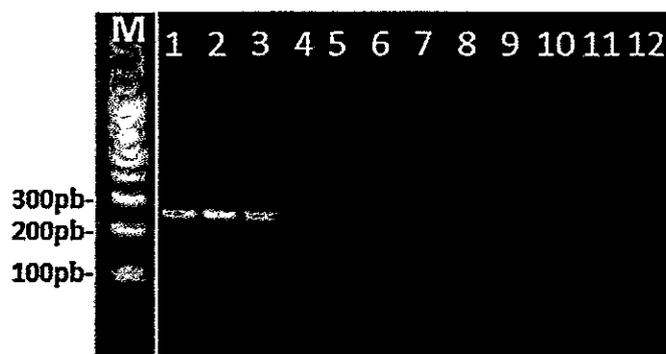


Figura 8. Gel representativo de productos de qPCR de SEL1L y EDEM1. Los carriles 1, 4 y 7 corresponden a los productos de qPCR de h18S, EDEM1 y SEL1L, respectivamente en células HSG no tratadas. Los carriles 2, 5 y 8 y los carriles 3, 6 y 9 corresponden a los productos de qPCR de h18S, EDEM1 y SEL1L, respectivamente en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- γ o TNF- α , respectivamente. Los carriles 10, 11 y 12 son los controles negativos para h18S, EDEM1 y SEL1L.

Anteriormente, en nuestro laboratorio, sólo se habían medido los niveles proteicos de EDEM1 y HRD1 en GSL de pacientes con SS y controles. Sin embargo, no se habían medido los niveles proteicos de SEL1L. Es por ello que en este trabajo también se determinaron los niveles proteicos de esta proteína en GSL de controles y pacientes SS, para corroborar, de esa manera, que el modelo de células HSG también podría reproducir lo observado en GSL de pacientes con SS. Los resultados del Western blot mostraron que 7 de los 8 pacientes (P) presentaron una banda específica utilizando el anticuerpo contra SEL1L, mientras que esta banda solo fue detectable en 4 de los 6 controles (C). Además, se observó una mayor intensidad en las bandas detectadas para el anticuerpo contra SEL1L en los pacientes (Fig. 9A). Al hacer el análisis densitométrico, se encontró un aumento significativo de los niveles proteicos de SEL1L en los pacientes con SS respecto a controles (Fig. 9B). Este resultado apoyó nuevamente la utilidad de las células HSG estimuladas con citoquinas como un buen modelo para reproducir lo que ocurre con ERAD en los pacientes SS.

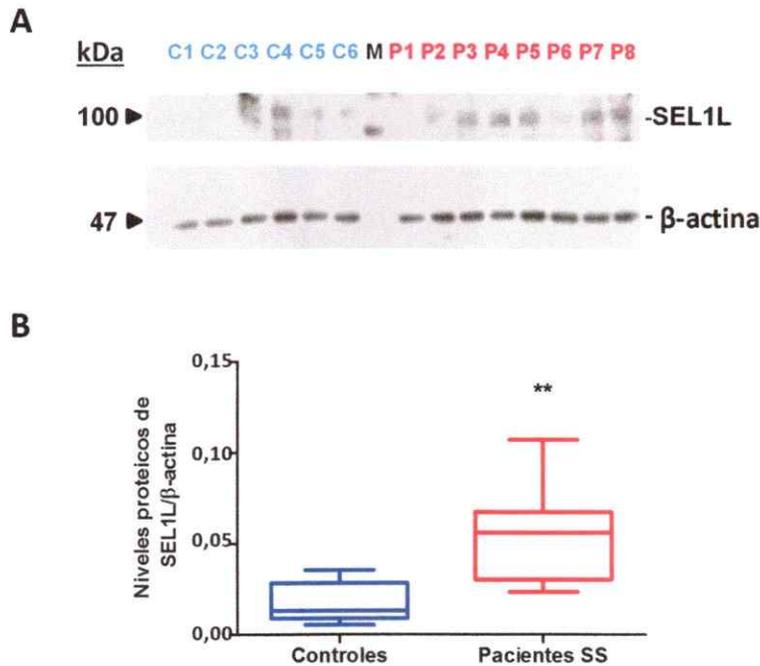


Figura 9. Niveles proteicos de SEL1L en GSL de pacientes con SS y controles. A) Imagen representativa de la detección de SEL1L en extractos proteicos de GSL de controles (C) y pacientes SS (P) mediante Western blot. Se observó una banda de ~100 kDa que corresponde a SEL1L. β-actina de ~47 kDa fue usada como control de carga. M: marcador de peso molecular. B) Análisis densitométrico de los niveles proteicos relativos de SEL1L en GSL de controles (n=6) y pacientes SS (n=8) obtenidos en triplicado y normalizado con respecto a β-actina. Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles proteicos relativos de SEL1L en GSL de pacientes SS. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$).

Ensayo de viabilidad en células HSG.

Como se observó en la Figura 4, la concentración de TUDCA 500 μ M resultó en una disminución por debajo del nivel basal, indicando un posible efecto citotóxico que podría estar matando las células. Es por ello que se quiso corroborar que las concentraciones de los compuestos utilizados en los experimentos, no resultaron citotóxicos para las células. La viabilidad celular se determinó en células HSG incubadas con citoquinas pro-inflamatorias en presencia o ausencia de TUDCA. Como controles se usaron células sin estimular o estimuladas sólo con TUDCA. Además, se utilizó un tratamiento con tunicamicina a la concentración usada en las inmunofluorescencias (100 ng/mL) y una concentración aun mayor (1000 ng/mL), para ver su efecto en la viabilidad celular. Efectivamente la mayor concentración de tunicamicina provocó una disminución significativa de la viabilidad celular (Fig. 10). La presencia de las citoquinas pro-inflamatorias junto con TUDCA aumentó significativamente la viabilidad celular (Fig.10, barras 5 y 6), mientras que la incubación con TUDCA en ausencia de citoquinas no induce una mayor viabilidad celular (Fig. 10, barra 4). Se escogió finalmente la concentración de 250 μ M, ya que no produjo un efecto citotóxico en las células y además produjo una disminución significativa cercana a los niveles basales del transcrito y proteína de SEL1L y EDEM1.

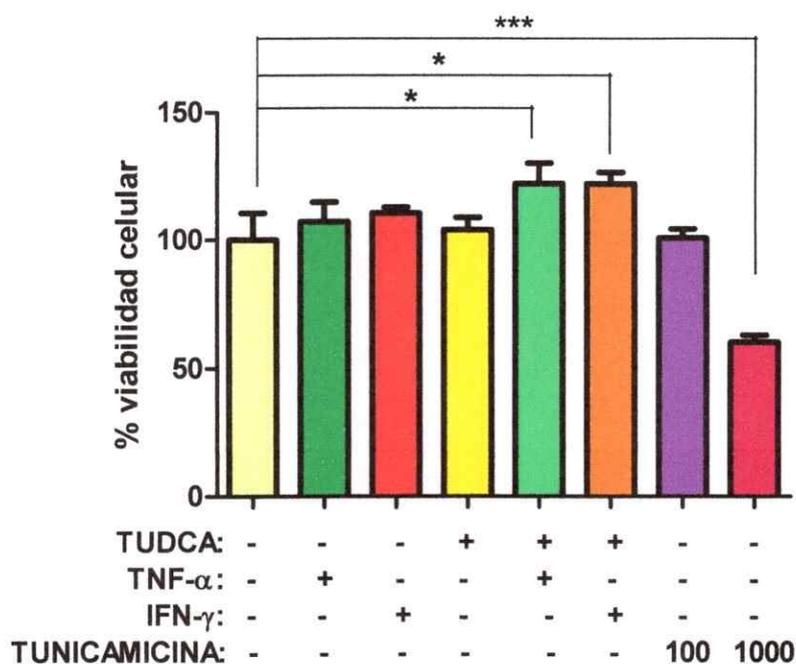


Figura 10. Evaluación de la acción de TUDCA, las citoquinas pro-inflamatorias o tunicamicina en la viabilidad celular. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTS/PMS en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α o IFN- γ en ausencia o presencia de 250 μ M de TUDCA por 24 h. También se evaluó la viabilidad en células HSG estimuladas con 100 o 1000 ng/mL de tunicamicina por 24 h. Se realizaron tres experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$).

OBJETIVO ESPECIFICO N°2

Determinar los niveles de transcritos y proteína de MUC1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias en presencia o ausencia de TUDCA.

Las mucinas son glicoproteínas de gran peso molecular y de una alta complejidad estructural, capaces de retener agua en la superficie epitelial (Castro et al., 2013). Los pacientes con SS manifiestan una sensación constante de sequedad oral y ocular, como consecuencia de la alteración funcional de sus GS y lagrimales. Se ha visto que no sólo la cantidad, sino que la calidad de las mucinas es un factor importante para la hidratación de la mucosa oral en pacientes con SS (Castro et al., 2013). En GS de pacientes con SS se ha observado un aumento en los niveles proteicos y de transcrito de MUC1, así como una acumulación en el RER (Castro et al., 2013). MUC5 y MUC7 también se han detectado aberrantemente en la matriz extracelular de las GS de pacientes con SS. Además, se ha observado una disminución en la sulfatación de MUC5B (Castro et al., 2012). Las alteraciones relacionadas con la calidad, cantidad y localización de las mucinas dan cuenta de una condición de estrés de RER en GS de pacientes con SS. Es

por ello que se quiso evaluar si TUDCA podría revertir el aumento en los niveles de expresión de MUC1 en células HSG estimuladas con citoquinas, como se ha observado previamente (Sung et al., 2015) .

Se analizaron los niveles de transcrito de MUC1 y MUC1/SEC. Esta última es una isoforma de MUC1 secretada, la cual a su vez se sugiere que es capaz de inducir la sobreexpresión de citoquinas (Sung et al., 2015), de ahí su importancia. En células HSG bajo estimulación con citoquinas pro-inflamatorias se observó un aumento de MUC1 y MUC1/SEC tanto bajo estimulación con IFN- γ (Fig. 11 A-B) como con TNF- α (Fig. 11 C-D). Interesantemente, al tratar con 250 μ M de TUDCA, se observó una disminución significativa del transcrito de MUC1 y MUC1/SEC en células tratadas con IFN- γ (Fig. 11 A-B) y solo de MUC1 en células tratadas con TNF- α . Los niveles de MUC1/SEC en la condición con TNF- α no son restablecidos en presencia de TUDCA (Fig. 11D). Aunque en ambos casos, ésta disminución, no llegó a los niveles basales. Se sabe que el promotor de MUC1 presenta elementos de respuesta para citoquinas, específicamente TNF- α , IFN- γ e IL-6, con lo cual TUDCA podría disminuir los niveles de transcrito de MUC1 al disminuir factores que se activan río abajo de estas citoquinas (Jonckheere, N., & Van Seuning, I, 2010).

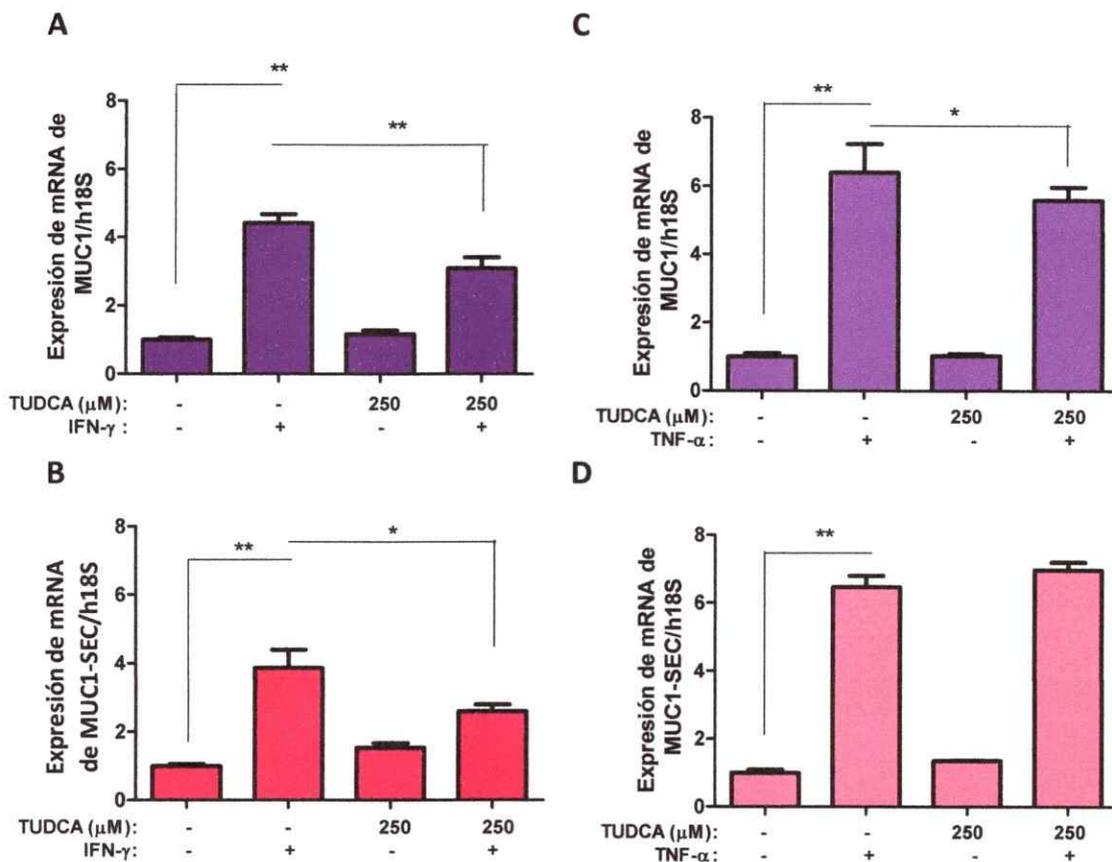


Figura 11. Niveles de transcritos de MUC1 y MUC1/SEC en HSG estimuladas con citoquinas pro inflamatorias y co-incubadas con TUDCA. Los niveles de transcritos de MUC1 (A y C) y MUC1/SEC (B y D) fueron determinados a partir de extractos de mRNA de células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- γ (A y B) o TNF- α (C y D) y co-incubadas con 250 μ M, mediante PCR en tiempo real, normalizando con el gen h18S. Se realizaron tres experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. Se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y *** = $p < 0,0005$)

La calidad de los productos de PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se observó que las reacciones de PCR para MUC1 (Fig. 12, carriles 4, 5 y 6) y MUC1/SEC (Fig. 12, carriles 7, 8 y 9) generaron un solo amplicón que tuvo el tamaño esperado en pb. El amplicón de MUC1/SEC tuvo un tamaño de 219 pb en cambio el de MUC1 tuvo un tamaño de 202 pb. No se observaron diferencias entre el tamaño de MUC1 y MUC1/SEC, ya que la diferencia en pares de base es pequeña, sin embargo son partidores diferentes y dieron un producto único. La migración en la banda del carril 8, puede deberse a algún problema en la gelificación del gel.



Figura 12. Gel representativo de los productos de qPCR de MUC1 y MUC1/SEC. Los carriles 1, 4 y 7 corresponden a los productos de qPCR para h18S, MUC1 y MUC1/SEC, respectivamente en células HSG no tratadas. Los carriles 2, 5 y 8 y los carriles 3, 6, 9 corresponden a los productos de qPCR para h18S, MUC1 y MUC1/SEC, respectivamente en células HSG estimuladas con 10 ng/de IFN- γ o TNF- α , respectivamente. Los carriles 10, 11 y 12 son los controles negativos para las reacciones de qPCR para h18S, MUC1 y MUC1/SEC, respectivamente.

Los niveles proteicos de MUC1 también fueron evaluados en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias en presencia y ausencia de TUDCA (Fig. 13). MUC1 contiene un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) de la secuencia aminoacídica GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP. Además, pueden ocurrir *splicing* alternativos generando más de 30 isoformas, de las cuales muchas están relacionadas a diferentes tipos de cáncer. En este caso el anticuerpo utilizado detecta el VNTR de MUC1, lo cual se observa en bandas de distinta migración electroforética. En el western blot, podemos observar bandas por encima de los 250 kDa, las cuales serían mucinas altamente glicosiladas o agregados de mucinas. Podemos observar que estas bandas están mayormente presentes en la condición con citoquinas, mientras que con TUDCA tienden a desaparecer. Las bandas entre 130 y 250 kDa, son las que presentan una mayor intensidad en comparación al resto de las bandas, siendo aún más intensa en la condición con citoquinas y una posterior disminución en presencia de TUDCA. Por otra parte, la banda de 95 kDa tiende a ser más homogénea en su intensidad, no obstante, se puede observar una disminución de esta banda en presencia de TUDCA. En extractos de células HSG bajo estimulación con IFN- γ (Fig. 13A) o TNF- α (Fig. 13B) se observó un aumento en la intensidad de cada una de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-MUC1. El análisis densitométrico fue realizado cuantificando todas las bandas de MUC1, observándose una disminución significativa en los niveles proteicos de MUC1 cuando las células fueron co-incubadas con TUDCA en presencia de IFN- γ (Fig. 13 A y C) o TNF- α (Fig. 13 B y D).

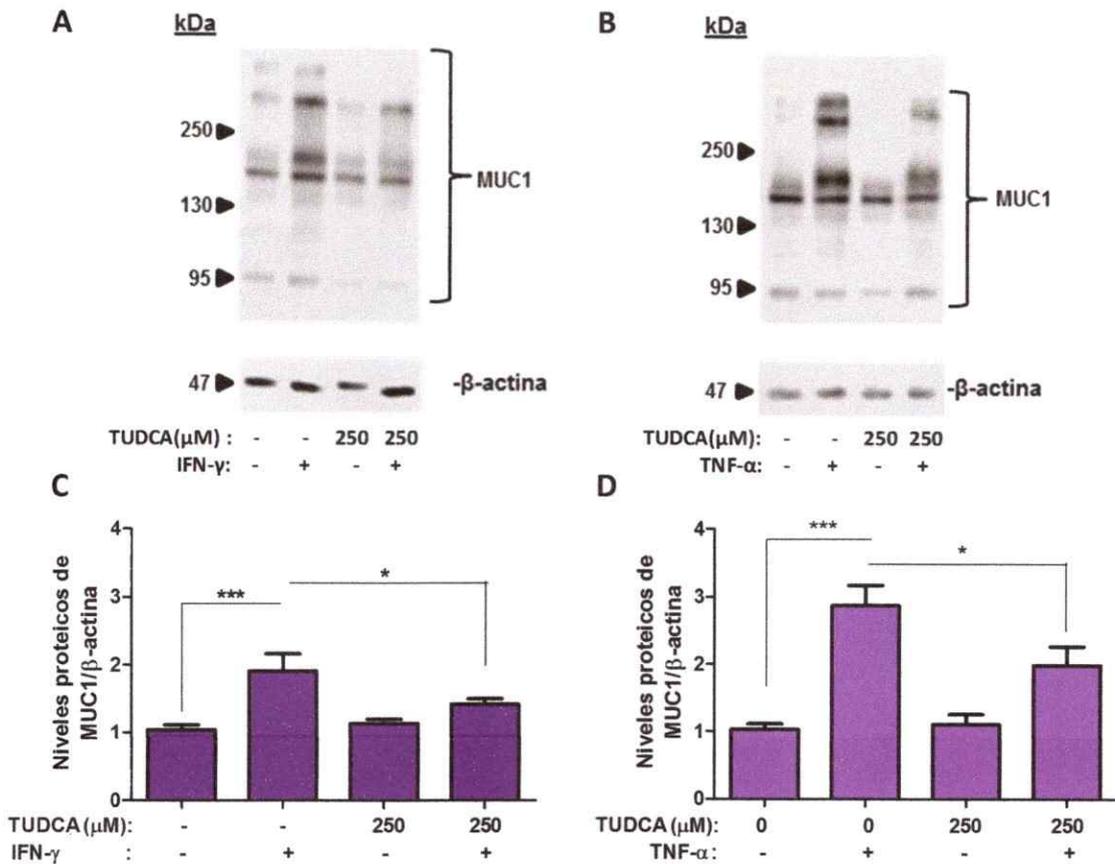


Figura 13. Niveles proteicos de MUC1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro inflamatorias y co-incubadas con TUDCA. Imágenes representativas de la detección de MUC1 en extractos proteicos de células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- γ (A) o TNF- α (B) en presencia o ausencia de 250 μ M de TUDCA, mediante Western blot. El análisis densitométrico de las moléculas evaluadas en A (C) o evaluadas en B (D) muestra un aumento significativo de los niveles proteicos de MUC1 bajo estimulación con IFN- γ o TNF- α , respectivamente, normalizando con respecto a β -actina. Se realizaron tres experimentos independientes y los ensayos se realizaron en cuadruplicado para cada experimento. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo al utilizar el test estadístico Mann-Whitney (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$ y ***= $p < 0,0005$).

OBJETIVO ESPECIFICO N°3

Determinar la localización subcelular de las proteínas SEL1L y EDEM1 en células HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias en presencia o ausencia de TUDCA

Si bien este objetivo no estaba considerado para la validación de la hipótesis, se consideró de importancia su desarrollo, para consolidar en un contexto celular, los cambios observados en los dos primeros objetivos. Es importante determinar la localización subcelular de una proteína para saber si está cumpliendo su correcta función. Es por ello que se evaluó la localización subcelular de SEL1L y EDEM1 en

células HSG bajo las condiciones experimentales evaluadas anteriormente. Cabe destacar, que anteriormente ya se había caracterizado el patrón subcelular de SEL1L y EDEM1 en condiciones normales o de estrés de RE en células de riñón 293 FT para SEL1L (Cattaneo et al, 2009) o en células de hepatoma HepG2 y HEK 293T para EDEM1 (Marin et al, 2012, Zuber et al, 2007,) Sin embargo, no se había descrito la localización de SEL1L y EDEM1 en presencia de TUDCA o en células HSG que tienden a agruparse formando agregados, pero que también pueden encontrarse aisladas.

EDEM1 mostró diferentes patrones de localización. En una célula no estimulada o tratada con TUDCA, EDEM1 se localizó en la región perinuclear, con un patrón *tipo argolla* alrededor del núcleo, además de localizarse en el citoplasma (Fig. 14A). En células agrupadas, EDEM1 presentó una fuerte tinción inmunofluorescente cercana a la interacción célula-célula y además se observó en el citoplasma (Fig. 14B). En células no tratadas o estimuladas también fue posible ver señal inmunofluorescente débil para EDEM1 en la periferia celular de células libre (Fig. 14C). Por otro lado, en células asociadas estimuladas con TNF- α o IFN- γ se observó un gran aumento en la señal de EDEM1 en todo el citoplasma celular de aspecto reticular (Fig. 14 D).

La localización subcelular de SEL1L y EDEM1 es diferente dependiendo de si las células estaban agrupadas o aisladas o también si estaban bajo condiciones de estimulación. Así, en células agrupadas, EDEM1 y SEL1L presentaron una marca más periférica en las regiones de interacción célula-célula (Fig. 15A). En células aisladas, no tratadas o tratadas con TUDCA, EDEM1 y SEL1L presentaron localización perinuclear, además de citoplasmática (Fig. 15B). En la mayoría de las condiciones analizadas, la marca se localizó en el citoplasma, incluyendo las prolongaciones y en un patrón punteado en el citoplasma cercano al núcleo (Fig. 15C). Se quiso comparar el efecto estresor de RER de las citoquinas TNF- α e IFN- γ con el efecto de un estresor clásico de RER, como es la tunicamicina, determinando la intensidad de fluorescencia de los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1. Tunicamicina, inhibe el primer paso de la N-glicosilación de las proteínas, lo que favorece el mal plegamiento de proteínas y la acumulación de éstas, produciendo estrés de RER. En células tratadas con tunicamicina también fue posible observar una gran intensidad en la señal de SEL1L y EDEM1, la cual llegó a la saturación (Fig 15.D).

SEL1L se localizó en el citoplasma, cercano al núcleo en células HSG no estimuladas, al igual que EDEM1 (Fig. 16A). Ambas marcas colocalizaron, es decir, se encontraron próximas, mostrando un tono amarillo, pero logran diferenciarse dado que su intensidad no es tan alta. Lo mismo se observó en las células tratadas solo con TUDCA (Fig. 16E). Células estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias o con tunicamicina mostraron un aumento en la intensidad de la señal de SEL1L y EDEM1, y una mayor colocalización (Fig. 16 B-D). Cuando se agregó TUDCA 250 μ M, se observó una disminución en la intensidad de la señal correspondiente a SEL1L o EDEM1, observándose una menor colocalización en amarillo (Fig. 16 F-H). En el caso de TUDCA + tunicamicina (Fig. 16H) se observó que hay más colocalización y más intensidad en la señal, esto podría ser explicado porque el estrés provocado por tunicamicina es mayor al provocado solo por TNF- α o IFN- γ . Otro punto importante es que en las células no tratadas (Fig. 16 A) como tratadas con TUDCA (Fig.16 E), se logró apreciar de mejor manera colocalización de ambas señales en un patrón punteado, lo cual podría corresponder a estructuras denominadas EDEMosomas (Noack, J y cols, 2014), que

participan en un proceso conocido como “ERAD tuning”. Este proceso se activa cuando la homeostasis del RER es restablecida y ERAD no está activa y sus componentes pueden ser reciclados.

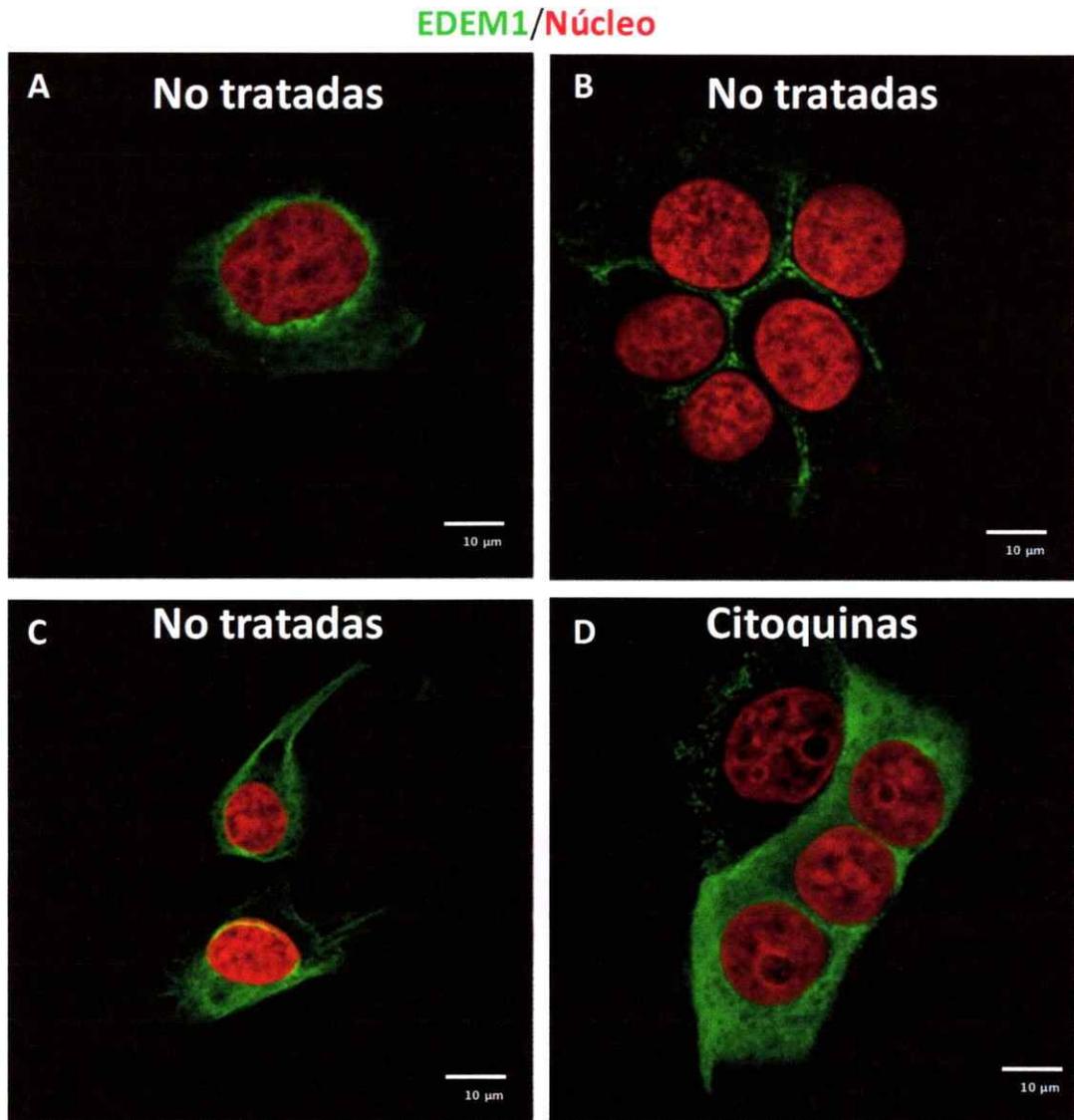


Figura 14. Patrones de localización subcelular de EDEM1. En células HSG no estimuladas o estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias se observaron diferentes patrones de localización de EDEM1 obtenidos por microscopia confocal. A) En células libres no estimuladas, EDEM1 presentó una fuerte tinción inmunofluorescente en la región perinuclear, y una señal inmunofluorescente más débil en el citoplasma. B) En células agrupadas no estimuladas EDEM1 se localizó cercana a las interacciones intracelulares, además de situarse en el citoplasma débilmente. C) En algunas células no estimuladas fue posible detectar a EDEM1 en la superficie celular y en el citoplasma D) En células estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias también fue posible detectar diferentes patrones en células que están en estrecha cercanía, por ejemplo, se pudo detectar células con una intensa señal citoplasmática y otras con un patrón vesicular cercano a la superficie celular.

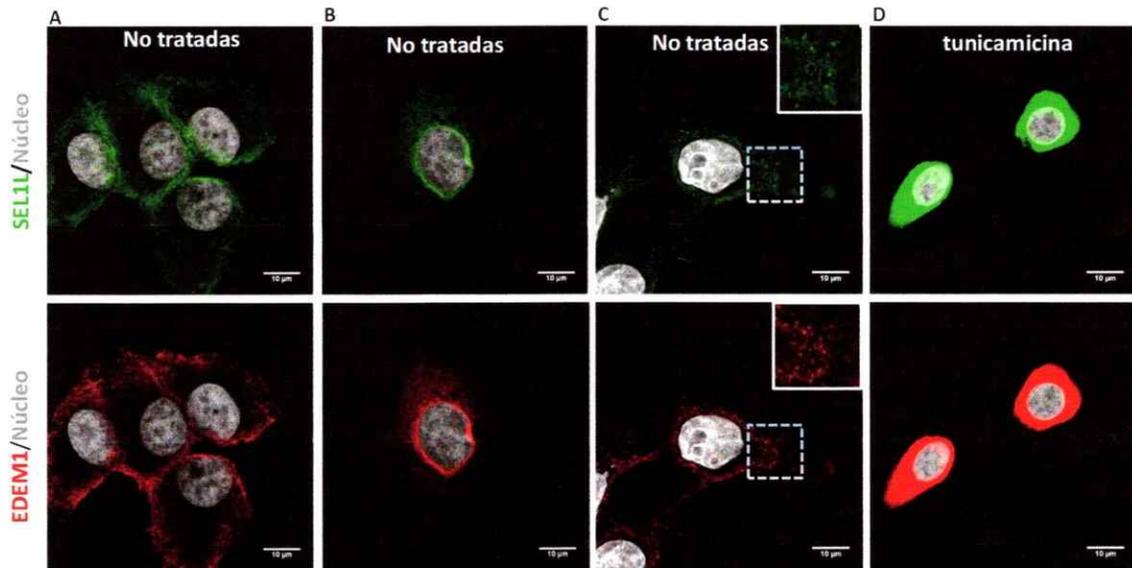


Figura 15: Patrones de localización subcelular de SEL1L y EDEM1. En células HSG no tratadas o tratadas con tunicamicina, se observaron diferentes patrones de localización para SEL1L y EDEM1, obtenidos por microscopía confocal. A) Células agrupadas no estimuladas presentaron una localización de SEL1L cercana a las interacciones intracelulares. EDEM1 presentó un patrón similar, pero también se observó señal en la superficie celular. B) Células aisladas no estimuladas, presentaron localización perinuclear, además de una menor intensidad de tinción en el citoplasma, tanto para SEL1L como EDEM1. C) Células no estimuladas mostraron marca de SEL1L y EDEM1 en el citoplasma, además de un patrón punteado cercano al núcleo. D) Células estimuladas con tunicamicina presentaron en ocasiones un gran aumento en la señal citoplasmática de EDEM1 y SEL1L.

Cuando se realizó inmunofluorescencia para ambas moléculas de ERAD (Fig. 16) también se observó una localización diferente dependiente de si las células están aisladas o agrupadas. En las células aisladas se observó marca citoplasmática para EDEM1 y SEL1L, en cambio en las células agrupadas, aparte de la marca citoplasmática también se observó marca intensa cerca de las interacciones célula-célula. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia, mostró un aumento significativo en la intensidad de señal de SEL1L (Fig. 16 I) y EDEM1 (Fig. 16 J) en células HSG tratadas con citoquinas o con tunicamicina respecto a células no tratadas, mientras que la intensidad de ambas señales disminuyó en presencia de TUDCA a niveles similares a células no estimuladas con citoquinas (Fig. 16 I y J).

Para dilucidar en qué compartimento subcelular se localizó SEL1L y EDEM1, se utilizaron algunos marcadores específicos. Como marcador de RER se utilizó PDI (del inglés *protein disulfide isomerase*), una enzima encargada de formar y romper los puentes disulfuros en las proteínas (Mezghrani et al., 2000). Mediante microscopía confocal, se observó la inmunofluorescencia doble para EDEM1 y PDI, la cual mostró que ambas moléculas tienen una localización subcelular bastante similar, sugiriendo que EDEM1 se localizó en el RER, algo anteriormente descrito. Cabe destacar que PDI también presentó señal en las regiones cercanas a la periferia celular. Aunque la marca de EDEM1 abarcó un poco más el citoplasma. Este patrón de localización subcelular fue

en células HSG no estimuladas, tanto agrupadas como aisladas (Fig. 17 A). Como marcador de membrana plasmática se utilizó la proteína SNARE, syntaxina-4, la cual se ha reportado en la membrana plasmática apical y basolateral de células acinares y participa en la fusión de vesículas o gránulos de secreción con los dominios de la membrana apical y basolateral. Su depleción, resulta en una inhibición en la liberación de proteínas basolaterales y de uniones estrechas (Torres et al., 2011). Mediante microscopía confocal se observó que en células HSG no estimuladas agrupadas, la marca de EDEM1 tiende a acumularse cerca de las interacciones célula-célula al igual que syntaxina-4. Al comparar estas marcas con el contraste de fase, se observó que ambas señales están en los bordes de estas interacciones (Fig. 17 B y C). Previamente se había reportado que EDEM1 podía encontrarse en membrana (Tamura et al, 2011) sin embargo, este patrón no había sido observado antes por inmunofluorescencia.

Se ha reportado que el mecanismo de ERAD tuning es independiente de la autofagia y esto ha sido observado para el marcador LC3-II asociado a membranas, pero no para p62. p62 es un receptor de autofagia, el cual participa en la eliminación, dependiente de autofagia de proteínas blanco diferentes, incluyendo agregados de proteínas ubiquitinados y bacterias (Schiafli et al., 2015). En células HSG no estimuladas y tratadas con cloroquina, droga utilizada para detener el flujo autofágico, se observó una débil presencia de marca positiva para p62 que podría ser indicativa de vesículas autofágicas, la cual no colocalizo con EDEM1, sugiriendo nuevamente que podría ser un mecanismo independiente de autofagia (Fig. 17D).

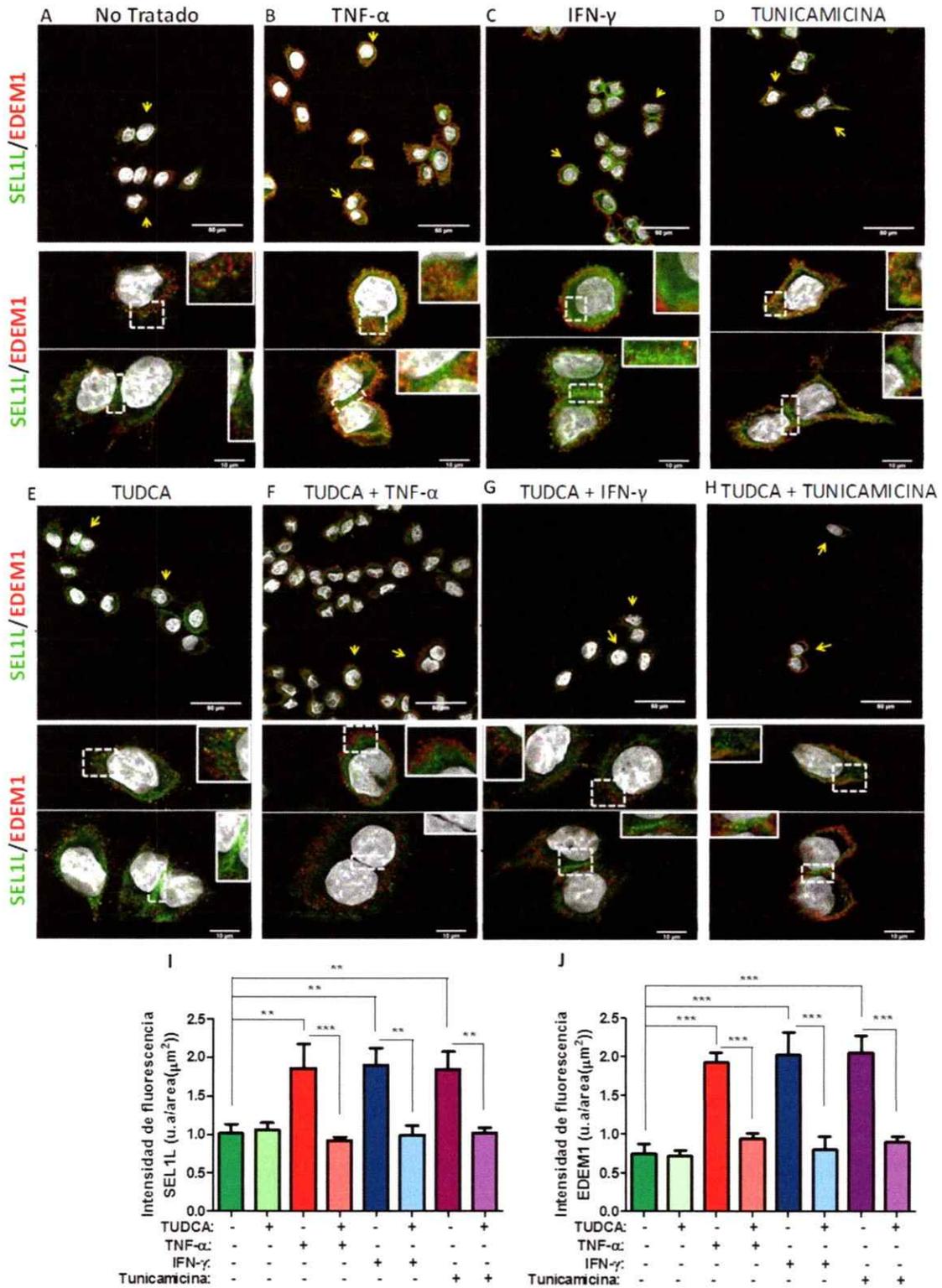


Figura 16: Inmunofluorescencia doble para SEL1L y EDEM1 en células HSG. Imágenes representativas de SEL1L (verde) y EDEM1 (rojo) en células HSG no estimuladas (A) o estimuladas con TNF- α (B), IFN- γ (C) o tunicamicina (D) mediante microscopía confocal. En las

células estimuladas (B-D) la intensidad en la señal de fluorescencia para EDEM1 y SEL1L fue mayor que en las células no tratadas (A) o tratadas con 250 μ M de TUDCA (E). Este incremento fue revertido en presencia de TUDCA (F-H, respectivamente). En B, C y D también se observó un incremento en la colocalización de EDEM1 y SEL1L (amarillo). La intensidad de fluorescencia de SEL1L y EDEM1 en células HSG aumentó significativamente en presencia de TNF- α , IFN- γ o tunicamicina, pero disminuyó en presencia de TUDCA (I y J, respectivamente). Las primeras imágenes fueron tomadas con un objetivo de 60X y las de abajo con un objetivo de 60X más un zoom digital de 3X. Las flechas indican las células que fueron ampliadas en las imágenes de abajo. Las figuras de abajo muestran la ampliación de la zona delimitada con líneas entrecortadas.

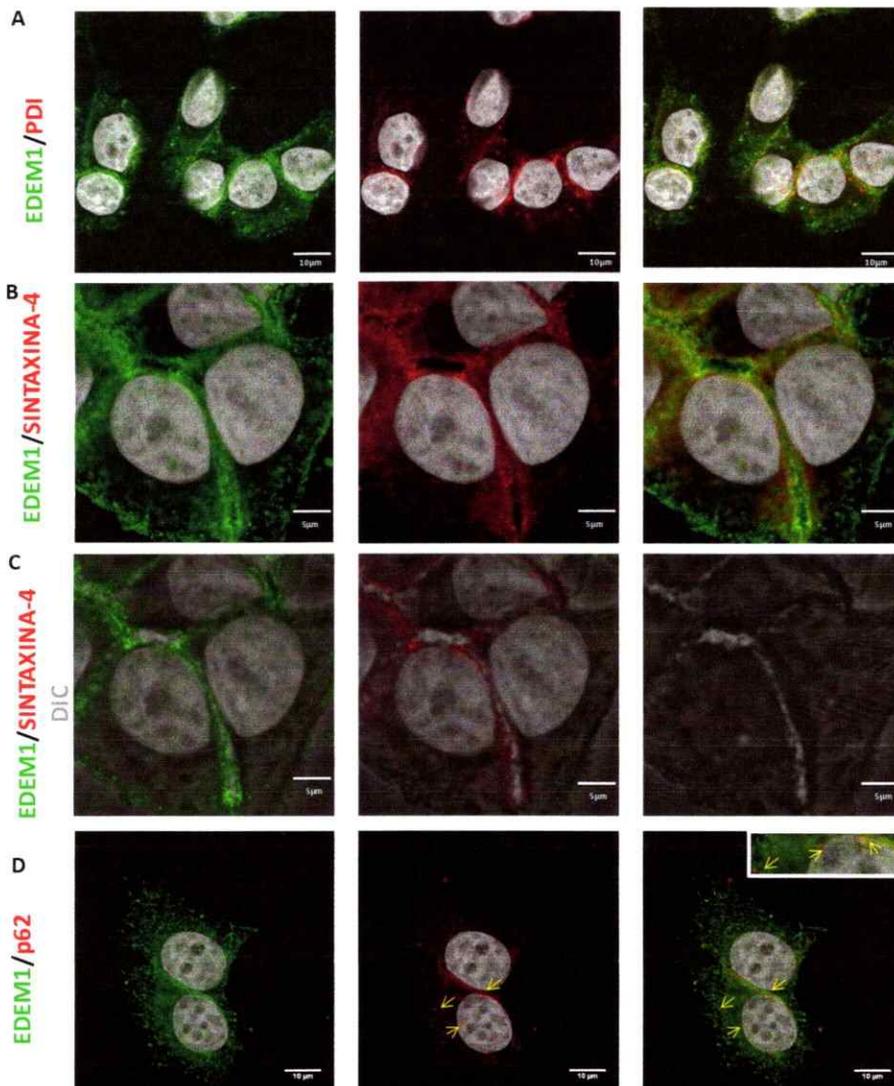


Figura 17: Caracterización de la localización subcelular de EDEM1 con marcadores de compartimentos subcelulares. Microfotografías obtenidas mediante microscopía confocal. A) Inmunofluorescencia doble de EDEM1 (verde) y PDI (rojo), marcador de RE. Se observó ambas señales en el citoplasma. B) Inmunofluorescencia doble de EDEM1 (verde) y syntaxina-4 (rojo), marcador de membrana plasmática. Se observó que la localización en ambos casos es cercana a las uniones intercelulares. C) Se observó lo mismo que en B, pero al compararlo con el contraste de fase. D) Inmunofluorescencia doble de EDEM1 (verde) y p62 (rojo), receptor de

macroautofagia. Se observó localización de EDEM1 por todo el citoplasma y en vesículas, mientras que p62 se observó débilmente en el citoplasma, cercano al núcleo y en vesículas. Las imágenes de EDEM1 con PDI o p62 fueron obtenidas con un objetivo de 60X y 3X de zoom digital, mientras que las de sintaxina-4 con un objetivo de 60X y 6X de zoom digital. Las flechas indican las vesículas en las que se encuentra p62.

DISCUSIÓN

En GS de pacientes con SS se ha reportado activación de la vía PERK, disminución en la activación de la vía IRE1 α y aumento en la señalización de la vía ATF6 α . Este comportamiento de activación de los sensores de UPR es similar a lo encontrado en otras enfermedades en las cuales se tiene una condición crónica de estrés de RER y es dependiente de la duración o tiempo de acción de los factores que la inducen (Lin et al., 2007; Woehlbier and Hetz, 2011).

Una fracción significativa de las proteínas recién sintetizadas termina mal plegadas, pese a la participación de la maquinaria de plegamiento presente en el RER. Es por ello que existe una estricta maquinaria de control de calidad de proteínas que se encarga de promover el correcto plegamiento y sensar las proteínas mal plegadas con el fin de evitar la toxicidad celular, eliminando las especies que están mal plegadas (Lemus and Goder, 2014). Como parte de esta maquinaria de control de calidad se encuentra ERAD que se encarga de remover proteínas mal plegadas desde el RER hacia el citosol, para ser degradadas por el proteosoma 26S (Lemus and Goder, 2014). La expresión de componentes de la vía ERAD puede ser inducida por los factores de transcripción XBP-1s o ATF6f. XBP-1s induce la expresión de HRD1 a través de un elemento de respuesta denominado *UPR element II* al cual se une directamente XBP-1s y no ATF6f. XBP-1s también induce la expresión de EDEM1 (Guiliano et al., 2014). Sin embargo, la expresión de SEL1L es inducida exclusivamente por ATF6f (Kaneko et al., 2007). Estos antecedentes están de acuerdo con los resultados previamente obtenidos en el laboratorio, donde se observan bajos niveles proteicos de XBP-1s, altos niveles proteicos de ATF6f, aumento en los niveles de transcrito de SEL1L, sin diferencia en los niveles de transcrito de EDEM1 y HRD1 (Sepúlveda et al, 2015 en revisión; Barrera et al, 2016).

Como se mencionó, previamente en nuestro laboratorio se determinaron los niveles de transcrito de SEL1L y EDEM1 en GSL, encontrándose sólo un aumento significativo de SEL1L en pacientes con SS. Respecto a los niveles proteicos de ambas moléculas, sólo se habían determinado los niveles de EDEM1, encontrándose un aumento en GS de pacientes con SS. En un modelo de acinos en 3D de células HSG estimulado con TNF- α o IFN- γ , se logró replicar el aumento en la expresión de estos marcadores de ERAD. Sin embargo, en este modelo también se observó un aumento en el transcrito de EDEM1 (Barrera et al., 2016). De igual manera, los resultados obtenidos en el presente estudio en células HSG crecidas en plano, mostraron un aumento en los niveles proteicos y de transcrito de SEL1L y EDEM1. El aumento en los niveles de transcrito de EDEM1, tanto en células HSG crecidas en plano, como en acinos 3D, ambos bajo estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, podría deberse a varios factores, entre ellos el tiempo empleado en los experimentos *in vitro*. El máximo tiempo

de estimulación probado (24 horas) podría inducir una condición de estrés de RER más agudo en comparación al encontrado en las GS de pacientes SS, las que se encontrarían en un estadio crónico de estrés de RER. Además, en este estudio se utilizaron dos citoquinas pro-inflamatorias por separado, mientras que en las GS de los pacientes se expresan un número elevado de citoquinas que coexisten.

SEL1L cumple un rol importante en mamíferos al regular ERAD, la UPR, la traducción de proteínas, la homeostasis del RER y la estabilidad de la E3 ubiquitina ligasa HRD1, (Sun et al., 2014). Su déficit en ratones provoca dilatación y fragmentación del RER, activación de la UPR, disminución en la expresión de HRD1 y promueve la muerte celular en el páncreas (Sun et al., 2014). Por otro lado, EDEM1 es propuesta como una proteína tipo lectina, que media la degradación de glicoproteínas y proteínas no glicosiladas mal plegadas en una manera independiente de N-glicanos (Roth & Zuber, 2016). La sobreexpresión de EDEM1 aumenta la degradación de componentes de ERAD (Zuber et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de SEL1L en una línea de células epiteliales de glándulas submandibular de ratas, induce un aumento en activin A, una proteína que potencia la síntesis y secreción de la hormona estimulante de folículos (FSH, del inglés *Follicle-stimulating hormone*) y de SMAD4, un gen supresor de tumores, en células cancerígenas de páncreas, mostrando así un rol en el crecimiento celular (Cattaneo et al., 2003). Sin embargo, la sobreexpresión de SEL1L resulta también en la estabilización de HRD1, lo que produciría un aumento en los niveles proteicos de HRD1 y también se ha observado que aumenta la cinética de degradación mediada por HRD1 (Omura et al., 2013). Teniendo esto en cuenta, la disminución de los niveles de transcrito y proteicos de SEL1L y de EDEM1 por TUDCA, sugiere que este ácido biliar conjugado restablecería la homeostasis al RER al favorecer el plegamiento correcto de proteínas y la no agregación de éstas. Como consecuencia, se espera que la activación de los sensores de UPR y la expresión de otros componentes de ERAD vuelvan a los niveles basales (Vega et al., 2016). Dado que TNF- α e IFN- γ , indujeron un aumento en los marcadores de ERAD, SEL1L y EDEM1, se infiere que estas citoquinas podrían actuar como estresores locales a nivel del RER, desencadenando la activación de la UPR y la hiperactividad de ERAD, como previamente se ha observado (Barrera et al., 2016).

Se observó una disminución en los niveles proteicos de SEL1L y EDEM1 por debajo de los niveles basales cuando las células fueron tratadas con 500 μ M de TUDCA. En la literatura se ha reportado que la concentración de TUDCA a utilizar depende del tipo celular, ya que a altas concentraciones se ha observado hemólisis o disminución en la viabilidad celular (Carubbi et al., 2002; Gupta et al., 2012). Concentraciones bajas de sales biliares hidrofóbicas o altas concentraciones de sales biliares hidrofílicas con respecto a los niveles fisiológicos, pueden inducir alteraciones en la permeabilidad de membranas de vesículas unilamelares grandes (Carubbi et al., 2002). En humanos no se han observado efectos adversos en personas con trasplante de hígado que reciben 500 mg diarios de TUDCA por 1 año (Angelico et al., 1999). Se ha observado buena tolerancia a la administración de 1.750 mg en personas obesas durante un periodo de 4 meses (Crosignani et al., 1998). En diabetes esta misma cantidad está siendo probada en ensayos clínicos de 12 meses (Goland, ClinicalTrials.gov, 2017). En personas con cirrosis biliar primaria la administración de 750 mg por dos meses no ha mostrado efectos adversos (Invernizzi et al., 1999). En el presente trabajo el tratamiento con concentraciones de 150 y 250 μ M en células HSG indujo una reducción significativa de los niveles proteicos y de transcritos de SEL1L y EDEM1, siendo estos niveles cercanos

al basal. Sin embargo, se escogió finalmente la concentración de 250 μ M para tener un claro efecto sobre la reducción del estrés de RE, ya que esta concentración no mostró reducción en la viabilidad celular.

El ensayo de viabilidad celular mostró que la concentración de 10 ng/mL de TNF- α e IFN- γ no fue tóxico para las células. Es más, se ve una tendencia a aumentar la viabilidad celular. Esta tendencia al aumento se hace significativa cuando TUDCA está presente en el medio junto con las citoquinas pro-inflamatorias. Esto sugiere que TUDCA es capaz de inducir sobrevida, por un mecanismo a la fecha desconocido. Esto está de acuerdo con los efectos anti-apoptóticos descritos para TUDCA (Amaral et al., 2009; Fernandez-Sanchez et al., 2015). Muchos de los mecanismos por los cuales actúa TUDCA aún no han sido dilucidados. Sin embargo, sí se tiene claridad de muchas de sus funciones en las distintas líneas celulares investigadas. TUDCA es capaz de estabilizar proteínas al evitar su agregamiento y potenciar a otras chaperonas para cumplir su función. También tiene un rol anti-apoptótico al coordinar la integridad de la mitocondria y al disminuir la activación de la UPR, ERAD y otros marcadores asociados a estrés de RER. Todo lo anterior, hace que TUDCA sea apodada como chaperona química y un inhibidor del estrés. Sin embargo, quizás una definición más acertada es un regulador de la homeostasis o un inductor de la proteostasis (Vega et al., 2016). Por otro lado, tunicamicina a 100 ng/mL no fue citotóxica para las células. Sin embargo, la concentración de 1000 ng/mL sí fue citotóxica, disminuyendo significativamente más de un 40% la viabilidad celular con respecto al control. Tunicamicina afecta la N-glicosilación, la cual es esencial en células con fenotipo secretor como las células epiteliales salivales, además produce el arresto celular en la fase G1 y esto provoca la acumulación y mal plegamiento de proteínas, haciéndolo un estresor de RER, activando así las vías de UPR y ERAD (Christianson et al., 2011; Osowski and Urano, 2011; Schneider et al., 1978).

MUC1 es una glicoproteína que en condiciones normales provee protección al endotelio, al limitar la accesibilidad y prevenir la colonización por parte de patógenos (Nath and Mukherjee, 2014). En células cancerígenas MUC1 provee mecanismos de sobrevida, al tener un efecto anti-inflamatorio y tener un efecto anti-apoptótico (Nath and Mukherjee, 2014). Cuando se evaluaron los niveles de transcrito y proteína de MUC1 bajo estimulación con citoquinas se encontró un aumento significativo de ésta. En otros trabajos también se ha descrito que citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IFN- γ son capaces de inducir la sobreexpresión de MUC1 (Nath and Mukherjee, 2014). Bajo co-incubación con TUDCA se observó una disminución significativa en el transcrito y en la proteína de MUC1 bajo estimulación con TNF- α o IFN- γ . Sin embargo, esta disminución no alcanzó los niveles encontrados en las células en condiciones basales. En otros trabajos, se ha observado que la sobreexpresión del transgen de MUC3, una mucina intestinal, en células HT29 y Caco-2 disminuye bajo incubación con TUDCA por 24 horas, pero tampoco alcanza los niveles de transcrito encontrados en la condición basal. Es más, se observó que a tiempos cortos de exposición con TUDCA, se induce la secreción de mucinas (Shekels et al., 1996).

Una eventual explicación por la cual la disminución en los niveles de expresión de MUC1 por TUDCA en las HSG estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias no llega

a restablecerse hasta el nivel basal, puede ser el tiempo de incubación con TUDCA. Veinte y cuatro horas puede ser un tiempo insuficiente para lograr disminuir la expresión de MUC1. Además, la proteína de MUC1 tiene una vida media entre 16 y 24 horas en condiciones normales, donde posteriormente es ubiquitinada y degradada en el proteosoma (Bech-Otschir et al., 2009; Linden et al., 2008; Lomako et al., 2010). Es probable, que en condiciones de estrés MUC1 tenga una vida media aún mayor, con lo cual sería esperable que no fuese totalmente degradada dentro de 24 horas. Otra explicación a esta disminución parcial, puede ser que la concentración de TUDCA no es la adecuada para producir la disminución total de esta mucina. Recordemos que la concentración de TUDCA en estas células fue probada desde 50 hasta 500 μM , escogiéndose finalmente la concentración de 250 μM . Es posible que haya una concentración intermedia entre 250 y 500 μM , que sea capaz de disminuir los niveles elevados de MUC1, cerca de los niveles basales y que a la vez no produzca una disminución en los niveles de SEL1L y EDEM1 por debajo de los basales.

Mediante Western blot se observó que MUC1 posee varias isoformas. Las isoformas de MUC1 se generan mediante diferentes eventos de empalme alternativo, incluyendo la selección del sitio de empalme alternativo 5', selección del sitio de empalme alternativo 3', salto del exón simple, doble, triple o incluso cuádruple y retención total o parcial del intrón. Con lo cual, diferentes combinaciones de estos patrones, pueden ser vistas en diferentes isoformas y en diferentes células tumorales (Zhang et al., 2013). MUC1 se puede encontrar en forma soluble y de transmembrana. El proceso de corte y empalme alternativo del mRNA de *MUC1* origina numerosos productos de diferentes tamaños. Las mucinas de transmembrana están compuestas por dos subunidades diferentes, unidas entre sí por un enlace no covalente. La subunidad de mayor tamaño es extracelular y en el caso de MUC1/TM, está casi completamente compuesta por el dominio VNTR (del inglés, *Variable Number of Tandem Repeats*) glicosilado (Zhang et al., 2013). Después de su traducción en el RE, el polipéptido precursor de MUC1/TM es escindido en los dos fragmentos. El fragmento de mayor tamaño contiene el extremo N-terminal y el dominio VNTR que puede tener desde 25 a 125 repeticiones de la secuencia aminoacídica GSTAPPAHGVT SAPDTRPAP, con 5 sitios potenciales de O-glicosilación. El fragmento de menor tamaño de MUC1 contiene 72 aminoácidos del extremo C-terminal, un corto dominio de transmembrana y 58 residuos del dominio extracelular (Hattrup and Gendler, 2008). Estudios en líneas de células cancerígenas, mostraron mediante Western blot, un silenciamiento en las bandas de >250 kDa de MUC1 al utilizar siRNA o shRNA específicos contra MUC1. En cambio, las bandas de 110-160 kDa mostraron una reducción en la intensidad cuando las células fueron tratadas con siRNA, mientras que no hubo cambios en la intensidad de estas bandas al utilizar shRNA, sugiriendo que estas bandas podrían ser no muy específicas para MUC1 (Kumar et al., 2012). MUC1-N, es la subunidad N-terminal de MUC1, que contiene regiones VNTR y es responsable en gran parte de las propiedades anti-adhesivas y lubricantes de MUC1, al ser altamente glicosilada, tendría un peso >250 kDa. Además, puede ser desprendida de la superficie celular, después de un clivaje proteolítico o disociación de la subunidad, encontrándose en la célula en forma de punteos nucleares (agrupaciones de gránulos de intercromatina) y asociado con el espliceosoma (Kumar et al., 2012). Cerca de los 250 kDa, podrían encontrarse MUC1/SEC y MUC1/SEC interactuando con MUC1/Y (MUC1/SEC es requerido para la fosforilación de MUC1/Y). MUC1/Y contribuye a la iniciación y progresión tumoral, además puede actuar de manera similar a los receptores de citoquinas (Apostolopoulos

et al., 2015). Otra isoforma, cercana a los 250 kDa es MUC1/TR, que también está involucrada en la progresión tumoral (Sahraei et al., 2012). Con lo cual, es difícil identificar estas isoformas, sin un anticuerpo específico, sin embargo de alguna manera desconocida, TUDCA tendría un mayor efecto en disminuir los niveles proteicos de estas isoformas glicosiladas, aunque también podrían tratarse de agregados proteicos o glicosilaciones anormales, mientras que en las variantes desde 95 kDa hasta antes de los 250kDa, la disminución sería un poco menor, aún así harían falta nuevos experimentos para poder dilucidar todo esto.

En condiciones de estrés inducido por las citoquinas pro-inflamatorias, se observó una mayor intensidad en las bandas cercanas a 250 kDa. Posiblemente la isoforma de mayor tamaño correspondería a una glicoproteína secretada, que por alteraciones en el control de calidad inducido por estrés de RER podría comenzar a acumularse en el RER. Este fenómeno se revertiría en condiciones no estresadas o bajo tratamiento con TUDCA, donde efectivamente se ve una disminución en los niveles proteicos de estas isoformas de MUC1.

La localización subcelular de EDEM1 ya ha sido caracterizada previamente, encontrándose en RER, membrana plasmática, aparato de Golgi y en vesículas en células de hepatoma HepG2 y en células embrionarias humanas de riñón 293T (Marin et al., 2012; Tamura et al., 2011, Zuber et al., 2007). Para SEL1L se ha reportado previamente localización en RER, aparato de Golgi, vesículas, núcleo y también en membrana plasmática al interactuar con la integrina $\beta 1$ en células de riñón 293 FT y en células de islotes aislados MIN6 (Cattaneo et al., 2014; Diaferia et al., 2013). En el presente trabajo, la detección de la localización subcelular de EDEM1 y SEL1L señala que ambas moléculas se localizaron principalmente en RER, como se observó al colocalizar con PDI. Sin embargo, también parte de la señal inmunofluorescente indicó que estos componentes de ERAD también se localizaron en vesículas y en la superficie celular, especialmente en las interacciones célula-célula. Respecto a este punto, se ha reportado en la literatura, en un modelo de células de islotes de ratas, que SEL1L de membrana participaría en la señalización de la integrina $\beta 1$ y/o en la destinación de esta integrina. SEL1L es capaz de regular la adhesión celular, la proliferación y la secreción de células β de páncreas a través de la integrina $\beta 1$. En ERAD, SEL1L podría cumplir un importante papel en el tráfico y plegamiento de la integrina $\beta 1$ (Diaferia et al., 2013). Aun así, la reducción en la intensidad de SEL1L y EDEM1, es otra manera de demostrar que TUDCA está actuando directa o indirectamente sobre estas moléculas, disminuyendo su expresión. Además, el patrón de localización subcelular para EDEM1 y SEL1L cambia cuando hay estrés en el RER, ya que se observa un patrón tipo reticular alrededor al núcleo y se extiende por todo el citoplasma. En cambio, en células en condiciones basales o tratadas con TUDCA, la marca de EDEM1 y SEL1L tiende a ser punteada, lo que sugiere un reciclaje de los componentes de ERAD en vesículas (ERAD tuning). El ERAD tuning es un mecanismo de reciclaje de SEL1L, EDEM1 y OS-9 en vesículas recubiertas de LC3-I, conocidas como EDEMosomas, en condiciones en las cual no hay un mal plegamiento de proteínas. Cuando hay mal plegamiento de proteínas, OS-9 y EDEM1 son las encargadas de entregar estas proteínas a los sitios de retrotranslocación en la membrana del RER, además de estabilizar a SEL1L en un complejo de dislocación funcional. En estas condiciones, el ERAD tuning no es necesario y se disminuye su actividad, potenciando así la actividad de la maquinaria ERAD (Bernasconi et al., 2012). Esta transición es rápida y reversible, ya que no se necesita de activación de programas

transcripcionales/traduccionales por parte de la UPR (Bernasconi et al., 2012). Esto demostraría que la utilización de TUDCA recupera, de cierta manera, la homeostasis del RER y con ello una mayor actividad del ERAD tuning. La marca de p62, muestra que en condiciones no estimuladas, prácticamente no hay autofagia. Por otro lado, la detección de p62 y EDEM1 indica que EDEM1, no se asocia a estructuras vesiculares positivas para p62, lo que sería esperado en condiciones de ERAD tuning, que es un mecanismo de reciclaje independiente de autofagia (Bernasconi et al., 2012). Sería interesante, en un futuro, ver lo que ocurre con la autofagia en presencia de citoquinas y TUDCA, para dilucidar el papel de ERAD tuning en estas células.

SEL1L-A es una glicoproteína transmembrana, residente en el RER. El corte y empalme alternativo del transcrito primario genera dos isoformas más pequeñas llamadas SEL1L-B y SEL1L-C, las cuales carecen de la región transmembrana C-terminal de SEL1LA. Sin embargo, mantienen algunas repeticiones *Sel-1-like repeats* (SLR) de SEL1L-A, las cuales están involucradas en interacciones multi-proteínas y en transducción de señales. SEL1LB y SEL1LC son glicoproteínas secretadas, altamente estables, que participan aliviando la UPR inducida por estrés mediante la eliminación de proteínas aberrantes a través de vías hidrolíticas/autofágicas/secretoras (Cattaneo et al., 2009). SEL1L-B y SEL1L-C se localizan en compartimientos celulares degradativos y secretorios y en áreas de contacto célula-célula. SEL1L-B se asocia preferentemente con las membranas del RER y en compartimientos endosómicos, esto sería coherente con su participación en complejos de multi-proteínas, las que incluyen proteínas de membrana. SEL1L-C se localiza principalmente en el lumen del RER, en la envoltura nuclear, en peroxisomas y en los espacios intercelulares. En la literatura se ha propuesto la presencia de las dos isoformas en el espacio intercelular, en invaginaciones de la membrana plasmática, en estructuras vesiculares periféricas y en las uniones intercelulares, esto sugeriría una posible participación en los circuitos de liberación/captación autocrino/paracrino. Por otra parte, se postula que la localización de ambas isoformas en compartimientos endosomales tempranos y multivesiculares, podría ser consistente con posibles roles compartidos en *sorting* y/o acompañamiento de moléculas en camino a la degradación o secreción. Mientras que SEL1L-A está principalmente en el RER y es uno de los componentes de ERAD (Cattaneo et al., 2009). Ese es el motivo por el cual inicialmente sólo se determinaron los niveles proteicos de esta isoforma, que es la más conocida, cuyo peso molecular de aprox. 100 kDa, y que se describe en las hojas de información de los anticuerpos anti-SEL1L. Sin embargo, dado que en las inmunofluorescencias se observó además de localización en RER, localización en superficie, es que se buscó en la literatura, encontrándose las otras isoformas. La localización en compartimientos diferentes a RER es coherente con lo que se ha reportado para las otras isoformas solubles asociadas a la membrana plasmática y presentes preferentemente en los contacto célula-célula (Cattaneo et al., 2009).

Po otro lado, EDEM1 tiene dos isoformas, una que está asociada a la membrana como una proteína de membrana tipo II y una segunda que es una proteína soluble, la cual puede estar localizada en el lumen del RER y en vesículas grandes que salen del RER de una manera independiente de COP-II (Tamura et al., 2011). En este trabajo cuando sólo se detectó individualmente la localización de EDEM1 sin colocalizar con SEL1L, se observó de mejor manera todos los patrones anteriormente descritos. Además, se observó localización de EDEM1 cercana a las interacciones célula-célula, mientras que otra fracción se encontró en el RER que en células HSG se distribuye por

todo el citoplasma (Nelson et al., 2013). En la literatura se ha reportado que EDEM1 de membrana, estaría más efectivamente asociado con SEL1L, lo que ayudaría a la degradación de sustratos ERAD asociados en la membrana, mientras que EDEM1 soluble estaría asociado preferentemente con Erdj5, lo que favorecería al recambio de proteínas solubles (Tamura et al., 2011).

Todos estos resultados pueden ser una primera aproximación a una posible aplicación de TUDCA como tratamiento para el SS, ya que en la actualidad no existe un fármaco que alivie los síntomas de la enfermedad. Más bien, distintos fármacos son usados dependiendo de un síntoma en particular. Nuevos fármacos implican a los siguientes blancos: IL-6, CTLA4, CD40, BAFF, entre otros, todos relacionados a disminuir el componente inflamatorio en las GS de los pacientes con SS (Saraux et al., 2016). TUDCA podría tener mejores efectos, al tener un efecto más amplio, en diversas vías de células epiteliales e inflamatorias, tales como lo son la UPR, ERAD, apoptosis y la homeostasis del RER.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN.

TUDCA disminuyó los niveles proteicos y de transcritos de SEL1L y EDEM1, que habían sido aumentados por citoquinas pro-inflamatorias.

TUDCA también disminuyó los niveles de proteínas y transcritos de MUC1 que habían aumentado por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias.

Para validar y encontrar una mejor interpretación de los resultados se evaluó en las células HSG la intensidad de fluorescencia para SEL1L y EDEM1, encontrándose un aumento en el citoplasma de las células tratadas con citoquinas pro-inflamatorias o tunicamicina y una disminución en presencia de TUDCA. Estos resultados corroboran los obtenidos por western blot.

El patrón de localización de SEL1L y EDEM1, cambió en células no estimuladas y estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias o tunicamicina. En células aisladas y no estimuladas se observó una marca perinuclear, además de citoplasmática, mientras que en células estimuladas sólo se observó marca citoplasmática.

El patrón de localización de SEL1L y EDEM1 cambió entre células aisladas y agrupadas. En las primeras, la marca se observó sólo en el citoplasma, mientras que en las segundas se observó una mayor intensidad cerca de las interacciones célula-célula.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, TUDCA disminuiría o restablecería la actividad de ERAD que había sido incrementada en respuesta al estrés que produjo la presencia de citoquinas pro-inflamatorias. Además, TUDCA disminuiría la acumulación de MUC1 en el RER, probablemente al promover el plegamiento y no agregación de proteínas en el RER.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495.
- Adhikari, A., and Chen, Z. J. (2009). Diversity of polyubiquitin chains. *Dev Cell* 16, 485-486.
- Amaral, J. D., Viana, R. J., Ramalho, R. M., Steer, C. J., and Rodrigues, C. M. (2009). Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 50, 1721-1734.
- Angelico, M., Tisone, G., Baiocchi, L., Palmieri, G., Pisani, F., Negrini, S., Anselmo, A., Vennarecci, G., and Casciani, C. U. (1999). One-year pilot study on tauroursodeoxycholic acid as an adjuvant treatment after liver transplantation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31, 462-468.
- Apostolopoulos, V., Stojanovska, L., and Gargosky, S. E. (2015). MUC1 (CD227): a multi-tasked molecule. *Cell Mol Life Sci* 72, 4475-4500.
- Arshad, M., Ye, Z., Gu, X., Wong, C. K., Liu, Y., Li, D., Zhou, L., Zhang, Y., Bay, W. P., Yu, V. C., and Li, P. (2013). RNF13, a RING finger protein, mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through the inositol-requiring enzyme (IRE1alpha)/c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 288, 8726-8736.
- Bahamondes, V., Albornoz, A., Aguilera, S., Alliende, C., Molina, C., Castro, I., Urzua, U., Quest, A. F., Barrera, M. J., Gonzalez, S., *et al.* (2011). Changes in Rab3D expression and distribution in the acini of Sjogren's syndrome patients are associated with loss of cell polarity and secretory dysfunction. *Arthritis Rheum* 63, 3126-3135.
- Barrera, M. J., Aguilera, S., Castro, I., Cortes, J., Bahamondes, V., Quest, A. F., Molina, C., Gonzalez, S., Hermoso, M., Urzua, U., *et al.* (2016). Pro-inflammatory cytokines enhance ERAD and ATF6alpha pathway activity in salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *J Autoimmun* 75, 68-81.
- Barrera, M. J., Aguilera, S., Veerman, E., Quest, A. F., Diaz-Jimenez, D., Urzua, U., Cortes, J., Gonzalez, S., Castro, I., Molina, C., *et al.* (2015). Salivary mucins induce a Toll-like receptor 4-mediated pro-inflammatory response in human submandibular salivary cells: are mucins involved in Sjogren's syndrome? *Rheumatology (Oxford)* 54, 1518-1527.
- Barrera, M. J., Sanchez, M., Aguilera, S., Alliende, C., Bahamondes, V., Molina, C., Quest, A. F., Urzua, U., Castro, I., Gonzalez, S., *et al.* (2012). Aberrant localization of fusion receptors involved in regulated exocytosis in salivary glands of Sjogren's syndrome patients is linked to ectopic mucin secretion. *J Autoimmun* 39, 83-92.
- Bech-Otschir, D., Helfrich, A., Enenkel, C., Consiglieri, G., Seeger, M., Holzthutter, H. G., Dahlmann, B., and Kloetzel, P. M. (2009). Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 16, 219-225.
- Berger, E., and Haller, D. (2011). Structure-function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 610-615.

Bernasconi, R., Galli, C., Noack, J., Bianchi, S., de Haan, C. A., Reggiori, F., and Molinari, M. (2012). Role of the SEL1L:LC3-I complex as an ERAD tuning receptor in the mammalian ER. *Mol Cell* 46, 809-819.

Beuers, U. (2006). Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 318-328.

Bowman, S. J., and Fisher, B. A. (2015). Stratifying primary Sjogren's syndrome: killers in the balance? *Arthritis Res Ther* 17, 351.

Cardozo, A. K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y. M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Van Eylen, F., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A., and Eizirik, D. L. (2005). Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 452-461.

Carubbi, F., Guicciardi, M. E., Concari, M., Loria, P., Bertolotti, M., and Carulli, N. (2002). Comparative cytotoxic and cytoprotective effects of taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in HepG2 cell line. *Biochim Biophys Acta* 1580, 31-39.

Castro, I., Aguilera, S., Brockhausen, I., Alliende, C., Quest, A. F., Molina, C., Urzua, U., Mandel, U., Bahamondes, V., Barrera, M. J., *et al.* (2012). Decreased salivary sulphotransferase activity correlated with inflammation and autoimmunity parameters in Sjogren's syndrome patients. *Rheumatology (Oxford)* 51, 482-490.

Castro, I., Sepulveda, D., Cortes, J., Quest, A. F., Barrera, M. J., Bahamondes, V., Aguilera, S., Urzua, U., Alliende, C., Molina, C., *et al.* (2013). Oral dryness in Sjogren's syndrome patients. Not just a question of water. *Autoimmun Rev* 12, 567-574.

Cattaneo, M., Baronchelli, S., Schiffer, D., Mellai, M., Caldera, V., Saccani, G. J., Dalpra, L., Daga, A., Orlandi, R., DeBlasio, P., and Biunno, I. (2014). Down-modulation of SEL1L, an unfolded protein response and endoplasmic reticulum-associated degradation protein, sensitizes glioma stem cells to the cytotoxic effect of valproic acid. *J Biol Chem* 289, 2826-2838.

Cattaneo, M., Lotti, L. V., Martino, S., Cardano, M., Orlandi, R., Mariani-Costantini, R., and Biunno, I. (2009). Functional characterization of two secreted SEL1L isoforms capable of exporting unassembled substrate. *J Biol Chem* 284, 11405-11415.

Cattaneo, M., Orlandini, S., Beghelli, S., Moore, P. S., Sorio, C., Bonora, A., Bassi, C., Talamini, G., Zamboni, G., Orlandi, R., *et al.* (2003). SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 22, 6359-6368.

Caulfield, V. L., Balmer, C., Dawson, L. J., and Smith, P. M. (2009). A role for nitric oxide-mediated glandular hypofunction in a non-apoptotic model for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 48, 727-733.

Choi, S. K., Lim, M., Byeon, S. H., and Lee, Y. H. (2016). Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves coronary artery function in the spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep* 6, 31925.

Christianson, J. C., Olzmann, J. A., Shaler, T. A., Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Harper, J. W., and Kopito, R. R. (2011). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol* 14, 93-105.

Christianson, J. C., and Ye, Y. (2014). Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nat Struct Mol Biol* 21, 325-335.

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

Croignani, A., Budillon, G., Cimino, L., Del Vecchio Blanco, C., Loguercio, C., Ideo, G., Raimondo, G., Stabilini, R., and Podda, M. (1998). Tauroursodeoxycholic acid for the treatment of HCV-related chronic hepatitis: a multicenter placebo-controlled study. *Hepatogastroenterology* 45, 1624-1629.

Diaferia, G. R., Cirulli, V., and Biunno, I. (2013). SEL1L regulates adhesion, proliferation and secretion of insulin by affecting integrin signaling. *PLoS One* 8, e79458.

Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., Eizirik, D. L., Mathis, D., and Hotamisligil, G. S. (2013). Restoration of the unfolded protein response in pancreatic beta cells protects mice against type 1 diabetes. *Sci Transl Med* 5, 211ra156.

Ewert, P., Aguilera, S., Allende, C., Kwon, Y. J., Albornoz, A., Molina, C., Urzua, U., Quest, A. F., Olea, N., Perez, P., *et al.* (2010). Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjogren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure. *Arthritis Rheum* 62, 1280-1289.

Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Noailles, A., Angulo, A., Maneu, V., and Cuenca, N. (2015). Natural Compounds from Saffron and Bear Bile Prevent Vision Loss and Retinal Degeneration. *Molecules* 20, 13875-13893.

Fernandez Castro, M., Andreu, J. L., Sanchez-Piedra, C., Martinez Taboada, V., Olive, A., Rosas, J., Sanchez-Alonso, F., and en representacion del Grupo de trabajo en Enfermedades Autoinmunes Sistemicas de la Sociedad Espanola de Reumatologia y de la Unidad de Investigacion de la Sociedad Espanola de, R. (2016). Sjogren SER: National registry of the Spanish Society of Rheumatology of patients with primary Sjogren syndrome: Objectives and methodology. *Reumatol Clin* 12, 184-189.

Ferro, F., Vagelli, R., Bruni, C., Cafaro, G., Marcucci, E., Bartoloni, E., and Baldini, C. (2016). One year in review 2016: Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 34, 161-171.

Fox, R. I., Kang, H. I., Ando, D., Abrams, J., and Pisa, E. (1994). Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol* 152, 5532-5539.

Frabutt, D. A., and Zheng, Y. H. (2016). Arms Race between Enveloped Viruses and the Host ERAD Machinery. *Viruses* 8.

Gade, P., Ramachandran, G., Maachani, U. B., Rizzo, M. A., Okada, T., Prywes, R., Cross, A. S., Mori, K., and Kalvakolanu, D. V. (2012). An IFN-gamma-stimulated ATF6-C/EBP-beta-signaling pathway critical for the expression of Death Associated Protein Kinase 1 and induction of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10316-10321.

Gani, A. R., Uppala, J. K., and Ramaiah, K. V. (2015). Tauroursodeoxycholic acid prevents stress induced aggregation of proteins in vitro and promotes PERK activation in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 568, 8-15.

Gidalevitz, T., Stevens, F., and Argon, Y. (2013). Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2410-2424.

Goicovich, E., Molina, C., Perez, P., Aguilera, S., Fernandez, J., Olea, N., Alliende, C., Leyton, C., Romo, R., Leyton, L., and Gonzalez, M. J. (2003). Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 48, 2573-2584.

Goland, R. (2017). Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) in New-Onset Type 1 Diabetes. 10-01-2017, de ClinicalTrials.gov Sitio web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02218619>.

Guiliano, D. B., Fussell, H., Lenart, I., Tsao, E., Nesbeth, D., Fletcher, A. J., Campbell, E. C., Yousaf, N., Williams, S., Santos, S., *et al.* (2014). Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1 targets misfolded HLA-B27 dimers for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Arthritis Rheumatol* 66, 2976-2988.

Gupta, S., Li, S., Abedin, M. J., Noppakun, K., Wang, L., Kaur, T., Najafian, B., Rodrigues, C. M., and Steer, C. J. (2012). Prevention of acute kidney injury by tauroursodeoxycholic acid in rat and cell culture models. *PLoS One* 7, e48950.

Hattrup, C. L., and Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 70, 431-457.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787-3799.

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

Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L. H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiol Rev* 91, 1219-1243.

Hong, M., et al., Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 2004. 279(12): p. 11354-63

Invernizzi, P., Setchell, K. D., Crosignani, A., Battezzati, P. M., Larghi, A., O'Connell, N. C., and Podda, M. (1999). Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 29, 320-327.

Ishimura, S., Furuhashi, M., Mita, T., Fuseya, T., Watanabe, Y., Hoshina, K., Kokubu, N., Inoue, K., Yoshida, H., and Miura, T. (2014). Reduction of endoplasmic reticulum stress inhibits neointima formation after vascular injury. *Sci Rep* 4, 6943.

Jeong, H., Sim, H. J., Song, E. K., Lee, H., Ha, S. C., Jun, Y., Park, T. J., and Lee, C. (2016). Crystal structure of SEL1L: Insight into the roles of SLR motifs in ERAD pathway. *Sci Rep* 6, 20261.

Jonckheere, N., & Van Seuning, I. (2010). The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*, 92(1), 1-11.

Kaneko, M., Yasui, S., Niinuma, Y., Arai, K., Omura, T., Okuma, Y., and Nomura, Y. (2007). A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett* 581, 5355-5360.

Kolb, P. S., Ayaub, E. A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J. G., and Ask, K. (2015). The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 61, 45-52.

Konttinen, Y. T., Platts, L. A., Tuominen, S., Eklund, K. K., Santavirta, N., Tornwall, J., Sorsa, T., Hukkanen, M., and Polak, J. M. (1997). Role of nitric oxide in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40, 875-883.

Kumar, P., Lindberg, L., Thirkill, T. L., Ji, J. W., Martsching, L., and Douglas, G. C. (2012). The MUC1 extracellular domain subunit is found in nuclear speckles and associates with spliceosomes. *PLoS One* 7, e42712.

Lemus, L., and Goder, V. (2014). Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells* 3, 824-847.

Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., and Lee, A. S. (2000). ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20, 5096-5106.

Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., Lavail, M. M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944-949.

Linden, S. K., Florin, T. H., and McGuckin, M. A. (2008). Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One* 3, e3952.

Lomako, J., Lomako, W. M., Carothers Carraway, C. A., and Carraway, K. L. (2010). Regulation of the membrane mucin Muc4 in corneal epithelial cells by proteosomal degradation and TGF-beta. *J Cell Physiol* 223, 209-214.

Marin, M. B., Ghenea, S., Spiridon, L. N., Chiritoiu, G. N., Petrescu, A. J., and Petrescu, S. M. (2012). Tyrosinase degradation is prevented when EDEM1 lacks the intrinsically disordered region. *PLoS One* 7, e42998.

Martino, M. B., Jones, L., Brighton, B., Ehre, C., Abdulah, L., Davis, C. W., Ron, D., O'Neal, W. K., and Ribeiro, C. M. (2013). The ER stress transducer IRE1beta is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol* 6, 639-654.

Mavragani, C. P., and Moutsopoulos, H. M. (2014). Sjogren syndrome. *CMAJ* 186, E579-586.

Mezghrani, A., Courageot, J., Mani, J. C., Pugniere, M., Bastiani, P., and Miquelis, R. (2000). Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J Biol Chem* 275, 1920-1929.

- Miller, S. D., Greene, C. M., McLean, C., Lawless, M. W., Taggart, C. C., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2007). Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of Bad. *Hepatology* 46, 496-503.
- Morito, D., and Nagata, K. (2015). Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible? *Mol Cell* 59, 335-344.
- Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 20, 332-342.
- Nelson, J., Manzella, K., and Baker, O. J. (2013). Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies. *Oral Dis* 19, 236-244.
- Nezos, A., and Mavragani, C. P. (2015). Contribution of Genetic Factors to Sjogren's Syndrome and Sjogren's Syndrome Related Lymphomagenesis. *J Immunol Res* 2015, 754825.
- Noack, J., Bernasconi, R., and Molinari, M. (2014). How viruses hijack the ERAD tuning machinery. *J Virol* 88, 10272-10275.
- Olivari, S., and Molinari, M. (2007). Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett* 581, 3658-3664.
- Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Matsubara, K., and Nomura, Y. (2013). Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 239854.
- Osowski, C. M., and Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 490, 71-92.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Popovic, D., Vucic, D., and Dikic, I. (2014). Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* 20, 1242-1253.
- Robinson, C. P., Yamachika, S., Bounous, D. I., Brayer, J., Jonsson, R., Holmdahl, R., Peck, A. B., and Humphreys-Beher, M. G. (1998). A novel NOD-derived murine model of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 41, 150-156.
- Roma, M. G., Toledo, F. D., Boaglio, A. C., Basiglio, C. L., Crocenzi, F. A., and Sanchez Pozzi, E. J. (2011). Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)* 121, 523-544.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 204, 869-879.
- Sahraei, M., Roy, L. D., Curry, J. M., Teresa, T. L., Nath, S., Besmer, D., Kidiyoor, A., Dalia, R., Gendler, S. J., and Mukherjee, P. (2012). MUC1 regulates PDGFA expression during pancreatic cancer progression. *Oncogene* 31, 4935-4945.
- Saroux, A., Pers, J. O., and Devauchelle-Pensec, V. (2016). Treatment of primary Sjogren syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 12, 456-471.

Savic, S., Ouboussad, L., Dickie, L. J., Geiler, J., Wong, C., Doody, G. M., Churchman, S. M., Ponchel, F., Emery, P., Cook, G. P., *et al.* (2014). TLR dependent XBP-1 activation induces an autocrine loop in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Autoimmun* 50, 59-66.

Schlafli, A. M., Berezowska, S., Adams, O., Langer, R., and Tschan, M. P. (2015). Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* 59, 2481.

Schneider, E. G., Nguyen, H. T., and Lennarz, W. J. (1978). The effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on embryonic development in the sea urchin. *J Biol Chem* 253, 2348-2355.

Shekels, L. L., Lyftogt, C. T., and Ho, S. B. (1996). Bile acid-induced alterations of mucin production in differentiated human colon cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 193-201.

Shenkman, M., Groisman, B., Ron, E., Avezov, E., Hendershot, L. M., and Lederkremer, G. Z. (2013). A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins. *J Biol Chem* 288, 2167-2178.

Smith, M. H., Ploegh, H. L., and Weissman, J. S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334, 1086-1090.

Sokolowska, I., Pilka, E. S., Sandvig, K., Wegrzyn, G., and Slominska-Wojewodzka, M. (2015). Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells. *BMC Cell Biol* 16, 1.

Sommerfeld, A., Reinehr, R., and Haussinger, D. (2015). Tauroursodeoxycholate Protects Rat Hepatocytes from Bile Acid-Induced Apoptosis via beta1-Integrin- and Protein Kinase A-Dependent Mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 36, 866-883.

Song, S., Liang, J. J., Mulhern, M. L., Madson, C. J., and Shinohara, T. (2011). Cholesterol-derived bile acids enhance the chaperone activity of alpha-crystallins. *Cell Stress Chaperones* 16, 475-480.

Stevenson, J., Huang, E. Y., and Olzmann, J. A. (2016). Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 36, 511-542.

Sun, D., Emmert-Buck, M. R., and Fox, P. C. (1998). Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity* 28, 125-137.

Sun, S., Shi, G., Han, X., Francisco, A. B., Ji, Y., Mendonca, N., Liu, X., Locasale, J. W., Simpson, K. W., Duhamel, G. E., *et al.* (2014). Sel1L is indispensable for mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation, endoplasmic reticulum homeostasis, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E582-591.

Sung, H. H., Castro, I., Gonzalez, S., Aguilera, S., Smorodinsky, N. I., Quest, A., Bahamondes, V., Alliende, C., Cortes, J., Molina, C., *et al.* (2015). MUC1/SEC and MUC1/Y overexpression is associated with inflammation in Sjogren's syndrome. *Oral Dis* 21, 730-738.

- Tam, A. B., Mercado, E. L., Hoffmann, A., and Niwa, M. (2012). ER stress activates NF-kappaB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One* 7, e45078.
- Tamura, T., Cormier, J. H., and Hebert, D. N. (2011). Characterization of early EDEM1 protein maturation events and their functional implications. *J Biol Chem* 286, 24906-24915.
- Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., Anthony, T. G., and Wek, R. C. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 22, 4390-4405.
- Torres, J., Funk, H. M., Zegers, M. M., and ter Beest, M. B. (2011). The syntaxin 4 N terminus regulates its basolateral targeting by munc18c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 286, 10834-10846.
- Vang, S., Longley, K., Steer, C. J., and Low, W. C. (2014). The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob Adv Health Med* 3, 58-69.
- Vega, H., Agellon, L. B., and Michalak, M. (2016). The rise of proteostasis promoters. *IUBMB Life* 68, 943-954.
- Vembar, S. S., and Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944-957.
- Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H. M., Alexander, E. L., Carsons, S. E., Daniels, T. E., Fox, P. C., Fox, R. I., Kassarjian, S. S., *et al.* (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61, 554-558.
- Wang, C. F., Yuan, J. R., Qin, D., Gu, J. F., Zhao, B. J., Zhang, L., Zhao, D., Chen, J., Hou, X. F., Yang, N., *et al.* (2016). Protection of tauroursodeoxycholic acid on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells dysfunction and streptozotocin-induced diabetic retinopathy rats. *J Ethnopharmacol* 185, 162-170.
- Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci* 36, 329-337.
- Wu, Y., Termine, D. J., Swulius, M. T., Moremen, K. W., and Sifers, R. N. (2007). Human endoplasmic reticulum mannosidase I is subject to regulated proteolysis. *J Biol Chem* 282, 4841-4849.
- Xu, C., and Ng, D. T. (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 742-752.
- Yoshizaki, T., Kusunoki, C., Kondo, M., Yasuda, M., Kume, S., Morino, K., Sekine, O., Ugi, S., Uzu, T., Nishio, Y., *et al.* (2012). Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 352-357.
- Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.
- Zhang, L., Vlad, A., Milcarek, C., and Finn, O. J. (2013). Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms. *Cancer Immunol Immunother* 62, 423-435.

Zuber, C., Cormier, J. H., Guhl, B., Santimaria, R., Hebert, D. N., and Roth, J. (2007). EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4407-4412.