

**ANDRESSA COOPE DOS SANTOS**

**A EXPRESSÃO DEFICIENTE DAS CHAPERONAS GRP78  
E GRP94 CONECTA A SINALIZAÇÃO DE TLR4 COM O  
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

**CAMPINAS**

**2011**



**UNICAMP**

---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**A EXPRESSÃO DEFICIENTE DAS CHAPERONAS GRP78  
E GRP94 CONECTA A SINALIZAÇÃO DE TLR4 COM O  
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

**ANDRESSA COOPE DOS SANTOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular, e do Desenvolvimento, sob orientação do Prof. Dr. Lício Augusto Velloso.

CAMPINAS, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR**  
**ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**UNICAMP**

Sa59e Santos, Andressa Coope dos, 1982  
A expressão deficiente das chaperonas GRP78 e GRP94 conecta a sinalização de TLR4 com o estresse de retículo endoplasmático. / Andressa Coope dos Santos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Lício Augusto Velloso  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doenças metabólicas. 2. Imunidade inata. 3. Receptor 4 Toll-Like. 4. Retículo endoplasmático. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** *Chaperone insufficiency of GRP78 and GRP94 links TLR4 signaling to endoplasmic reticulum stress*

**Palavra-chave em inglês:**

Metabolic diseases

Immunity, innate

Toll-Like receptor 4

Endoplasmic reticulum

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular, e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Lício Augusto Velloso [Orientador]

Mário José Abdalla Saad

Augusto Ducati Luchessi

Silvana Auxiliadora Bordin Silva

Heraldo Possolo de Souza

**Data da defesa:** 29-04-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

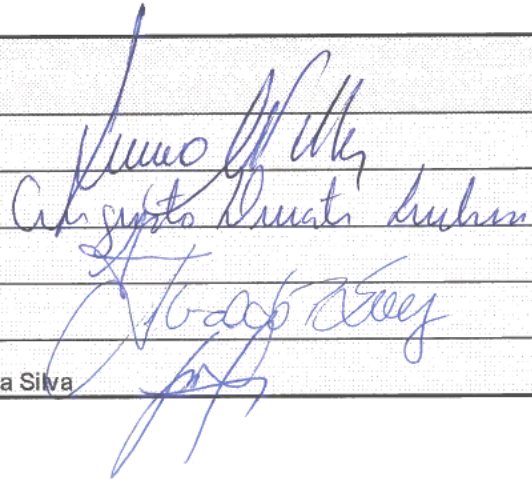
# Banca examinadora da tese de Doutorado

Andressa Coope dos Santos

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso

## Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso
2. Prof(a). Dr(a). Augusto Ducati Luchessi
3. Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad
4. Prof(a). Dr(a). Heraldo Possolo de Souza
5. Prof(a). Dr(a). Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Handwritten signatures in blue ink corresponding to the list members: Licio Augusto Velloso, Augusto Ducati Luchessi, Mário José Abdalla Saad, Heraldo Possolo de Souza, and Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/04/2011



**"O segredo da existência humana não está somente em viver, mas  
também em saber como se vive."**

**(Dostoiévsky)**



**Aos meus pais**

**Ananias e Fátima**

**Aos meus avós**

**Francisco e Terezinha**

**Aos meus irmãos**

**Alexandro e Aislan**

**Com amor e admiração!**





## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o maior responsável por tudo o que sou, principalmente por abrir portas na minha vida antes mesmo que eu pudesse desejá-las. Tu És meu alicerce!

Ao Prof. **Dr. Lício Velloso** pela grande oportunidade que me foi dada e pela orientação segura e competente! Meus sinceros agradecimentos por sua paciência, sabedoria, confiança, pelos valiosos ensinamentos, por participar grandemente da minha formação e principalmente pela amizade!

Aos meus pais e irmãos: **Ananias, Fátima, Alexandro e Aislan** que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida! Obrigada pelo amor incondicional, pela confiança, paciência, incentivo e por sermos uma família tão linda e unida! Amo vocês!

Aos Profs. **Dr. Nilton Brito** e **Dr<sup>a</sup>. Márcia Brito** que no meu primeiro ano de iniciação científica me ensinaram a fazer pesquisa de maneira séria. Muito obrigada pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e por despertar em mim o gosto pela pesquisa!

À **Marciane Milanski, Ana Paula Arruda** e **Letícia Souza** pelas grandiosas discussões, por tornar nossos dias de trabalho mais divertidos, principalmente pelo carinho, pelos ensinamentos de vida e grande amizade cultivada ao longo desses anos! Vocês são as melhores companheiras de trabalho!!!

Aos amigos do laboratório: **Adriana Torsoni, Ana Paula Arruda, Andrezza Kinote, Bruna Bombassaro, Carla Nuñez, Carina Solon, Daniela Bertelli, Daniela Razolli, Eliana Araújo, Érika Anne, Gabriela Albuquerque, Íkaro Bréder, Joseane**

**Morari, Juliana Faria, Juliana Moraes, Livia Bitencourt, Lucas Nascimento, Márcio Torsoni, Talita Romanatto, Raquel Leal, Sylka Geloneze, Simone Lee e Thiago Matos** pelas discussões valiosas e pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Ao professor **Dr. Gabriel Anhô** pelas valiosas discussões, sugestões e amizade.

Aos técnicos: **Érika Anne, Gerson Ferraz e Márcio Cruz**, pelos serviços prestados, por manter nosso laboratório um exemplo de organização e funcionalidade, e principalmente pela boa amizade.

Às minhas grandes amigas: **Emerielle Vanzela, Patrícia Riva e Thaís Lopes**, que se tornaram minha família nesses últimos anos! Obrigada pelo agradável convívio, paciência, carinho, amizade ao longo de todo esse tempo!

Aos meus grandes amigos: **Luis Paulo Manzo, Mariana Marucchi, Gislaine Rodrigues, Débora Ferrarezi, Thaysa Croceta, Priscilla Fadel, Júlia Sevá, Érika Anne Roman, Livia Bitencourt, Carla Nuñez, Marcelo Pereira, Lilia Sakamoto e Tônico** pela amizade verdadeira, pelo convívio agradável e pelo imenso carinho.

Ao **Ricardo (*in memoriam*)**, meu eterno amigo e companheiro de trabalho que foi embora tão jovem, mas iluminou nossas vidas e nos deixou marcas profundas de saudade e alegria!

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho...

**MUITO OBRIGADA!!!!**

# SUMÁRIO

---

	<b>PÁG.</b>
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxv
INTRODUÇÃO.....	29
OBJETIVOS.....	59
CAPÍTULO 1.....	61
<i>Chaperone insufficiency links TLR4 signaling to endoplasmic reticulum stress in human monocytes.</i>	
CONCLUSÃO GERAL.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO I.....	105
<b>Materiais e Métodos</b>	
ANEXO	
II.....	113
<i>Artigo: Atherosclerosis 2010 212: 30-31.</i>	



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AAS	Ácido acetil salicílico
AP-1	<i>Activator protein – 1</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATF3	<i>Activating transcription factor 3</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
Bip	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD-80	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
CD-86	<i>Cluster of Differentiation 86</i>
DAMP	Padrões moleculares associados à dano
DM2	<i>Diabetes mellitus tipo 2</i>
DNACJ3	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
dsRNA	RNA de dupla fita
DTT	Ditiotreitol
E2	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme complex</i>
E3	<i>E3 Ubiquitin ligase</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eIF2 $\alpha$	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha</i>
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation</i>
ERE	Estresse de retículo endoplasmático
ERS	Endoplasmic reticulum stress

FBS	Soro fetal bovino
GPR78	<i>Glucose regulated protein 78</i>
GPR94	<i>Glucose regulated protein 94</i>
HSP	Proteína de choque térmico
HSP70	Proteína de choque térmico 70
IKK	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math> kinase</i>
I $\kappa$ B	Quinase inibidora do fator nuclear KB
IL-1R	Receptores de interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$
INF1	Interferon-1
IR	Receptor de insulina
IRAK1	Quinase 1 associada ao receptor de IL-1
IRAK2	Quinase 2 associada ao receptor de IL-1
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de IL-1
IRE-1	<i>Inositol requirement 1</i>
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
JNK	c-Jun NH2-terminal quinase
KDa	Quilodalton
LPB	Proteína de ligação ao LPS

LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MD-2	<i>Myeloid Differentiation-2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NEMO	<i>NFκB essencial modulator</i>
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killers</i>
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBA	<i>4-phenylbutyric acid</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PERK	<i>Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PKC-θ	Proteína kinase C teta
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
PRAT4A	<i>Protein associated with TLR4</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RE	Retículo endoplasmático
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>



S1P	<i>site-1 protease</i>
S2P	<i>site-2 protease</i>
STC2	<i>Stanniocalcin 2</i>
TAB2	Proteína 2 de ligação à TAK1
TAB3	Proteína 3 de ligação à TAK1
TAK1	<i>Transforming growth factor-activated protein kinase 1</i>
TBK1	Quinase relacionada ao IKK
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TIR	Receptor Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLR1	<i>Toll-like receptor 1</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR5	<i>Toll-like receptor 5</i>
TLR6	<i>Toll-like receptor 6</i>
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	Molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRAF2	<i>TNF-receptor-associated factor 2</i>
TRAF3	<i>TNF-receptor-associated factor 3</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
TRIF	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR que induz

	interferon- $\beta$
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
XBP-1	<i>X-box binding protein</i>



# ***RESUMO***

Andressa Coope dos Santos  
*Resumo*

A ativação da sinalização através do *toll-like receptor-4* (TLR4) e a indução de estresse de retículo endoplasmático (ERE) são importantes mediadores da resistência à insulina na obesidade e em outras situações nas quais há um excesso de ácidos graxos saturados. Em um estudo recente, demonstrou-se que sinalização através de TLR4 pode, *per se*, induzir a ativação de ERE, sugerindo que a ativação do TLR4 é o evento inicial para a indução do estresse celular que contribui para o aumento da expressão de genes de resposta inflamatória. No entanto, os mecanismos que conectam essas duas vias distintas são desconhecidos. As chaperonas GRP78 e GRP94 exercem uma função importante no processamento das moléculas recém-traduzidas do TLR4. Além disso, a chaperona GRP94 é responsável por sua translocação e conteúdo na superfície celular. Durante uma ativação prolongada da via de sinalização do TLR4, a demanda por novas moléculas sintetizadas aumenta, e conseqüentemente, a demanda por novas chaperonas. Por esta razão, nós aventamos a hipótese de que sob uma ativação extrema da via do TLR4, a síntese de proteínas sobrepunaria a expressão de chaperonas, dessa forma induzindo ERE. Para testar essa hipótese, monócitos da linhagem THP-1 foram incubados com LPS e foi avaliada a expressão e ativação de proteínas responsivas ao ERE por real-time PCR, citometria de fluxo, imunoprecipitado e *western blot*. Em alguns experimentos, as células foram privadas de glicose ou tratadas com siRNA para aumentar ou diminuir, respectivamente, a expressão das chaperonas. Experimentos de *time-course* revelaram que o LPS induz um aumento de 2,5

vezes na expressão do TLR4, iniciando após 8 h, com um pico após as 24 h e permanecendo significativamente aumentado após 48 h. A expressão de GRP78 foi aumentada em três vezes com um aumento acentuado após 24 h sem aumento às 8 h, enquanto o GRP94 aumenta apenas 1,5 vezes com um pico após 2 h que retorna aos valores basais após 8 h do estímulo. Não houve aumento da expressão protéica das chaperonas após 48 h. A indução de ERE por LPS foi detectada antes de 4 h do estímulo observado pela avaliação da via da PERK/eIF2 $\alpha$ , IRE1 e ATF6 e se mantém ativado após 48 h. Adicionalmente, a privação de glicose em células THP-1 aumenta a expressão de GRP94 e GRP78 em 2,5 e 11 vezes, respectivamente. Na ausência de glicose, o tratamento com LPS não induz ERE. A inibição da expressão das chaperonas por siRNA anula o efeito da privação de glicose em proteger as células do desenvolvimento de ERE induzido por LPS. Portanto, a hiperexpressão das chaperonas GRP78 e GRP94 protegem as células do ERE induzido por LPS. Assim, defeito na expressão das chaperonas induzido por TLR4 é um mecanismo envolvido na integração da sinalização do TLR4 e ERE.



***ABSTRACT***

Andressa Coope dos Santos  
*Abstract*



TLR4 activation and the induction of endoplasmic reticulum stress (ERS) are two of the most important mechanisms connecting excessive fat with insulin resistance. Recently, it was shown that activation of TLR4 can, *per se*, induce ERS, suggesting that TLR4 is a primary event in the induction of the cellular stress that contributes to increased inflammatory gene expression. However, the mechanisms linking these molecular events are unknown. The chaperones GRP78 and GRP94 play an important role during the assembly of newly translated TLR4 molecules. In addition, the chaperone GRP94 escorts the protein to the cell membrane. Under prolonged activation, the demand for newly synthesized TLR4 molecules increases, and thus, the demand for new chaperones. Therefore, we hypothesized that under increased activation of TLR4, the synthesis of the protein would not be matched by the expression of chaperones, thus, triggering ERS. To test this hypothesis, the monocyte cell line THP-1 was incubated with LPS and the expression/activation of proteins involved in ERS was determined by real-time PCR, flow-cytometry, immunoprecipitation and immunoblot. In some experiments, cells were deprived of glucose or treated with siRNA to increase or decrease, respectively, the expression of the chaperones. Time-course experiments revealed that LPS led to a 2.5-fold increase of TLR4 expression starting as early as 8h, peaking after 24h and remaining significantly increased after 48h. The expression of GRP78 underwent a 3-fold increase with a sharp rise at 24h (no increase at 8h), while GRP94 increased by only 1.5-fold with a peak at 2h and an early return to base-line levels. None of the chaperones were increased after 48h. LPS-induced

ERS was detected as early as 4h after stimulus as detected by the evaluation of PERK/eIF2 $\alpha$ , IRE1 and ATF6 pathways. Strong signals of ERS were still present after 48h. The pre-incubation of THP-1 in glucose-deprived medium produced 2.5 and 11-fold increases of GRP94 and GRP78, respectively. Upon glucose-deprivation, LPS could no longer induce ERS. Inhibition of chaperone expression by siRNA completely abrogated the effect of glucose deprivation to protect cells from LPS-induced ERS. Thus, the hyperexpression of GRP78 and GRP94 protect cells from LPS-induced ERS. Defective TLR4-induced chaperone expression is a mechanism involved in the integration of TLR4 signaling and ERS.



# *INTRODUÇÃO*

Andressa Coope dos Santos  
*Introdução*

## **Uma visão geral da resposta imune inata**

Os organismos multicelulares, ao longo de suas vidas, estão expostos a infecções potencialmente fatais causadas por uma variedade de patógenos microbianos. A sobrevivência do organismo depende da sua habilidade em reconhecer microrganismos infecciosos e induzir uma resposta de defesa adequada. A primeira linha de defesa, conhecida como imunidade inata, é filogeneticamente conservada, e está presente em todos os organismos multicelulares, incluindo plantas e insetos (Ronald & Beutler, 2010; Medzhitov & Janeway, 2000b; Hoffmann et al., 1999). O sistema imune inato é composto por dois mecanismos de defesa contra patógenos: constitutivo e induzível. Dentre os mecanismos constitutivos estão as barreiras físicas, como o epitélio da superfície corporal e mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e reprodutivo, e as barreiras químicas, composta por peptídeos antimicrobianos, tais como as defensinas que são produzidas constitutivamente pelas células da superfície epitelial, e por enzimas antibacterianas como as lisozimas que estão constitutivamente presentes nos fluídos corporais excretados pelo organismo, como, por exemplo, na lágrima e na saliva (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Mogensen, 2009; Medzhitov & Janeway, 2000a).

Os mecanismos de defesa constitutivos estão presentes em locais de interação contínua com microrganismos e sua capacidade destrutiva é direcionada estritamente para agentes invasores. No entanto, os microrganismos infecciosos que são capazes de sobrepujar os mecanismos de defesa constitutivos, rompem

as barreiras epiteliais e entram nos tecidos ou na circulação ativando os mecanismos de defesa induzíveis, iniciando a inflamação que é uma resposta localizada e altamente regulada que o organismo dispõe para localizar, neutralizar e eliminar um agente agressor, assim como reparar os danos causados e promover a cicatrização. Portanto o mecanismo de defesa induzível é uma resposta rápida, não específica do hospedeiro que requer um reconhecimento do microrganismo infeccioso ou antígeno para sua ativação, dando início a uma reação em que células efetoras, representadas principalmente por fagócitos, atacam os microorganismos, liberam citocinas e quimiocinas e recrutam mais leucócitos para o sítio de infecção com a finalidade de eliminá-lo do organismo e reparar o dano tecidual, além de remover células apoptóticas (Kou & Babensee, 2011). A resposta imune inata não é completamente inespecífica como se supunha originalmente. O sistema imune inato reconhece marcadores específicos do próprio hospedeiro, como produtos expressos somente na superfície de células não infectadas do organismo. O reconhecimento desses produtos gênicos pelo sistema imune inato está ligado a sinais inibitórios que previnem a ativação da resposta imune contra o hospedeiro (Mushegian & Medzhitov, 2001; Hoffmann et al., 1999).

O sistema imune inato é composto por células efetoras circulantes como: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, *Natural Killers* (NK), mastócitos e eosinófilos; e por proteínas plasmáticas como o complemento, a proteína C-reativa, a lectina de ligação à manose e os fatores de coagulação, que podem ser

rapidamente ativadas na presença de microorganismos ou de substâncias produzidas na infecção, e desta forma iniciam a resposta imunológica (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Medzhitov & Janeway, 2000a).

A imunidade inata está por trás da maioria das respostas inflamatórias e é acionada em primeira instância por macrófagos, leucócitos polimorfo-nucleares e mastócitos. Essas células se tornam ativadas rapidamente se diferenciando em células efetoras de curta duração cujo papel principal é eliminar a infecção. Em casos em que o sistema imune inato é incapaz de dizimar o agente infeccioso, este pode instruir o sistema imune adaptativo a cerca da natureza do microrganismo patogênico (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Mogensen, 2009; Janeway & Medzhitov, 2002).

Todas as células do sistema imune originam-se a partir de células-tronco auto-renováveis da medula óssea. Estas dão origem às células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que se diferenciam em duas linhagens celulares distintas, sendo elas: a mielóide e a linfóide, que levam ao desenvolvimento da maioria ou de todas as células envolvidas na resposta imune. A linhagem linfóide origina linfócitos, enquanto a linhagem mielóide origina: megacariócitos, eritrócitos, granulócitos e fagócitos mononucleares (Puka et al., 2005).

Os fagócitos mononucleares, divididos em monócitos e macrófagos, constituem o grupo mais importante de células fagocitárias de longa vida, que tem função de neutralização, englobamento e destruição de partículas, incluindo os agentes infecciosos, bem como iniciação e coordenação de outras fases da

resposta imunológica (Puka et al., 2005). Os monócitos se desenvolvem na medula óssea e atingem a maturidade no sangue. Representam de 5 a 10 % dos leucócitos do sangue (Auffray et al., 2009). Possuem núcleos largos e lobulados e citoplasma granuloso. Uma vez no sangue, os monócitos circulam durante vários dias antes de migrarem para os tecidos e se diferenciarem em macrófagos residentes, em resposta ao fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (Kou & Babensee, 2011; Serbina et al., 2008; Gordon & Taylor, 2005). Os monócitos são componentes altamente móveis do sistema imune inato, equipados com receptores para quimiocinas e moléculas de adesão que vão mediar sua migração do sangue para os tecidos por um processo chamado de diapedese durante uma infecção. Essas células respondem à inflamação ao se diferenciarem em células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como: macrófagos e células dendríticas e desta forma produzem citocinas pró-inflamatórias, além de capturar células e moléculas tóxicas. A migração para os tecidos e a diferenciação em células dendríticas e macrófagos é determinado pelo *milieu* inflamatório e pelos receptores de reconhecimento de padrões de patógenos (PRR) (Kou & Babensee, 2011; Serbina et al., 2008; Gordon & Taylor, 2005; Puka et al., 2005).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APCs) que atuam como sentinelas e estão envolvidas com a homeostase do tecido no estado de espera sendo responsáveis pelo *clearance* de células apoptóticas e pela produção de fatores de crescimento, além de induzirem imunidade efetiva ao deparar com uma infecção. Essas células são grandes, apresenta superfície irregular,



pseudópodos desenvolvidos, núcleo oval, citoplasma abundante com aumentada quantidade de complexos de Golgi, lisossomos e retículo endoplasmático rugoso proeminente (Kou & Babensee, 2011; Gordon & Taylor, 2005; Puka et al., 2005; Jacob et al., 2002). Em diferentes tecidos, os macrófagos apresentam uma heterogeneidade no que diz respeito ao fenótipo, *turnover* homeostático e função; dentre alguns exemplos estão as células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares nos pulmões, osteoclastos nos ossos, micróglia no cérebro e as células de Langerhans na pele. Os macrófagos residentes se tornam ativados quando fagocitam um antígeno, sendo esta ativação um componente-chave da resposta imune orientando respostas imunes inatas e adaptativas (Kou & Babensee, 2011; Iwasaki & Medzhitov, 2010; Puka et al., 2005).

O sistema imune inato é geneticamente programado para detectar um número limitado de estruturas conservadas dos patógenos conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), presentes apenas em microrganismos e que são essenciais à sobrevivência do mesmo (Janeway, 1989). Os macrófagos apresentam uma gama de receptores de reconhecimento de PAMPs que os tornam eficientes no processo de reconhecimento de microrganismos, fagocitose e produção de citocinas inflamatórias (Kou & Babensee, 2011; Iwasaki & Medzhitov, 2010; Mogensen, 2009). Adicionalmente, o reconhecimento dos PAMPs induz a expressão de moléculas co-estimulatórias tais como: CD80 e CD86 em APCs. Portanto, a apresentação dos peptídeos do

antígeno pelas APCs realiza a interface da imunidade inata com a ativação da resposta imune adaptativa (Iwasaki & Medzhitov, 2010).

Os receptores de reconhecimento dos PAMPs, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRR), são codificados na linhagem germinativa, e desta forma apresentam um repertório de especificidade limitado, reconhecendo estruturas presentes em determinadas classes de microrganismos, como por exemplo: o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas, RNA de dupla fita (dsRNA) presente em vírus em replicação, ácidos teicóicos presentes em bactérias gram-positivas, os peptídeos N-formylmethionyl presentes em proteínas bacterianas, entre outros (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Mogensen, 2009; Mushegian & Medzhitov, 2001; Janeway, 1989). Os principais receptores dos macrófagos que são capazes de reconhecer os PAMPs são: os *Toll-like receptors* (TLRs), receptores *Scavenger*, de manose, com sete hélices, de complemento e de anticorpo (Fc) (Kou & Babensee, 2011; Iwasaki & Medzhitov, 2010; Mogensen, 2009).

A família TLR é a maior e mais extensamente estudada classe de PRRs. Esses receptores são homólogos à proteína TOLL presente na *Drosophila melanogaster* (Medzhitov et al., 1997). Os TLRs são membros bem conservados de uma superfamília de receptores de interleucina-1 (IL-1R), que respondem a sinais microbianos levando à ativação da resposta imune inata e às respostas específicas aos antígenos na imunidade adaptativa, tanto em doenças infecciosas quanto não infecciosas (Akira, 2003; Akira et al., 2006). Diferentes membros são

conhecidos por detectar e responder a diferentes PAMPs e alguns ligantes endógenos secretados por células durante um estado de estresse ou dano tecidual, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMP) (Zhu J & Mohan, 2010; Mogensen, 2009). Até o momento treze membros da família TLR foram identificados (Shi et al., 2009; Takeda et al., 2003). TLR1/2 reconhece o ácido lipoteicóico presente em bactérias gram-positivas; TLR3 reconhece RNA de dupla fita presente em vírus em replicação; TLR4 reconhece LPS presente em bactérias gram-negativa; TLR5 reconhece a flagelina, proteína do flagelo bacteriano; TLR2/6 reconhece lipoproteínas bacterianas, entre outros (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Saitoh & Miyake, 2009; Takeuchi et al., 2001).

O primeiro membro a ser descrito foi o TLR4 que além de reconhecer o LPS, reconhece uma série de outros ligantes como proteínas do envelope viral (Rassa et al., 2002), e ligantes endógenos como a proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Asea et al., 2002; Vabulas et al., 2002a) e o fibrinogênio (Smiley et al., 2001). Estudos mostraram que ácidos graxos saturados também podem ativar o TLR4 (Lee et al., 2001). Este receptor é expresso em muitos tipos celulares incluindo macrófagos, adipócitos, hepatócitos, células musculares esqueléticas e micróglia. O TLR4 é uma glicoproteína transmembrana do tipo I que é estruturalmente caracterizada por repetições ricas em leucina, flanqueadas por motivos ricos em cisteína em suas regiões extracelulares, e um domínio de homologia ao receptor Toll/IL-1 (TIR) em suas regiões citoplasmáticas, o que é essencial para a sinalização (Zhu J & Mohan, 2010; Mogensen, 2009). Para que

ocorra o reconhecimento dos agonistas do TLR4, como o LPS, este precisa estar associado à glicoproteína MD-2 (*Myeloid Differentiation-2*), uma molécula que se liga ao domínio extracelular do TLR4, formando o complexo TLR4/MD-2, expresso na superfície da membrana celular (Miyake et al., 2000; Akashi et al., 2000). Nagai e colaboradores mostraram que camundongos que não expressam o MD-2 são resistentes ao choque séptico induzido por LPS, porém são suscetíveis à infecção de *Salmonella typhimurium*, demonstrando que o MD-2 é essencial na resposta ao LPS (Nagai et al., 2002). O LPS interage com a proteína de ligação ao LPS (LBP) presente no soro, este complexo se liga ao co-receptor CD14, uma molécula glicofosfatidilinositol que fica ancorada na superfície de macrófagos/monócitos e neutrófilos (Takeda et al., 2003). Uma vez associado ao CD14, o LPS se dissocia do LBP e este complexo, LPS/CD14, se associa ao complexo TLR4/MD-2 ativando a cascata de sinalização do TLR4 (Mogensen, 2009).

O TLR4 ativa duas vias de sinalização distintas, uma dependente de MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) e uma dependente de TRIF (proteína adaptadora que contém o domínio TIR que induz interferon- $\beta$ , também chamada TICAM1). A via dependente de MyD88 é responsável pela ativação imediata do NF $\kappa$ B (Fator de transcrição nuclear kappa B) e da MAPK (proteínas quinase ativada por mitógeno), que por sua vez controlam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Já a via dependente de TRIF ativa o IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), o qual é necessário para a ativação do IFN $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ). Além disso, esta via está envolvida na ativação tardia do NF $\kappa$ B e da MAPK também contribuindo para a

resposta inflamatória (Zhu & Mohan, 2010; Mogensen, 2009; Akira & Takeda, 2004).

Após sua ativação, o TLR4 se dimeriza e sofre mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR. Há quatro moléculas adaptadoras que exercem este papel: o MyD88, TIRAP (proteína adaptadora que contém o domínio TIR), TRIF, e a molécula TRAM (molécula adaptadora relacionada à TRIF) (Seya et al., 2005; Yamamoto et al., 2002; Harari et al., 2006).

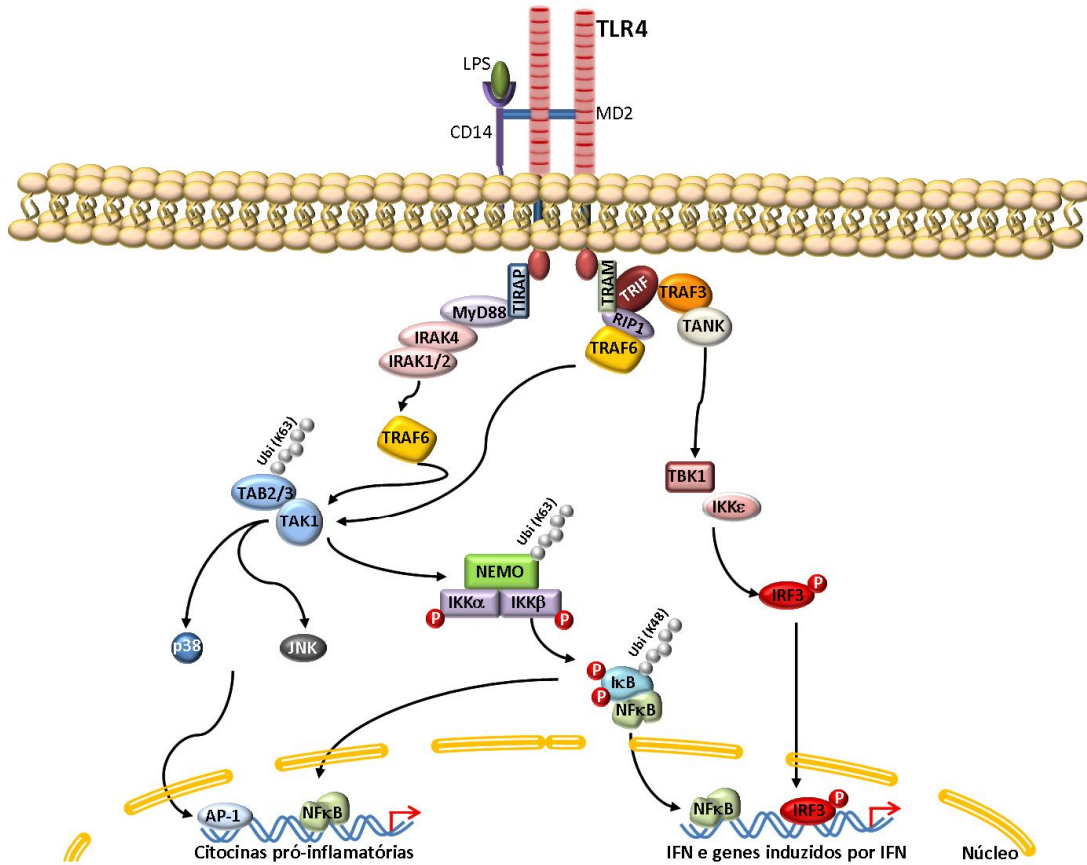
Estudos mostram que o MyD88 é crucial para a sinalização de todos os TLRs, exceto para a sinalização do TLR3 (Akira et al., 2006). Em resposta ao LPS, a porção citoplasmática do TLR4 recruta o TIRAP, o qual serve como um adaptador entre o domínio TIR do TLR e o MyD88. O TLR4 associado ao MyD88 subsequentemente recruta membros da família de quinases IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1). Todos os membros desta família apresentam um domínio de morte amino-terminal e um domínio serina-treonina quinase. Uma vez associado ao TLR4, o MyD88 se associa com a IRAK4 (quinase 4 associada ao receptor de IL-1) facilitando sua associação com o receptor. A IRAK4 é de particular importância, já que estudos mostram que esta proteína é indispensável para a resposta à IL-1 entre outros ligantes do TLR. A ligação do MyD88 com a IRAK4 permite a fosforilação de resíduos da IRAK1/2 (quinase 1 associada ao receptor de IL-1/quinase 2 associada ao receptor de IL-1) induzindo a atividade quinase desta proteína.

Uma vez ativada a IRAK1 ou a IRAK2 autofosforila resíduos na sua região N-terminal e esta fosforilação possibilita a ligação com a proteína TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF). O TRAF6 atua como uma proteína ligase de ubiquitina E3 (*E3 ubiquitin ligase*) que juntamente com o complexo de enzimas de ubiquitinação E2 (*E2/ubiquitin-conjugating enzyme*) cataliza a síntese da cadeia de poliubiquitina K63 no TRAF6. O evento subsequente é o recrutamento e associação da proteína TAB2 (proteína 2 de ligação à TAK1) e da TAB3 (proteína 3 de ligação à TAK1) à TRAF6 ubiquitinado, o que trás a TAK1 (*transforming growth factor-activated protein kinase 1*) próximo ao complexo de sinalização levando à sua ubiquitinação e ativação. Posteriormente, a TAK1 ubiquitinada cataliza a ubiquitinação da subunidade NEMO (*NFκB essencial modulator*) que induz a ativação do NFκB (Akira et al., 2006). A ativação da TAK1 também permite a ativação das MAPKs, incluindo a c-Jun NH2-terminal quinase (JNK), ativando desta forma a expressão de genes ligados à resposta inflamatória (Figura 1) (Saitoh & Miyake, 2009; Akira et al., 2006; Zhu & Mohan, 2010; Mogensen, 2009; Akira & Takeda, 2004).

Por outro lado, a ativação de TLR4, assim como de TLR3 resulta no recrutamento da molécula TRIF através da proteína adaptadora TRAM. O domínio N-terminal do TRIF interage com o TRAF6 enquanto o domínio C-terminal do TRIF interage com a RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*) e ativa a TAK1, ambos ativam o NFκB, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do TLR3 induz a expressão de IFN1 (Interferon-1) via IRF3. O IRF3 é fosforilado e

ativado pela quinase TBK1 (quinase relacionada ao IKK), facilitado pelo recrutamento do TRAF3 (*TNF-receptor-associated factor 3*) (Figura 1) (Zhu & Mohan, 2010).

Nos organismos vivos, a ativação exacerbada dessas vias de sinalização pode levar a uma condição potencialmente letal conhecida como choque séptico, que pode resultar em falência múltipla dos órgãos, e eventualmente, a morte (Waage et al., 1989). Desta forma, a fina regulação dos mecanismos que levam à interrupção da sinalização através de TLR4 é fundamental para a vida. Tais mecanismos dependem da endocitose e degradação lisossomal do receptor (Saitoh, 2009).



**Figura 1: Vias de sinalização do TLR4**  
 (Adaptado de Mogensen T. H. Clinical Microbiology Reviews, 2009)

### A resposta inflamatória e o desenvolvimento de doenças metabólicas

Nas últimas duas décadas, uma série de estudos revelou que a ativação anômala dos macrófagos constitui-se num mecanismo importante que contribui para o desenvolvimento de doenças metabólicas tais como: aterosclerose, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (Gregor & Hotamisligil, 2011; Hotamisligil, 2010a; Hotamisligil, 2010b; Tabas et al., 2010). A aterosclerose é o fator determinante das principais causas de morte entre indivíduos obesos e



diabéticos que apresentam resistência à insulina, que são: acidente vascular cerebral (AVC) e infarto agudo do miocárdio. A formação do centro necrótico na placa de aterosclerose é causada por apoptose dos macrófagos e por defeitos no *clearance* fagocítico dos macrófagos em apoptose (Tabas et al., 2010; Hotamisligil, 2010a). Macrófagos que apresentam resistência à ação da insulina aumentam a formação do centro necrótico e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Liang et al., 2007). Um estudo realizado por Xu e colaboradores mostrou que o TLR4 é expresso em macrófagos presentes em placas ateroscleróticas de humanos e camundongos, sugerindo um importante papel para esta classe de receptores no processo aterosclerótico (Xu et al., 2001). A estimulação por ligantes endógenos e exógenos do TLR2 e do TLR4 está envolvida na indução de inflamação, formação de células esponjosas e diferenciação dos macrófagos. A sinalização por meio dos TLRs leva ao aumento da ativação e consequente translocação do NFκB para o núcleo, induzindo assim a transcrição de genes de resposta inflamatória (Yan & Hansson, 2007).

Em humanos e animais experimentais obesos, ocorre a ativação de um processo inflamatório subclínico, crônico, que cursa com a infiltração de macrófagos e outras células do sistema imune em tecidos metabolicamente importantes, levando à produção anômala de citocinas, e ativação de vias inflamatórias (Wellen & Hotamisligil, 2005; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Os macrófagos que infiltram o tecido adiposo na obesidade produzem citocinas inflamatórias que ativam a sinalização em adipócitos e em células

metabolicamente ativas de outros tecidos, contribuindo para a instalação de um quadro de resistência à insulina (Gregor & Hotamisligil, 2011; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Estudos recentes revelam que a polaridade do macrófago é influenciada por fatores metabólicos, podendo levar ao estado de ativação pró- (ativação M1) ou antiinflamatório (M2) desta célula. No tecido adiposo de animais obesos ocorre um aumento na população de macrófagos pró-inflamatórios M1 (Gregor & Hotamisligil, 2011; Olefsky & Glass, 2010).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de células imunes no tecido adiposo ocorrem de forma gradual. Xu e colaboradores mostraram um aumento na expressão de genes relacionados com macrófagos no tecido adiposo de animais após três semanas em dieta hiperlipídica, com um aumento expressivo com 16 e 26 semanas, o que coincide com o início da resistência à insulina, mostrando que à medida que ocorre hipertrofia dos adipócitos, há aumento da expressão de genes de resposta inflamatória, e o desenvolvimento da resistência à insulina intensifica ainda mais este aumento (Xu et al., 2003). Portanto, uma vez que os macrófagos e outras células do sistema imune estejam presentes e ativos no tecido adiposo de obesos, eles, em conjunto com os adipócitos e outros tipos celulares, perpetuam um ciclo vicioso de recrutamento de macrófagos, produção de citocinas inflamatórias e comprometimento da função dos adipócitos (Gregor & Hotamisligil, 2011).

A primeira evidência da existência de uma conexão entre inflamação e doença metabólica ocorreu em 1993, por Spiegelman e colaboradores; este estudo revelou que a citocina pró-inflamatória  $TNF\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) tinha sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos obesos e que desta forma poderia induzir resistência à insulina. (Hotamisligil et al., 1993). Estudos adicionais mostraram que o  $TNF\alpha$  também se encontra mais expresso no músculo e tecido adiposo de humanos obesos (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995; Saghizadeh et al., 1996; Katsuki et al., 1998). O  $TNF\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que age através de um receptor específico, trimérico, e ativa importantes cascatas de sinalização que levam à ativação da JNK (c-Jun NH2-terminal quinase) e da p38 (MacEwan, 2002). A JNK e a p38 são serina/treonina quinases que pertencem à super família de proteínas MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Estas são componentes importantes na cascata de eventos que controlam a embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular (Wajant et al., 2003).

Durante a instalação e progressão do quadro inflamatório na obesidade, a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como:  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$ , ativam vias de sinalização inflamatórias, tais como as serina/treonina quinases: JNK, IKK e  $PKC-\theta$ , e consequente à fosforilação em serina dos substratos da via da insulina em tecidos metabolicamente ativos como o fígado, o músculo e o tecido adiposo, culminando com a modulação negativa da via de sinalização da

insulina (Gregor & Hotamisligil, 2011; Amaral et al., 2006; Hotamisligil, 2003; Aguirre et al., 2000; Saltiel & Kahn, 2001). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (Dempsey et al., 2003). Entretanto, a atividade serina quinase da JNK pode agir sobre outros substratos, inclusive os substratos tradicionais do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 (Hotamisligil, 2003). Uma vez fosforilados em serina pela JNK a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via (Saltiel & Kahn, 2001).

Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B (Shoelson et al., 2003). Esta via pode ser ativada tanto pelo TNF $\alpha$  quanto pela IL-1 $\beta$  (Shoelson et al., 2003). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata. A inibição da ativação da via IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B com uso do antiinflamatório ácido acetil salicílico (AAS) reverte a resistência à insulina induzida por sinais pró-inflamatórios ou por sepse (Yuan et al., 2001; Shoelson et al., 2003; Barreiro et al., 2004).

As PKCs (proteína serina/treonina quinase C) são quinases responsáveis por transmitir sinais lipídicos, e estão relacionadas ao desenvolvimento de

resistência à insulina integrando a inflamação com o metabolismo (Boden et al., 2005; Kim et al., 2004; Yu et al., 2002). As PKCs se tornam ativadas quando se translocam para a membrana celular onde interagem com receptores e outras proteínas modificando a sinalização celular. Essas serinas/treoninas quinases são responsáveis por mediar doenças metabólicas induzidas pelo aumento do consumo de dietas hiperlipídicas, neste contexto a translocação da PKC- $\theta$  para a membrana celular inibe a sinalização da insulina por aumentar a fosforilação em serina do receptor de insulina e modular sua internalização (Benoit et al., 2009; Kim et al., 2004; Yu et al., 2002; Kellerer et al., 1998). Estudos realizados por Kim e colaboradores mostraram que camundongos com deficiência genética da PKC- $\theta$  são protegidos da resistência à insulina induzida por ácidos graxos livres (Kim et al., 2004).

O consumo de dietas ricas em gorduras saturadas resulta também em resistência à insulina e à leptina no hipotálamo, fenômeno este capaz de promover um distúrbio funcional de neurônios envolvidos com a homeostase energética levando ao desenvolvimento de obesidade e DM2 (De Souza et al., 2005). Em modelos animais, a resistência à insulina e leptina no hipotálamo precede a resistência à insulina em tecidos periféricos o que sugere que a perda funcional do hipotálamo deve se constituir num fenômeno de importância central na associação clínica entre obesidade e DM2 (Prada et al., 2005).

## **A ativação da resposta imune inata em doenças metabólicas**

Estudos recentes demonstraram que a ativação de TLR4 e o fenômeno biológico denominado estresse do retículo endoplasmático (ERE) atuam como fatores determinantes na íntima associação clínica existente entre obesidade e o consumo de dietas ricas em gorduras com resistência à insulina e DM2 (Tsukumo et al., 2007, Shi et al., 2006, Ozcan et al., 2004, Ozcan et al., 2006). Tanto a ativação de TLRs quanto a indução de ERE levam à produção de citocinas pró-inflamatórias. Neste contexto, a resistência à insulina é produzida pela ativação da sinalização inflamatória através da JNK e/ou IKK, e posteriormente aumentada pela indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Shimazu et al., 1999; Akira, 2003; Akira et al., 2006; De Souza et al., 2005).

O TLR4 além de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos, como o LPS, é capaz de reconhecer componentes lipídicos presentes em gorduras saturadas (Lee et al., 2001). Neste contexto, o aumento plasmático de ácidos graxos, encontrados em indivíduos obesos, leva a ativação da sinalização do TLR4 em vários tipos celulares, o que resulta na produção de citocinas e conseqüentemente a ativação de IKK, JNK e PKC, todos potencialmente envolvidos na fosforilação dos substratos do receptor de insulina em resíduos de serina, interferindo na sinalização e ação da insulina. Sabe-se ainda que ácidos graxos saturados de cadeia longa ativam o TLR4 que por sua vez ativa o IKK e estimulam a produção de  $TNF\alpha$  e IL-6 em macrófagos (Shi et al., 2006). Estudos mostraram que células 293T transfectadas com o dominante

negativo de MyD88 ou macrófagos isolados do peritônio de camundongos mutantes para TLR4 perderam a capacidade de indução da produção de citocinas em resposta ao tratamento com ácidos graxos. Adicionalmente, a deficiência de TLR4 também atenua a fosforilação em serina do IRS-1 induzida por lipídios e normaliza a fosforilação em tirosina estimulada pela insulina em adipócitos (Shi et al., 2006). Adicionalmente, animais com uma mutação com perda de função no TLR4, são resistentes à obesidade induzida por dieta, e sua resposta anorexigênica à ação da leptina no hipotálamo é preservada. Sugerindo que o TLR4 seja um importante mediador da disfunção hipotalâmica durante o desenvolvimento da obesidade, pois a presença de uma sinalização funcional do TLR4 é necessária no desenvolvimento desta doença (Milanski et al., 2009).

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela síntese e processamento de proteínas secretoras e de membrana (Xu et al., 2005). Esta organela têm um papel central na biosíntese de lipídeos e de proteínas, servindo também como fonte de armazenamento intracelular de  $Ca^{2+}$ . A membrana do RE é o sítio de produção de todas as proteínas transmembrana e lipídios, para a maioria das demais organelas celulares, incluindo o próprio RE, o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos, as vesículas secretoras e a membrana plasmática. A membrana do RE também produz a maioria dos lipídeos para membranas mitocondriais e peroxissomais. Além disso, quase todas as proteínas que serão secretadas para o exterior celular são destinadas inicialmente ao lúmen do RE. As células de mamíferos começam a importação de proteínas para o RE

antes da síntese completa da cadeia polipeptídica, portanto a importação é um processo co-traducional. No transporte co-traducional, o ribossomo que está sintetizando a proteína está diretamente aderido à membrana do RE, permitindo que uma extremidade da proteína seja translocada para o RE enquanto o restante da cadeia polipeptídica está sendo montada (Alberts et al., 2010). No lúmen do RE, as proteínas são estabilizadas por chaperonas, assumem sua conformação definitiva e se oligomerizam, pontes dissulfeto são formadas e oligossacarídeos N-ligados são adicionados. As proteínas incapazes de adotar o estágio de conformação adequado, por mutação ou glicosilação anômala, são impedidas de sair do RE pelas chaperonas e encaminhadas para a via de degradação (ERAD). Portanto as chaperonas exercem, na célula, um sistema de controle de qualidade, reconhecendo, retendo e encaminhando para degradação as proteínas não estáveis. Além disso, as chaperonas têm papel importante na inativação de proteínas presentes na membrana do RE responsivas ao ERE (Hotamisligil, 2010b; Hotamisligil, 2006).

Diversas condições capazes de causar dano celular induzem alterações funcionais do RE levando a um prejuízo de suas funções fisiológicas (Hotamisligil, 2010b; Xu et al., 2005). Privação ou excesso de glicose ou nutrientes, infecção viral, hipóxia, toxinas, presença de lipídios, aumento na síntese de proteínas secretoras e expressão de proteínas mutantes ou mal formadas são algumas das situações que podem desencadear esse processo (Kim et al., 2007; Kaufman et al., 2002; Ma et al., 2001). Quando a homeostase do RE é quebrada, ocorre o



acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE (Hotamisligil, 2010b; Xu et al., 2005; Schroder & Kaufman, 2005). Nesta condição, as células afetadas ativam um sistema complexo de sinalização conhecido como *unfolded protein response* (UPR), que tem por objetivo preservar a integridade celular enquanto persiste a condição de sofrimento (Hotamisligil, 2010b; Xu et al., 2005; Schroder & Kaufman, 2005). Os eventos subseqüentes à ativação deste complexo mecanismo de sinalização celular denominam-se ERE e tem como objetivo final a preservação da integridade da célula afetada. O ERE é definido como uma ruptura da capacidade do RE em coordenar a síntese, o arranjo estrutural e a secreção de proteínas numa determinada célula ou tecido.

Um dos eventos subseqüentes à ativação da UPR é a diminuição da tradução de uma considerável parcela das proteínas processadas pelo retículo, e também o aumento da expressão de moléculas envolvidas no processamento de proteínas do RE ou de outras funções do mesmo. Tal fenômeno pode ser determinado experimentalmente pela mensuração do conteúdo ou estado funcional de algumas proteínas presentes no RE ou pela ativação de vias de resposta à lesão. As proteínas primárias, inicialmente responsivas ao UPR são: IRE-1 (*inositol-requiring enzyme-1*), PERK (*PKR-like endoplasmic-reticulum kinase*), ATF-6 (*activating transcription factor 6*) e a chaperona GRP78 (proteína regulada por glicose 78). Em condições normais, a chaperona GRP78, também conhecida como Bip (*Binding immunoglobulin protein*), se liga ao domínio amino-terminal da PERK e IRE-1, e ao domínio carboxi-terminal da proteína ATF6,

mantendo-as inativas. O acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE leva ao recrutamento da GRP78 que se desconecta e libera as proteínas transmembranas que são sensores de UPR, e desta forma, tornam-se ativas (Hotamisligil, 2010b).

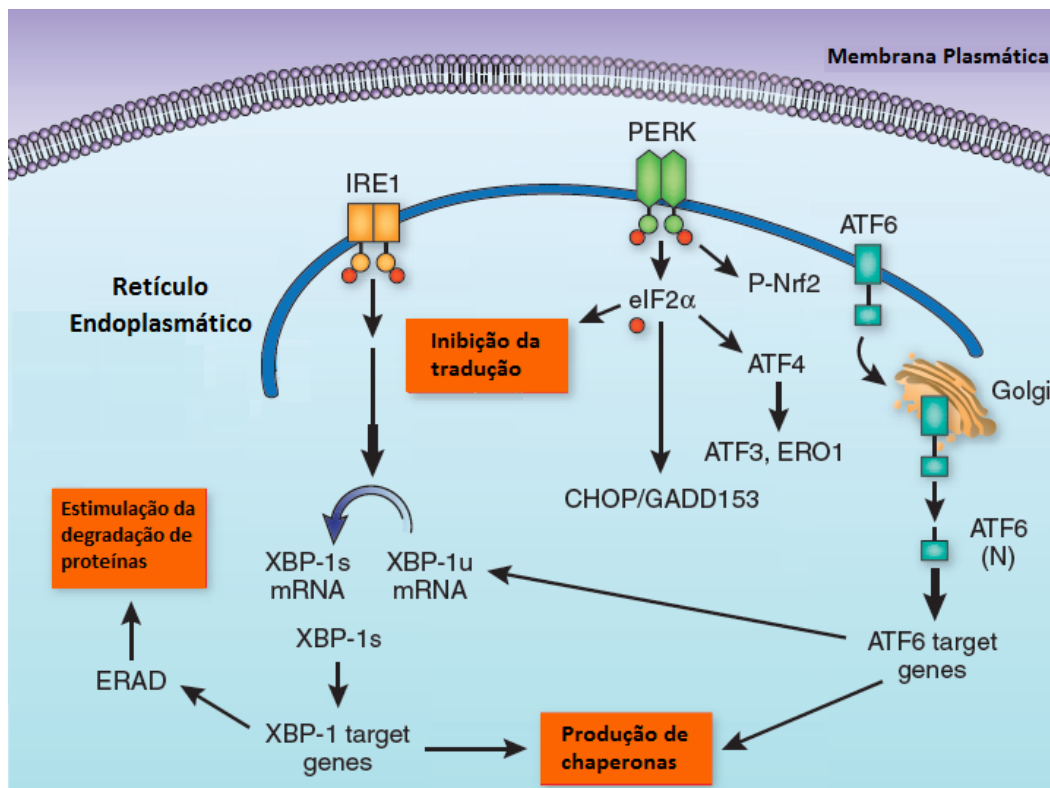
A PERK é uma das principais proteínas presentes na membrana do RE responsiva ao ERE. Em resposta ao estresse, a PERK é ativada através de oligomerização e transfosforilação, uma vez ativa, a PERK fosforila e inativa a subunidade alfa do eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translational initiation factor 2  $\alpha$* ) levando à atenuação da tradução de proteínas (Yoshida, 2007; Hotamisligil, 2010b). A IRE1 possui um domínio no lúmen do RE sensível às proteínas mal formadas e uma porção citoplasmática que possui um domínio quinase e um domínio RNase. Em situações de estresse, a IRE1 é ativada por dimerização e transfosforilação. Uma vez ativa a IRE1 $\alpha$  converte o RNA mensageiro imaturo da proteína XBP-1 (*x-box binding protein*) em RNA mensageiro maduro por um mecanismo não convencional de *splicing*. A proteína traduzida a partir deste RNA maduro ativa a transcrição de genes que compõem o ERAD (*ER-associated protein degradation*), induz a expressão de proteínas envolvidas na síntese de lipídeos, a biogênese do RE e também a produção de chaperonas, tais como a GRP78 (Hotamisligil, 2010b). A ATF6 uma vez ativada é encaminhada para o Golgi onde sofre clivagem por atividade das enzimas: S1P (*site-1 protease*) e S2P (*site-2 protease*), produzindo um fator de transcrição ativo que se transloca para o núcleo e ativa a produção de chaperonas e interage com a via do IRE-1 regulando a expressão do

RNA<sub>m</sub> do XBP-1, além de interagir diretamente com a proteína XBP-1 exercendo o papel de controle de qualidade durante o UPR (Figura 2). O resultado da ativação dessas vias é o término do ERE e o restabelecimento da homeostase do RE, no entanto se o estímulo estressor for crônico, a célula se torna funcionalmente comprometida e pode ser encaminhada para via de morte (Hotamisligil, 2010b).

As duas principais vias inflamatórias que interferem na ação da insulina, JNK e IKK, são ativadas em resposta ao ERE. A ativação de serina quinase JNK pela IRE-1 envolve TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) (Hotamisligil, 2010b; Hotamisligil, 2006; Urano et al., 2000). O IKK/NF $\kappa$ B pode ser ativado tanto por IRE-1, que interage com o IKK através do TRAF2, quanto pela ativação da PERK e ATF6, que leva à degradação do I $\kappa$ B, ativando o fator de transcrição NF $\kappa$ B (Gregor & Hotamisligil, 2011; Hotamisligil, 2010b; Yamazaki et al., 2009; Ozcan et al., 2004; Xu et al., 2005).

A indução de ERE em monócitos/macrófagos é um fenômeno fisiológico para o qual as células estão adaptadas. Nessas células o ERE exerce um efeito importante na mudança fenotípica e na expressão de citocinas que são necessárias para o controle eficaz de microrganismos invasores. A ativação de TLR4 e TLR2 em macrófagos ativa, de maneira específica, a proteína IRE-1 que induz *splicing* citosólico e conseqüente ativação do XBP-1; esta ativação é necessária para manter a produção de mediadores inflamatórios incluindo a IL-6. Estudos mostram ainda que a indução farmacológica de ERE exacerba a resposta

do TLR, mostrando que o ERE atua sinergicamente com o TLR estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, essenciais para a resposta imune (Martinon et al., 2010). Além da ativação clássica através de vírus e bactérias (Watowich et al., 1991; Pahl et al., 1995), o ERE pode ser induzido por fatores nutricionais e metabólicos tais como altos níveis de lipídeos e glicose (Ozcan et al., 2004, Ozawa et al., 2005, Nakatani et al., 2005). Estudos recentes com modelos experimentais indicam que ERE inicia e integra vias inflamatórias e vias de sinalização de insulina com obesidade e desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (Ozcan et al., 2006; Ozcan et al., 2004).



**Figura 2: Vias de sinalização em resposta ao ERE**  
 (Adaptado de Hotamisligil G.S. Nature Medicine, 2010a)

A ativação de TLR4 e/ou a indução de ERE são mecanismos importantes envolvidos na ativação anômala de vias de sinalização no macrófago que pode levar à instalação de resistência à insulina, contribuindo para o desenvolvimento de obesidade, aterosclerose e DM2 (Tabas et al., 2010; Hotamisligil, 2010a; Tsukumo et al., 2007, Shi et al., 2006, Ozcan et al., 2004, Ozcan et al., 2006). Os sinais gerados tanto por ativação do TLR ou por indução de ERE se conectam e desta forma aumentam a resposta inflamatória, levando eventualmente a apoptose de macrófagos, um evento crucial no desenvolvimento da placa necrótica na aterosclerose (Tabas et al., 2010; Woo et al., 2009; Milanski et al., 2009; Seimon

et al., 2006). A inibição genética ou farmacológica do TLR4 e de ERE pode reverter ou prevenir o desenvolvimento de resistência à insulina e/ou obesidade. (Breder et al., 2010; Milanski et al., 2009; Tsukumo et al., 2007; Ozcan et al., 2006). Estudos desenvolvidos por Milanski e colaboradores mostraram que a inibição da via de sinalização do TLR4 em hipotálamos de animais obesos inibe completamente a indução de ERE, revelando que ácidos graxos saturados de cadeia longa atuam predominantemente através do TLR4, ativando a resposta inflamatória e induzindo ERE, que por sua vez também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias levando ao quadro de resistência hipotalâmica aos hormônios insulina e leptina (Milanski et al., 2009). Entretanto, não se conhecem os mecanismos moleculares envolvidos na conexão entre a via de sinalização de TLR4 e a indução de ERE.

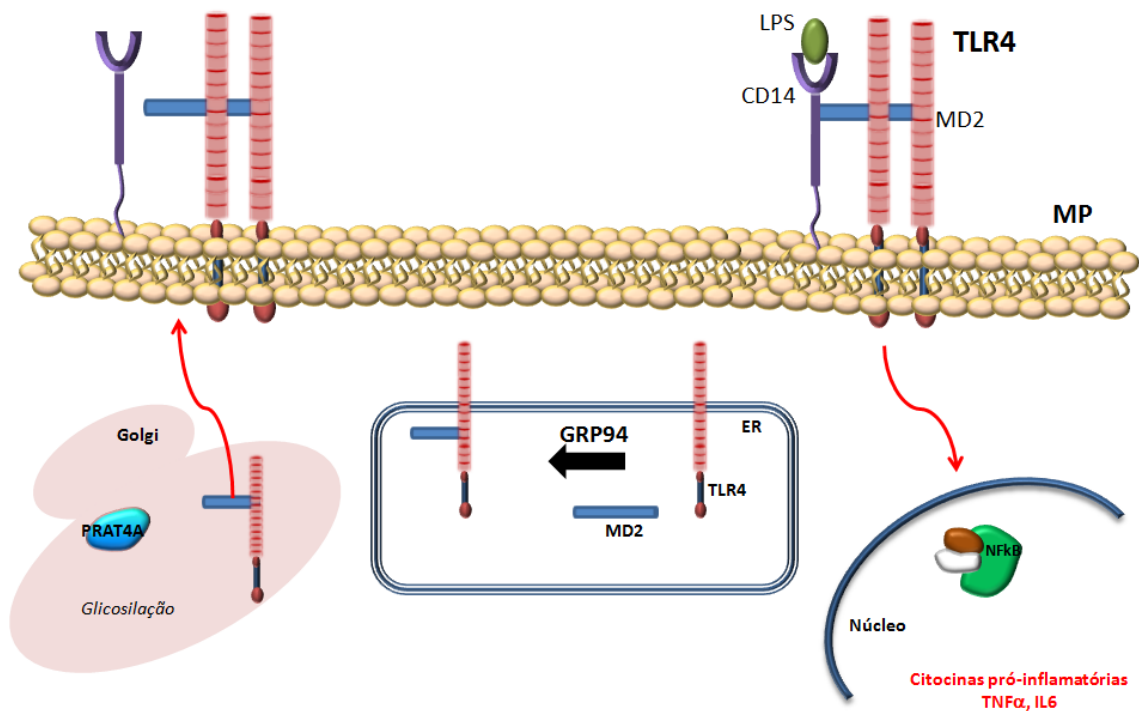
### **Considerações a respeito das conexões entre a sinalização de TLR4 e a ativação de ERE**

Um conceito importante para que se fundamente a aparente conexão entre a sinalização do TLR4 e a ativação de ERE é entender os mecanismos envolvidos na síntese e processamento de moléculas de TLR4. A expressão do TLR4 na superfície celular é crucial para o reconhecimento dos PAMPs e ativação da transdução do sinal (Randow & Seed, 2001). Para que ocorra o reconhecimento dos agonistas do receptor TLR4, como LPS e ácidos graxos, o TLR4 precisa estar

associado à molécula MD-2 que se liga ao domínio extracelular do TLR4 formando o complexo TLR4/MD-2 (Nagai et al., 2002; Miyake et al., 2000; Akashi et al., 2000; Shimazu et al., 1999). A formação, maturação e expressão deste complexo na superfície celular são dependentes de uma chaperona do RE, a proteína regulada por glicose 94 (GRP94 ou gp96) (Harding, 2007; Randow & Seed, 2001; Vabulas et al., 2002b).

A GRP94 é a proteína de choque térmico (HSP) mais abundante do RE, onde sua função como chaperona é crucial para o correto processamento de muitos substratos, entre eles os TLRs, produzindo assim receptores funcionais. Esta proteína é conhecida por regular a expressão sub-celular não somente do TLR4, mas também do TLR1, TLR2 e de algumas integrinas (Randow & Seed, 2001). A chaperona GRP94 altamente glicosilada se associa ao TLR no RE, sendo esta associação bastante estável. Sabe-se que sem a presença da GRP94, o TLR4 não consegue se associar com MD-2 (Randow & Seed, 2001). Estudos recentes mostram que a deficiência da chaperona GRP94 é letal em animais até o quinto dia de vida embrionária (Harding, 2007; Yang & Li, 2005), no entanto, um estudo realizado por Yang e colaboradores mostrou que animais sem GRP94, especificamente em macrófagos, são viáveis e apresentam uma resposta defeituosa à infecção de *L. monocytogenes*, por não apresentarem receptores TLRs na superfície celular e assim não conseguem produzir citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo,  $TNF\alpha$  (Yang et al., 2007), mostrando a importância da GRP94 para o correto funcionamento do TLR4. Em associação à

GRP94, a proteína PRAT4A (*protein associated with TLR4*) participa do processo de maturação, glicosilação e expressão do TLR4 na superfície celular. A PRAT4A se associa ao TLR4 hipoglicosilado no aparelho de Golgi e facilita o tráfego do complexo TLR4/MD-2 para a superfície celular (Figura 3). Defeitos nesta proteína induzem diminuição da resposta ao LPS devido a distúrbios na maturação do TLR4, levando a falta do complexo TLR4/MD-2 maduro na superfície celular. (Randow & Seed, 2001; Wakabayashi et al., 2006).



**Figura 3: Processamento, maturação e expressão do TLR4.**



Quando o sinal do LPS é breve, a maquinaria sintética no RE repõe as proteínas recicladas e a resposta ao LPS é rapidamente normalizada (Saitoh, 2009). No entanto, em caso de exposição prolongada, as células se tornam insensíveis ao LPS, pelo menos em parte, devido à insuficiência da reposição do TLR4 na superfície celular (Nomura et al., 2000; Ziegler-Heitbrock et al., 1992), como mostra o estudo realizado por Nomura e colaboradores, onde se evidenciou que monócitos/macrófagos expostos ao segundo estímulo com LPS apresentam intolerância à este estímulo nas primeiras horas, apresentando diminuição da expressão do TLR4, assim como diminuição da produção de citocinas inflamatórias e este perfil é revertido após 24 horas de exposição ao LPS (Nomura et al., 2000).

Portanto, mediante ao estímulo por LPS, as células sofrem uma rápida redução da expressão do TLR4 na superfície celular que é imediatamente acompanhado por um aumento da expressão do RNAm do TLR (Visintin et al., 2001). Assim, espera-se que durante o aumento na demanda por novas unidades de TLR4 na membrana celular, o aumento da expressão desse receptor no RE seja acompanhado por um aumento similar na quantidade da chaperona GRP94, assim como de MD-2. Sabendo que um dos fenômenos mais importantes para indução de ERE é a redução da quantidade de algumas chaperonas nessa organela, nós aventamos a hipótese de que, durante uma ativação extrema da via TLR4 haveria consumo sem adequada reposição de GRP94 e que tal fenômeno seria o intermediário entre ativação de TLR4 e a indução de ERE.

# ***OBJETIVOS***

Andressa Coope dos Santos  
*Objetivos*

O objetivo do presente trabalho foi:

**Gerais:**

- ✓ Definir os mecanismos moleculares envolvidos na conexão intracelular entre a ativação do TLR4 e a indução de ERE em monócitos humanos da linhagem THP-1.

**Específicos:**

- ✓ Avaliar a expressão de proteínas das vias de sinalização de ERE após ativação prolongada do TLR4 em monócitos humanos submetidos ao tratamento com LPS;
- ✓ Investigar o padrão de associação do TLR4 com as chaperonas GRP78 e GRP94;
- ✓ Avaliar o impacto do bloqueio da sinalização do TLR4 na indução de ERE em monócitos humanos;
- ✓ Investigar o efeito da ativação do TLR4 na expressão de chaperonas;
- ✓ Estudar os marcadores de ERE após o tratamento com uma chaperona química em monócitos incubados com LPS;
- ✓ Avaliar o efeito da produção endógena de chaperonas na indução de ERE mediado por ativação da sinalização do TLR4.

# *CAPÍTULO 1*

Andressa Coope dos Santos  
*Capítulo 1*

Article

Chaperone insufficiency links TLR4 signaling to endoplasmic reticulum stress in human monocytes

Andressa Coope<sup>1</sup>, Marciane Milanski<sup>1</sup>, Ana P. Arruda<sup>1</sup>, Leticia M. Ignacio-Souza<sup>1</sup>, Gabriel F. Anhê<sup>2</sup>, Licio A. Velloso<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Laboratory of Cell Signaling and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, University of Campinas, Brazil*

LAV is the corresponding author: Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, 13084-761, Campinas SP, Brazil. Email: [lavelloso.unicamp@gmail.com](mailto:lavelloso.unicamp@gmail.com)

## **Abstract**

Inflammation plays an important pathogenic role in a number of metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes and atherosclerosis. The activation of inflammatory gene response in these clinical conditions depends, at least in part, on the combined actions of TLR4 signaling and endoplasmic reticulum stress. The integration of both these events at the intracellular environment may serve to boost the inflammatory response, and defining the mechanisms involved in this phenomenon may unveil potential targets for the treatment of metabolic/inflammatory diseases. Here, we used LPS to induce endoplasmic reticulum stress in the human monocyte cell-line, THP-1. The unfolded protein response produced in response to LPS was dependent on CD14 activity and could be inhibited by an exogenous chemical chaperone. The induction of the endoplasmic reticulum resident chaperones GRP94 and GRP78 was of a much lower magnitude than the effect of LPS on TLR4 and MD-2 expression. In face of this apparent insufficiency of chaperone expression, we induced the expression of GRP94 and GRP78 by glucose deprivation. This approach completely reverted endoplasmic reticulum stress. The inhibition of either GRP94 or GRP78 with siRNA was sufficient to rescue the protective effect of glucose deprivation on LPS-induced endoplasmic reticulum stress. Thus, insufficient LPS-induced chaperone expression links TLR4 signaling to endoplasmic reticulum stress.

## Introduction

The anomalous activation of macrophages play an important role in metabolic diseases such as atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes mellitus (1-3). Pattern recognition receptors (PPRs), particularly TLR4 (4), and endoplasmic reticulum stress (ERS) (5) have been, independently, identified as important inducers of dysfunctional macrophage activation in these diseases, and both genetic and pharmacological targeting of the TLRs and ERS can attenuate or revert the metabolic phenotypes (4; 6-8). Recent data have revealed that signals generated by the activation of TLRs or the induction ERS can integrate with each other and thus, boost the pathological inflammatory response, eventually leading to macrophage apoptosis, which, in the case of atherosclerosis is a well-known complicating event (8-10). However, the mechanisms involved in the integration of TLR signaling with ERS are virtually unknown.

The expression of TLR2 and TLR4 in the cell surface is necessary for pattern recognition and activation of signal transduction (11). In order to reach the cell membrane, the nascent TLRs must be correctly folded, which depends on their binding to the ER resident chaperone GRP94 (also known as gp96) (12). Whole body deficiency of GRP94 is lethal at embryonic day 5 (12; 13). However, when only macrophages are depleted of GRP94, rodents are viable presenting a defective response to *L. monocytogenes*, which results from an almost complete absence of cell surface TLRs expression (14).

In macrophages, lipopolysaccharide (LPS) stimulation produces ERS, a phenomenon believed to play an important role in eliciting the cytokine response required for optimal bacterial destruction (15). However, upon LPS stimulation cells undergo a rapid reduction of the surface expression of TLR2 and TLR4 which is promptly accompanied by an increase of the TLRs mRNA expression (16). Since replacement of surface TLR depends on proper chaperoning in the ER, we suspected that, under LPS stimulation, insufficient chaperone expression would mediate TLR4 – induced ERS. Here we show that upon LPS stimulation both GRP94 and GRP78 undergo only a discrete increase in protein expression level. Following glucose deprivation, the substantial increase in the expression of these chaperones completely inhibits LPS – induced ERS, an effect that can be rescued by targeting either GRP94 or GRP78 with interference RNA.

## **Results**

*LPS activates signal transduction through TLR4 and the expression of F4/80 in human monocytes.* A time-course experiment showed that the continuous exposure of THP-1 cells to LPS results in the activation of signal transduction through TLR4/Myd88 as long as the LPS is present, for at least 24h (Fig. 1A). The homogeneity of cell preparation is depicted in Figures 1B-C. A dose response experiment showed that a LPS concentration as low as 0.5  $\mu\text{g/ml}$  is capable of inducing F4/80 expression (Fig. 1D-E). The induction of F4/80 by 0.5  $\mu\text{g/ml}$  LPS



was detectable at 24h but not at 12h (Fig. 1F). In all the forthcoming experiments LPS was employed for 24h at the concentration of 0.5  $\mu\text{g/ml}$ .

*LPS induces ERS in human monocytes.* The three canonical pathways involved in the unfolded protein response (UPR) were activated by LPS in THP-1 cells. The IRE-1 pathway was evaluated by the determination of spliced XBP-1, which was increased as early as 2h after the beginning of LPS exposure, lasting for at least 48h (Fig. 2A). The PERK pathway was also activated as determined by the ratio pPERK/PERK (Fig. 2B) and p $\text{eIF}2\alpha$ / $\text{eIF}2\alpha$  (Fig. 2C) by immunoblot, and also by the determination of pPERK (Fig. 2E) and p $\text{eIF}2\alpha$  (Fig. 2F) by flow-cytometry. The activation of the ATF-6 pathway was determined by immunoblot using an antibody that reacts against the cleaved/active form of the protein (Fig. 2D). Additional markers of ERS were also induced by LPS, such as the serine kinase, pJNK (Fig. 2G), ATF-3 (Fig. 2H), the calcium regulatory proteins, stanniocalcin-2 (Fig. 2I) and calreticulin (Fig. 2K) and the co-chaperone DNAJC3 (Fig. 2J). The timings for activation of each of the evaluated proteins varied, but all except calreticulin were induced 24h after the beginning of LPS exposure. Therefore, 24h LPS exposure was employed in most of the following experiments.

*CD14/TLR4 are required to transduce the LPS signal towards ERS.* Blocking CD14 with an inhibitory antibody resulted in the complete inhibition of LPS-induced ERS through XBP-1 (Fig. 3A), pPERK/p $\text{eIF}2\alpha$  (Fig. 3B-C) and ATF-6 (Fig. 3D).

*LPS induces only a discrete increase of the chaperone GRP94.* LPS induced the expression of GRP94 in THP-1 cells as determined by immunoblot (Fig. 4A), flow-

cytometry (Fig. 4E) and real-time PCR (Fig. 4I). The magnitude of GRP94 increase was comparable to the increase of GRP78 (Fig. 4B and 4F). However, as compared to the impact of LPS on TLR4 expression (Fig. 4C, 4G and 4J), there was always an imbalance favoring TLR4 expression, independently of the method employed for measurement of the respective proteins/mRNAs (Fig. 4L-N). Conversely, MD2, another protein that binds to TLR4 and is required for its cell-membrane expression is induced by LPS in levels much higher than TLR4 (Fig. 4D, 4H, 4K, 4L-N).

*LPS-induced ERS is inhibited by a chemical chaperone.* LPS induced the increased physical association of TLR4 with GRP94 (Fig. 5A) but not with GRP78 (Fig. 5B). The exposure of THP-1 cells to the chemical chaperone PBA resulted in complete inhibition of LPS-induced ERS as determined by the expression of spliced XBP-1 (Fig. 5C) and pPERK/PERK, p $\text{eIF2}\alpha$ / $\text{eIF2}\alpha$  ratios (Fig. 5D-E).

*Glucose deprivation increases steady-state and LPS-induced GRP94 expression.* THP-1 cells were glucose deprived for 6 h and used in experiments 24hs latter (Fig. 5F). The protein expressions of GRP94 (Fig. 5G) and GRP78 (Fig. 5H) were significantly increased by glucose deprivation. However, when glucose deprivation was followed by LPS exposure, only GRP94, but not GRP78, underwent an additional significant increase as compared to LPS alone (Fig. 5G).

*Glucose deprivation protects human monocytes from LPS-induced ERS.* The effect of LPS to induce ERS through all the three canonical pathways was completely

inhibited by the pre-incubation of THP-1 cell in glucose deprived medium (Fig. 6A-C).

*Small-interfering RNA targeting of GRP94 or GRP78 rescues the protective effect of glucose deprivation on LPS-induced ERS.* The use of siRNA to target GRP94 or GRP78 resulted in an almost complete disappearance of steady-state or glucose-induced protein levels of either protein (Fig. 6D-E). This approach rescued the cells from the protective effect of glucose deprivation on LPS-induced ERS, as determined by the evaluation of spliced XBP-1 (Fig. 6F-I, for GRP94 and GRP78, respectively), pPERK/PERK (Fig. 6G-J, for GRP94 and GRP78, respectively) and ATF-6 (Fig. 6H-K, for GRP94 and GRP78, respectively).

## **Discussion**

LPS is a potent activator of the innate immune response, which plays an important role in the defense against Gram-negative bacteria (17). It is currently accepted that a LPS receptor complex is formed by the association of TLR4 with MD-2, and depends also on two accessory proteins, CD14 and LPS-binding protein (LBP) (18). Upon ligand binding, TLR4 signal transduction proceeds through at least two distinct intracellular pathways: Myd88, which activates gene transcription in response to NF $\kappa$ B; and Trif, which can activate either NF $\kappa$ B or IRF3 (19). The excessive activation of this pathway in living organisms can lead to a life-threatening condition known as toxic shock, which can result in multiple organ failure and eventually, death (20). Thus, the termination of TLR4 signaling is tightly

regulated, depending on the endocytosis and lysosomal degradation of the protein (21). If the LPS signal is brief, the TLR4 synthetic machinery in the ER, will replace the recycled proteins and the response to LPS will be soon normalized (21). However, upon prolonged exposure, cells become desensitized to LPS, at least in part, due to insufficient TLR4 replacement (22; 23).

Recent studies have reported the induction of ERS as a consequence of TLR4 activation (8-10). This integration of signals have a pathogenic role in diseases such as obesity, type 2 diabetes and atherosclerosis, and, the complete characterization of this phenomenon may offer new therapeutic possibilities for a number of metabolic and inflammatory diseases. In the hypothalamus of obese rodents, the inhibition of TLR4 signaling produces a complete inhibition of ERS (8). Conversely, the inhibition of ERS with a chemical chaperone, blocks only ERS, but has no effect on TLR4 signaling (8). With this information in mind, we hypothesized that TLR4/ERS integration would occur as a consequence of a primary and prolonged stimulus of the TLR4 pathway, which would activate the synthesis and folding of new TLR4 units in the ER, therefore, generating a stressing condition for the organelle. As a type I transmembrane protein, the nascent TLR4 molecules are folded in the ER, which requires the activity of the resident chaperone GRP94 in association with PRAT4A (11; 24). In addition to the chaperoning activity of GRP94, the association of TLR4 with MD-2, is a required condition for the receptor to functionally reach the cell membrane (25). The importance of this association is illustrated by the fact that in MD-2 knockout mice, the presence of TLR4 in the cell

membrane is drastically reduced and the response to LPS is severely compromised (25). Thus, it is expected that, during an increased demand for novel TLR4 units in the cell membrane, the increased ER expression of the receptor would be accompanied by, at least, a similar rise in the amount of GRP94 and MD-2.

To investigate the mechanisms involved in TLR4-induced ERS, we treated a human monocyte cell line with LPS. The induction of ERS in monocytes/macrophages can be considered as a physiological phenomenon to which the cells are perfectly adapted (26). In these cells, ERS plays an important role in the phenotypic change and cytokine expression which are necessary for the most effective handling of pathogens (27). In THP-1 cells, LPS produced, on a dose- and time-dependent fashion, the activation of ERS with the induction of UPR through all the three canonical pathways. This was dependent on the adequate function of the LPS receptor complex, since immuno-inhibition of CD14 was capable of completely restraining the phenomenon.

As expected, LPS produced some increase in the main TLR4 processing chaperone, GRP94, and in the chaperone that acts as the main sensor for stress, GRP78. However, the magnitude of chaperone increase following LPS exposure was somewhat lower than that of either TLR4 or MD-2. In fact, the increase of MD-2, which is equally required for TLR4 to reach the cell membrane, is up to ten-fold higher than the increase of GRP94.

As a proof of the importance of chaperone insufficiency in the induction of ERS by LPS, we were capable of completely inhibiting UPR by treating the cells with a chemical chaperone, an approach with proven efficiency in inhibiting ERS-dependent insulin resistance and diabetes (6).

Next, we used an approach to increase endogenous chaperone expression. Both GRP94 and GRP78 are inducible by glucose deprivation. In the THP-1 cell line we obtained an increment of 2.4-, and 10-fold in the expressions of GRP94 and GRP78, respectively, 24 h after glucose deprivation. However, when comparing with the effect of LPS exposure, glucose deprivation produced an additional increase only of GRP94, but not of GRP78. This was accompanied by a complete inhibition of LPS-induced ERS.

In the final part of the study, we targeted GRP94 and GRP78 with siRNA. By this approach we obtained a complete inhibition of glucose deprivation-induced expression of either chaperone. Under chaperone interference conditions, glucose deprivation was no longer capable of restraining LPS-induced ERS, though all three canonical pathways.

Thus, we conclude that, in human monocytes, prolonged TLR4 activation by LPS produces ERS leading to UPR due to the insufficient expression of chaperones, particularly GRP94, to match the folding demands of the newly synthesized TLR4 molecules. This can be completely reverted by exogenous chemical chaperones or by the induction of endogenous chaperones by glucose restriction. Figure 7 summarizes the mechanism involved in LPS/TLR4-induced ERS/UPR.

## Methods

*Antibodies, chemicals, and buffers.* Antibodies against eIF2 $\alpha$  (sc11386, rabbit polyclonal), RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) (sc13073, rabbit polyclonal), phosphor-[Thr981]-PERK (pPERK, sc32577, rabbit polyclonal), GRP78 (sc13968, rabbit polyclonal), p-JNK (sc6254 mouse monoclonal), F4/80 (sc25830, rabbit polyclonal), TLR4 (sc10741, rabbit polyclonal), MyD88 (sc11356, rabbit polyclonal), MD-2 (sc80183, mouse monoclonal), GRP94 (sc11402, rabbit polyclonal), goat anti-rabbit IgG-FITC (sc2012, mouse/human adsorbed), goat anti-mouse IgG-FITC (sc2010, human adsorbed), and normal mouse serum (sc45051) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-phosphor-[Ser51] eIF2 $\alpha$  (ab32157, rabbit monoclonal) and anti-beta actin (ab8227, rabbit polyclonal) were from Abcam. The anti-ATF6 (Full-length and Active/Cleaved Forms. Clone 70B1413.1 IMG-273, mouse monoclonal) was from Imgenex. The purified anti-Xbp-1 (COOH terminus) (619502, rabbit polyclonal) was from BioLegend. The purified NA/LE mouse anti-human CD14 (Mouse IgG2a, $\kappa$ , Catalog Number: 555395) was from BD Pharmingen™. All the reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad. HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, collagenase, bovine serumalbumin (fraction V), 5-phenylbutyric acid, (PBA, #P21005), thapsigargin (T9033-1mg) and HBP (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, #01816LD) were from Sigma-Aldrich. Highly purified Escherichia coli LPS were from Calbiochem (Merck; KGaA). All the chemicals used in the real-time

PCR and XBP-1 splicing experiments were purchased from Invitrogen and Applied Biosystems.

*Cell line.* The monocyte cell line THP-1 was plated at an initial density of  $10^6$  cells/ml in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium containing 10 % fetal bovine serum (FBS), in 1.5 cm culture dishes. The cells were incubated with LPS (0,5  $\mu$ g/ml, or other concentrations as stated in the legends for the figures) and the expression/activation of proteins involved in ERS was determined by real-time PCR, immunoblot or flow-cytometry. In some experiments, cells were deprived of glucose for 6 h or treated with siRNA (GRP94 siRNA, sc35523 and GRP78 siRNA, sc29338 from Santa Cruz Biotechnology) to increase or decrease, respectively, the expression of the chaperones. Pharmacological inhibition of endoplasmic reticulum stress was achieved by pre-incubation for 1 h at 37°C with the chemical chaperone PBA at final concentration of 3 mM, after this period the cells were chased by LPS (0,5  $\mu$ g/ml) for 24 h. For experiments aimed at evaluating TLR4 signaling inhibition, the cells were incubated with 2  $\mu$ g/ml of anti-CD14 for 1 h, after this period the cells were chased by LPS (0,5  $\mu$ g/ml) for 24 h.

*Glucose deprivation protocol.* THP-1 cells were deprived of glucose for 6 h in RPMI 1640 without glucose, containing 10 % of FBS. After this period glucose was reintroduced at a final concentration of 11 mM. The evaluation of chaperone expression and the incubation of LPS was performed after 24 h of glucose reintroduction.



*GRP78 and GRP94 siRNA.* To inhibit chaperone expression, cells were transfected with 50 nM of GRP78 siRNA or with 80 nM of GRP94 siRNA, conjugated with Lipofectamine™ 2000 for 7 h. The experiment was performed 35-60 h after the transfection. Optimal concentrations of siRNAs were obtained after dose-response and time-course experiments.

*Flow cytometry.* At the end of the incubation period with LPS, the THP-1 cell line were harvested and re-suspended in PBS. For F4/80, TLR4 and MD2 labeling, the cells were not submitted to any fixation and permeabilization protocol. For the remainder of the proteins (p-JNK, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , GRP78 and GRP94), cells were permeabilized with 0.1% saponin. Primary antibodies were used at a final concentration of 2.5  $\mu$ g/ml and the secondary, FITC conjugated, antibody was used at a final dilution of 1:100. Signal detection was performed in a FACSCalibur flow cytometer equipped with an argon laser, and analyses of data were performed with the CellQuest software (BD Biosciences). Differences are presented as percent variation of control.

*Real-time PCR.* TLR4, MD-2, GRP94, PERK, ATF3, ATF6, STC2, DNAJC3 and CALR were measured in THP-1 cell line incubated with LPS (0,5  $\mu$ g/ml) in different times. Standard reverse-transcription PCR was performed using total RNA from THP-1 cell line as described previously (28). Intron-skipping primers (TaqMan™) were obtained from Applied Biosystems: TLR4: Hs\_00152939\_m1, MD-2: LY96: Hs\_00209771\_m1, GRP94: HSP90B1: Hs\_00427665\_g1, PERK: EIF2AK3: Hs\_00178128\_m1, ATF3: ATF3: Hs\_00231069\_m1, ATF6: ATF6:

Hs\_00232586\_m1, Calreticulin: CALR: Hs\_00189032\_m1, Stanniocalcin-2: STC2: Hs\_00175027\_m1 and DNAJC3: DNAJC3: Hs\_00534483\_m1. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers (GAPDH) (Applied Biosystems) were used as control. Real-time PCR analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentrations of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through five-point, two fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 25 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, SYBR SAFE PCR master mix, and RNase free water to a 20  $\mu$ l final volume. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

*Immunoprecipitation and immunoblotting.* For evaluation of TLR activation and ER stress induction, the THP-1 cells were homogenized in solubilization buffer at 4°C. Aliquots of the resulting protein extract containing 0.35 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against TLR4, GRP78, GRP94 and MyD88 at 4°C overnight, followed by SDS-PAGE transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-TLR4, anti-GRP78, anti-GRP94, or anti-MyD88 antibodies. In direct immunoblot experiments, 0.06 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-pPERK, anti-PERK, anti-pEIF2 $\alpha$ , anti-EIF2 $\alpha$ , anti-ATF6, anti-sXBP-1, anti-GRP78, anti-GRP94, anti-TLR4, anti-MD-2 or anti- $\beta$ -Actin. Results for pPERK and pEIF2 $\alpha$  are presented as a ratio pPERK/PERK and pEIF2 $\alpha$ /EIF2 $\alpha$ ,

respectively. Specific bands were detected by chemiluminescence, and visualization was performed by exposure of the membranes to RX-films.

*Statistical analysis.* Specific protein bands present in the blots and cDNA bands in agarose gels were quantified by digital densitometry (UN-SCAN-IT). Mean values  $\pm$  SEM obtained from densitometry scans and from real-time PCR, and XBP-1 splicing measurements, were compared using Tukey–Kramer test (ANOVA);  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

*Acknowledgements.* We thank Dr Nicola Conran from the University of Campinas for English grammar editing. This study was performed with grants provided by Fundação de Amparo a Pesquisa de Sao Paulo e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## References

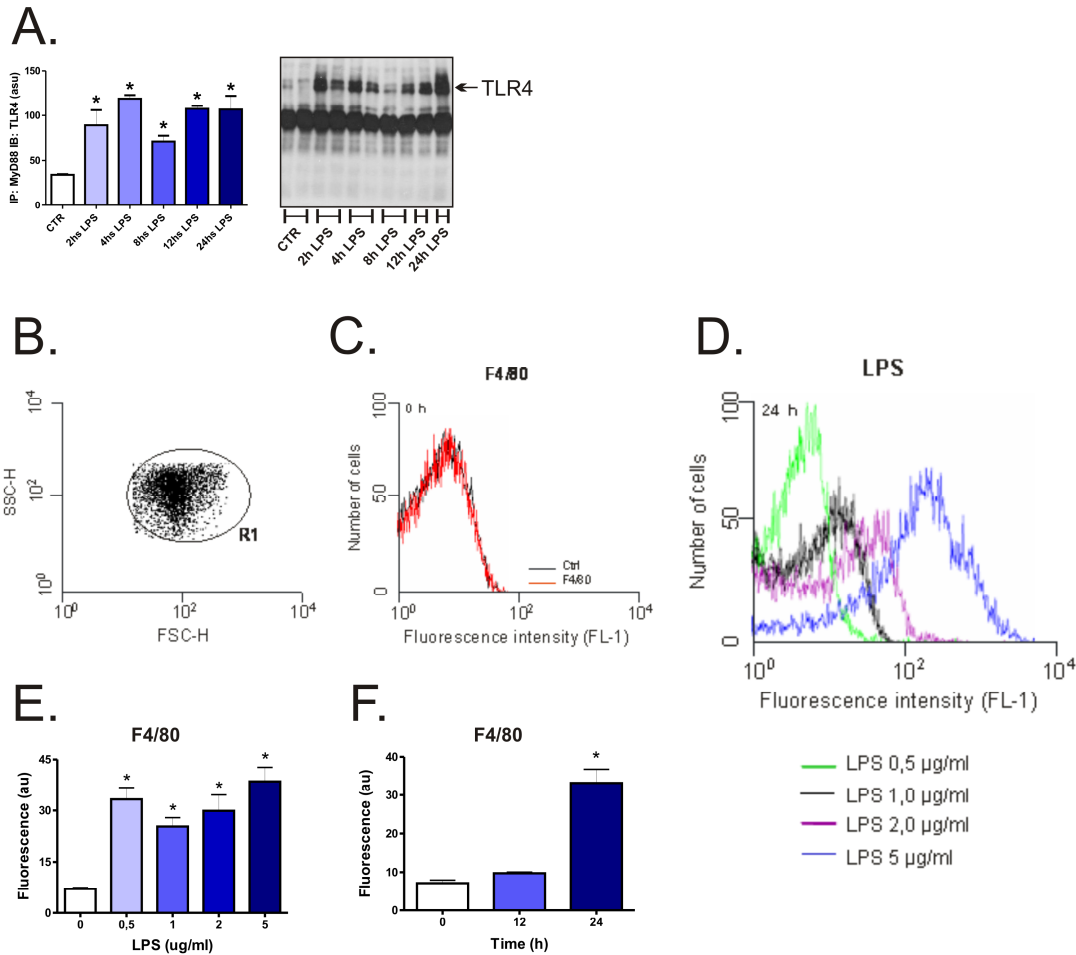
1. Gregor MF, Hotamisligil GS: Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-445
2. Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900-917
3. Tabas I, Tall A, Accili D: The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circ Res* 2010;106:58-67
4. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ: Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1986-1998

5. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461
6. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS: Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313:1137-1140
7. Breder I, Coope A, Arruda AP, Razolli D, Milanski M, Dorigheo Gde G, de Oliveira HC, Velloso LA: Reduction of endoplasmic reticulum stress--a novel mechanism of action of statins in the protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;212:30-31
8. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carnevali JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA: Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009;29:359-370
9. Woo CW, Cui D, Arellano J, Dorweiler B, Harding H, Fitzgerald KA, Ron D, Tabas I: Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* 2009;11:1473-1480
10. Seimon TA, Ostfeld A, Moore KJ, Golenbock DT, Tabas I: Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19794-19799
11. Randow F, Seed B: Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* 2001;3:891-896
12. Harding CV: gp96 leads the way for toll-like receptors. *Immunity* 2007;26:141-143
13. Yang Y, Li Z: Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Molecules and cells* 2005;20:173-182

14. Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrancois L, Li Z: Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 2007;26:215-226
15. Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH: TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature immunology* 2010;11:411-418
16. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM: Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *Journal of immunology* 2001;166:249-255
17. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ: How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74:479-485
18. Miller SI, Ernst RK, Bader MW: LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:36-46
19. Kobayashi T, Takaesu G, Yoshimura A: Mal-function of TLRs by SOCS. *Nat Immunol* 2006;7:123-124
20. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T: The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989;169:333-338
21. Saitoh S: Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation. *Immunobiology* 2009;214:594-600
22. Ziegler-Heitbrock HW, Blumenstein M, Kafferlein E, Kieper D, Petersmann I, Endres S, Flegel WA, Northoff H, Riethmuller G, Haas JG: In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology* 1992;75:264-268

23. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S: Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-3479
24. Wakabayashi Y, Kobayashi M, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Konno K, Takahashi K, Ishii T, Mizutani T, Iba H, Kouro T, Takaki S, Takatsu K, Oda Y, Ishihama Y, Saitoh S, Miyake K: A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *J Immunol* 2006;177:1772-1779
25. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature immunology* 2002;3:667-672
26. Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flavell R, Tabas I: Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol* 2005;171:61-73
27. Fan W, Idnurm A, Breger J, Mylonakis E, Heitman J: Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2007;75:3394-3405
28. Hirota M, Moro O: MIP-1beta, a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicol In Vitro* 2006;20:736-742

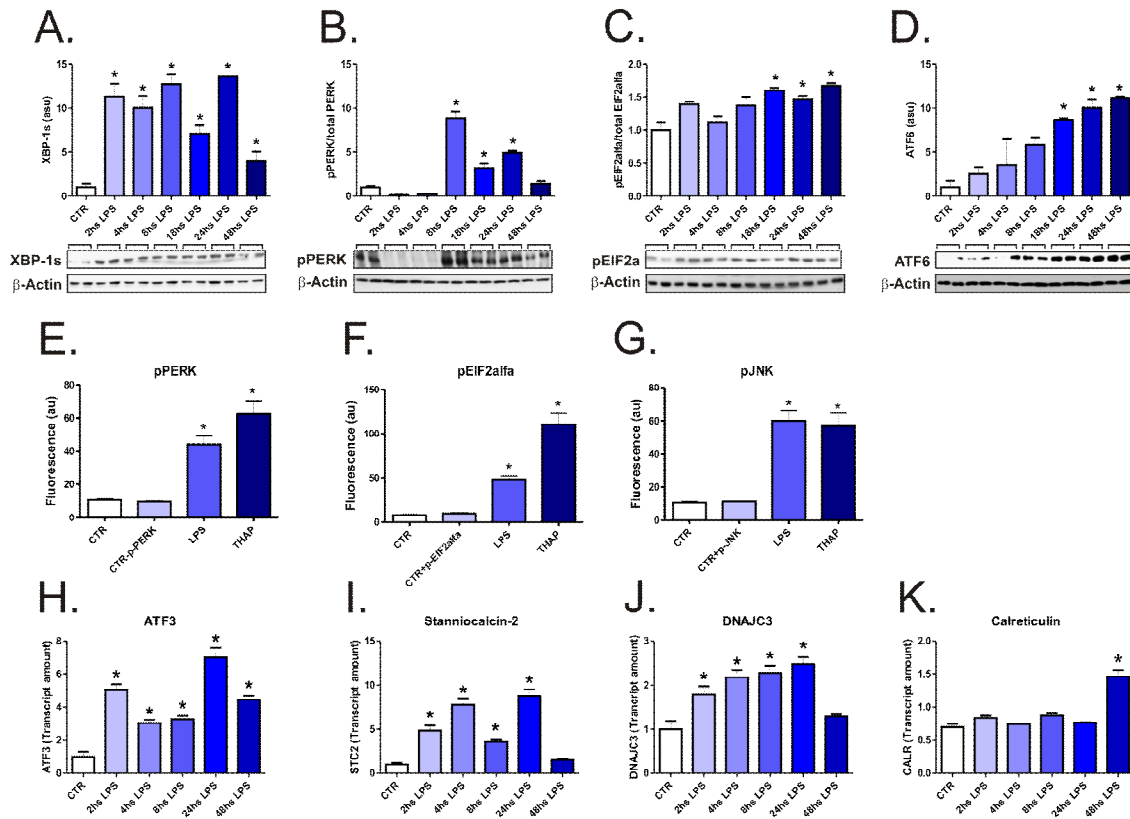
## Figures



## Coope, Figure 1

Figure 1. *LPS-induced activation of TLR4 signaling in THP-1 cells.* THP-1 cells were exposed for 2-24h to 0.5 µg/ml LPS and protein extracts were obtained for immunoprecipitation using anti-MyD88 antibody, and immunoblotting using anti-TLR4 antibody (A). The homogeneity of cell preparation was evaluated by flow-cytometry (B). The basal (C) as well as the LPS- (D and E) stimulated expression of F4/80 were evaluated by flow-cytometry; cells were exposed to 0.5-5.0 µg/ml LPS for 24h (D and E). In F, cells were exposed to 0.5 µg/ml LPS and harvested

after 0, 12 or 24h. In all experiments n = 6. In A, \*p<0.05 vs. CTR; in E and F, \*p<0.05 vs. 0.

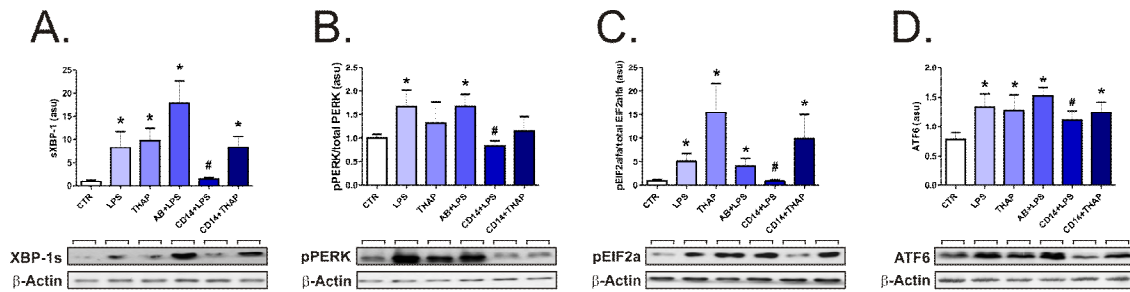


Coope, Figure 2

Figure 2. *LPS* induces ERS in THP-1 cells. In all experiments, cells were exposed to 0.5  $\mu\text{g/ml}$  LPS and harvested in times as depicted in the panels (A-D; H-K) or after 24h (E-G). In A-D, protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-spliced XBP1 (A), pPERK (B), pEIF2 $\alpha$  (C), or ATF6 (D). All membranes were stripped and re-blotted with anti- $\beta$ -actin. In E-G, the expressions of pPERK (E), pEIF2 $\alpha$  (F), and pJNK (G), were evaluated by flow-cytometry. Controls were labeled or not with the specific antibodies, CTR+(pPERK, pEIF2 $\alpha$  or pJNK), or CTR, respectively. For the flow-cytometry evaluation some groups of cells were treated with thapsigargin (THAP). In H-K, real-time PCR was used to

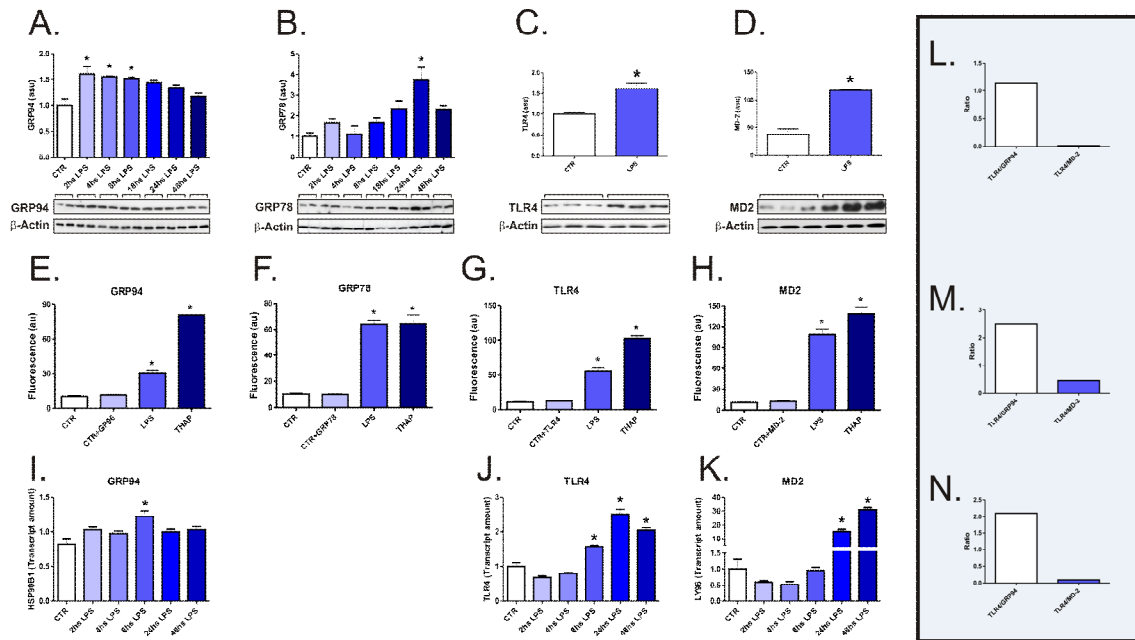


determine de expressions of ATF3 (H), stanniocalcin-2 (I), DNAJC3 (J) and calreticulin (K). In all experiments n = 6. \*p<0.05 vs. CTR.



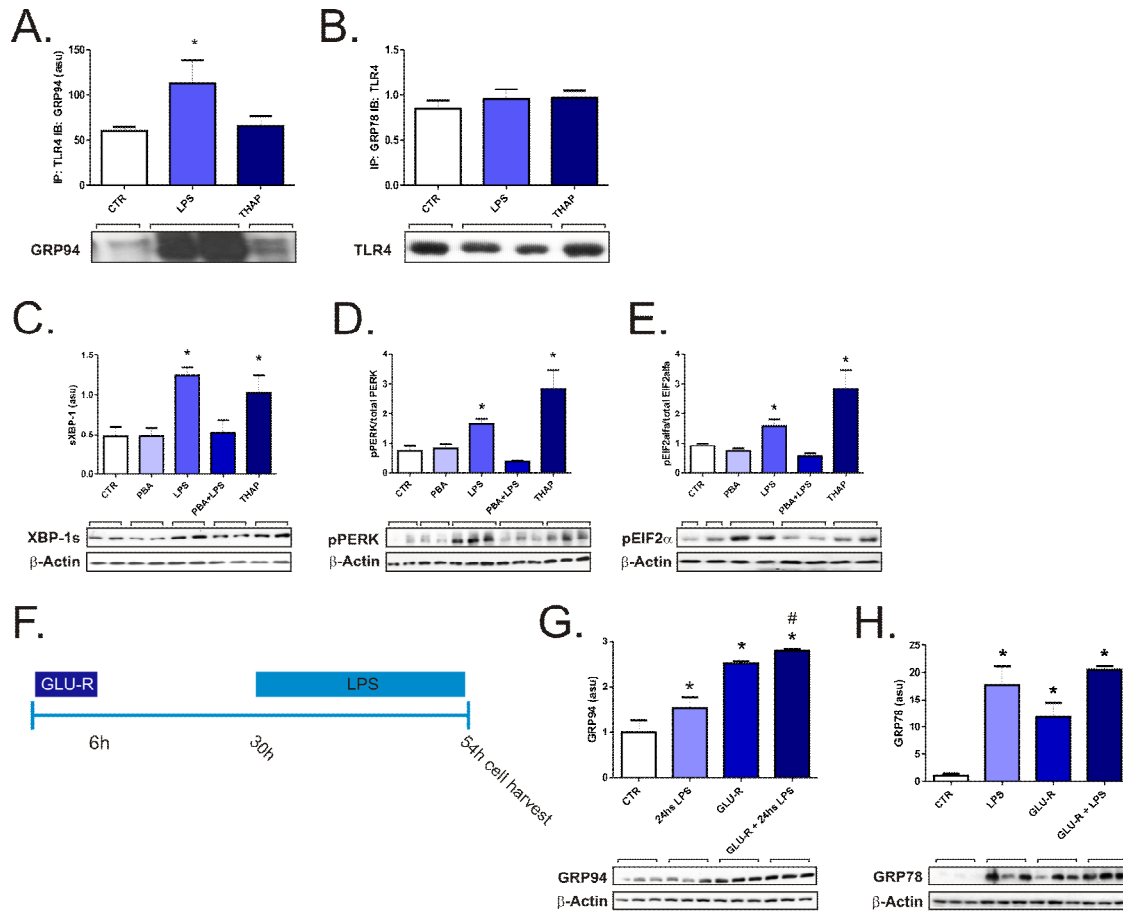
Coope, Figure 3

Figure 3. *Inhibition of CD14 reverts LPS-induced ERS.* In A-D, cells were maintained in steady-state condition (CTR) or treated with LPS, thapsigargin (THAP), preimmune serum + LPS (AB+LPS), anti-CD14 antibody + LPS (CD14+LPS) or anti-CD14 antibody + thapsigargin (CD14+THAP). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-spliced XBP1 (A); pPERK (B); pEIF2α (C); or ATF6 (D) antibodies. All membranes were stripped and re-blotted with anti-β-actin. In all experiments n = 6, \*p<0.05 vs. CTR; #p<0.05 vs. LPS.



Coope, Figure 4

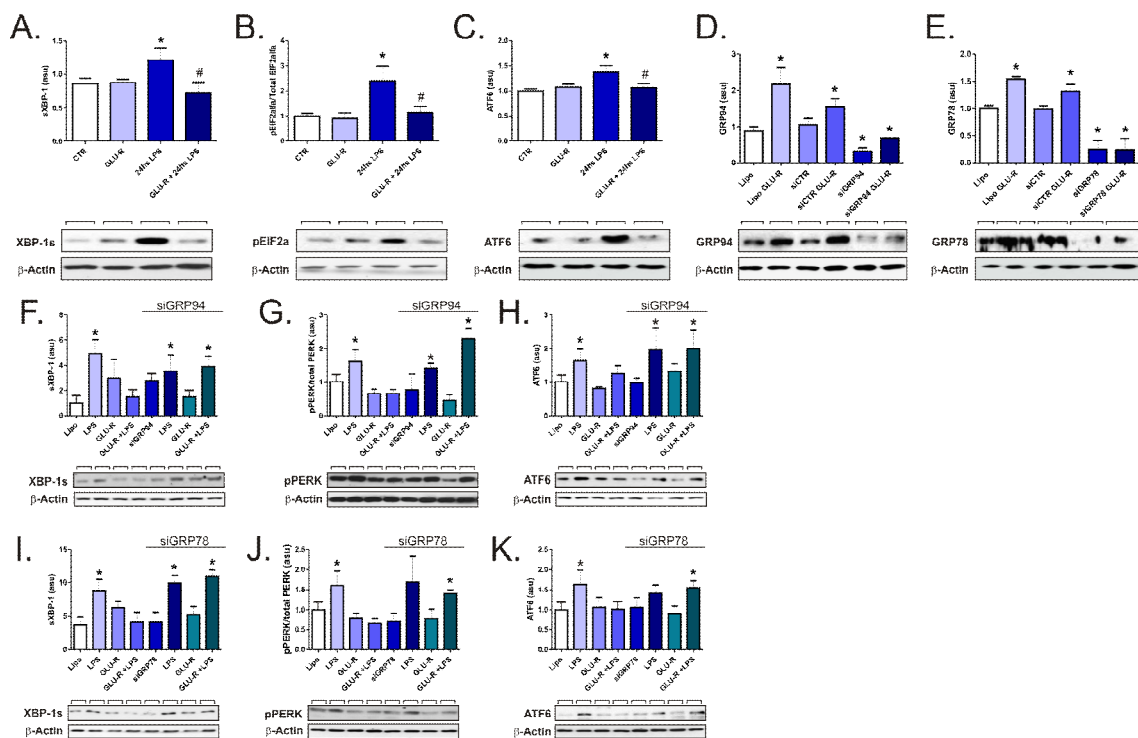
Figure 4. *LPS* induces only a discrete increase of GRP94 and GRP78 in THP-1 cells. In A-D and I-K, cells were maintained in steady-state condition (CTR) or treated with LPS 0.5  $\mu\text{g/ml}$  for 2-48h (A-B and I-K) or for 24h (C-D). In A-D, protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GRP94 (A), GRP78 (B), TLR4 (C), or MD-2 (D) antibodies. All membranes were stripped and re-blotted with anti- $\beta$ -actin. In E-H, the expressions of GRP94 (E), GRP78 (F), TLR4 and MD-2 (G), were evaluated by flow-cytometry. Controls were labeled or not with the specific antibodies, CTR+(GRP94, GRP78, TLR4 or MD-2), or CTR, respectively. In I-K, real-time PCR was used to determine the expressions of GRP94 (I), TLR4 (J) and MD-2 (K). In L-N, estimations of the ratios TLR4/GRP94 and TLR4/MD-2 were obtained at the 24h time-point GRP94 or MD-2 expressions were obtained. In all experiments  $n = 6$ ,  $*p < 0.05$  vs. CTR.



## Coope, Figure 5

Figure 5. *Chaperones revert LPS-induced ERS.* In A-B, THP-1 cells were maintained in steady-state (CTR) or treated with LPS or thapsigargin (THAP). Protein extracts were submitted to immunoprecipitation with anti-TLR4 (A) or GRP78 (B) antibodies and the resulting immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-GRP94 (A) or TLR4 (B) antibodies. In C-E, THP-1 cells were maintained in steady-state (CTR) or treated with PBA, LPS, PBA+LPS or thapsigargin (THAP). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-spliced XBP1 (C), pPERK (D) or pEIF2 $\alpha$  (C) antibodies. All membranes were stripped and re-blotted with anti- $\beta$ -actin. In F, is depicted the protocol for glucose deprivation followed by 24h LPS treatment. In G-H, THP-1

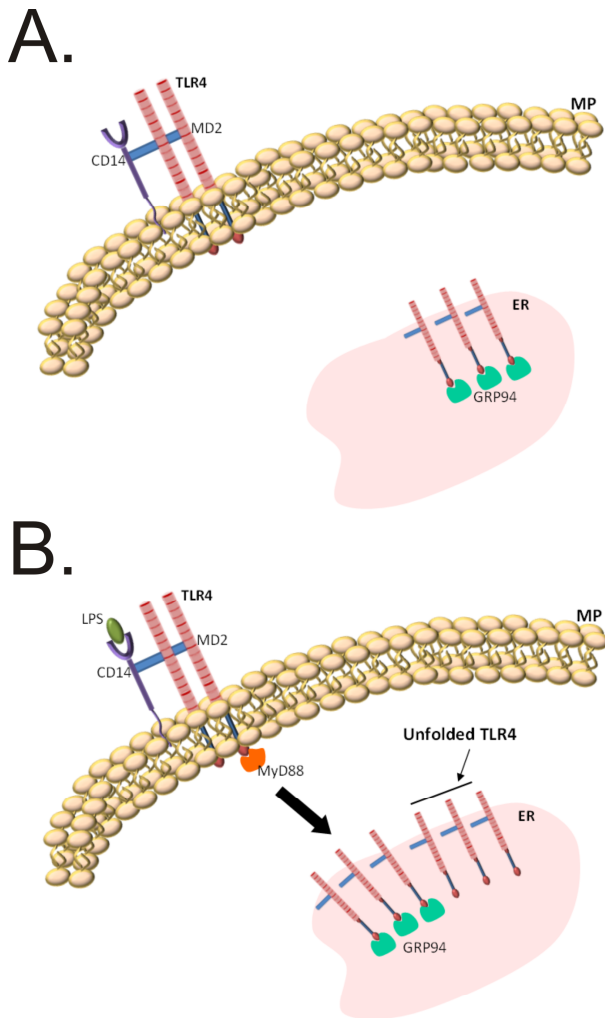
cells were maintained in steady-state (CTR) or treated with LPS, or submitted to glucose deprivation without LPS treatment (GLU-R), or submitted to glucose deprivation followed by LPS treatment (GLU-R+LPS). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GRP94 (G) or GRP78 (H) antibodies. All membranes were stripped and re-blotted with anti- $\beta$ -actin. In all experiments  $n = 6$ , \* $p < 0.05$  vs. CTR; in G, # $p < 0.05$  vs. LPS.



Coope, Figure 6

Figure 6. *GRP94 and GRP78 control ERS in THP-1 cells.* In A-C, THP-1 cells were maintained in steady-state (CTR) or treated with LPS (24h), or submitted to glucose deprivation without LPS treatment (GLU-R), or submitted to glucose deprivation followed by LPS treatment (GLU-R+24h LPS). Protein extracts were

separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-spliced XBP1 (A), pelf2 $\alpha$  (B), or ATF6 (C) antibodies. In D-E, THP-1 cells were treated with lipofectamine alone (Lipo) or in the presence of glucose deprivation (Lipo Glu-R), or with a control siRNA (siCTR), a GRP94 (D) or a GRP78 (E) siRNA (siGRP94 or siGRP78, respectively), or a GRP94 (D) or a GRP78 (E) siRNA in the presence of glucose deprivation (siGRP94Glu-R or siGRP78Glu-R, respectively). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GRP94 (D) or GRP78 (E) antibodies. In F-K, THP-1 cells were treated with lipofectamine alone (Lipo) or in the presence of LPS, glucose deprivation (Lipo Glu-R), glucose deprivation plus LPS (GLU-R+LPS) in the absence of presence of a GRP94 (F-H) or a GRP78 (I-K) siRNA (siGRP94 or siGRP78, respectively). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-spliced XBP1 (F and I), pPERK (G and J), or ATF6 (H and K) antibodies. All membranes were stripped and re-blotted with anti- $\beta$ -actin. In all experiments n = 6; \*p<0.05 vs. CTR. In A-B, #p<0.05 vs. 24h LPS.



## Coope, Figure 7

Figure 7. Schematic representation of the effect of chaperone deficiency on the activation of UPR. Under non stressing conditions the rate of synthesis and folding of TLR4 is perfectly matched by the availability of chaperones, particularly GRP94 (upper panel). Under long-term LPS stimulus, the need for novel TLR4 protein units, causes an imbalance between folding demand and chaperone availability, leading to the activation of an unfolded protein response (lower panel).



# *CONCLUSÃO GERAL*

Andressa Coope dos Santos  
*Conclusão Geral*



O objetivo do presente estudo foi definir os mecanismos moleculares envolvidos na conexão intracelular entre a ativação do TLR4 e a indução de ERE em monócitos humanos. Essa integração de sinais tem um papel patogênico no desenvolvimento de doenças tais como obesidade, DM2 e aterosclerose, de tal forma que a completa caracterização deste fenômeno pode oferecer novas possibilidades terapêuticas para uma série de doenças inflamatórias e metabólicas.

Neste trabalho nós evidenciamos que a ativação prolongada da via de sinalização do TLR4 em monócitos humanos, em função da estimulação por LPS, induz ERE devido à expressão insuficiente das chaperonas, em especial a GRP94, para corresponder as exigências de síntese de novas moléculas de TLR4. Este efeito pode ser completamente revertido após o tratamento com chaperonas químicas, ou por indução endógena das chaperonas por privação de glicose.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Andressa Coope dos Santos  
*Referências Bibliográficas*

Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., and White M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* **275**, 9047-9054.

Akashi S., Shimazu R., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M.(2000) Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **164**, 3471-3475.

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.

Akira S., Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.

Akira S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* **278**, 38105-38108.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Nunes C. P. (2010) *Biologia Molecular da Célula*. 5<sup>a</sup> ed; Artmed, 2010, p723-748.

Amaral M.E., Barbuio R., Milanski M., Romanatto T., Barbosa, H.C., Nadruz W., Bertolo M.B., Boschero A.C., Saad M.J., Franchini K.G., Velloso L.A. (2006) Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. *J. Neurochem* **98**, 203-212.

Araujo E. P., De Souza C. T., Gasparetti A. L., Ueno M., Boschero A. C., Saad M. J., et al. (2005) Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* **146**, 1428-37.

Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J. A., Bare O., Auron P. E., Stevenson M. A., Calderwood S. K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**, 15028-15034.

Auffray C., Sieweke M. H., Geissmann F. (2009) Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* **27**, 669-9

Barreiro G. C., Prattali R. R., Caliseo C. T., Fugiwara F. Y., Ueno M., Prada P. O., Velloso L. A., Saad M. J. and Carnevali J. B. (2004) Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 992-997.

Benoit S. C., Kemp C. J., Elias C. F., Abplanalp W., Herman J. P., Migrenne S., Lefevre A. L., Cruciani-Guglielmacci C., Magnan C., Yu F., Niswender K., Irani B. G., Holland W. L., Clegg D. J. (2009) Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* **119**, 2577-89.

Boden G., She P., Mozzoli M., Cheung P., Gumireddy K., Reddy P., Xiang X., Luo Z., Ruderman N. (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* **54**, 3458-3465.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Breder I., Coope A., Arruda A. P., Razolli D., Milanski M., Doriguello G. de G., de Oliveira H. C., Velloso L. A. (2010) Reduction of endoplasmic reticulum stress--a novel mechanism of action of statins in the protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* **212**, 30-31

De Souza C. T., Araujo E. P., Bordin S., Ashimine R., Zollner R. L., Boschero A. C., Saad M. J. and Velloso L. A. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192-4199.

Dempsey P. W., Doyle S. E., He J. Q. and Cheng G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 193-209.

Gordon S., Taylor P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-964.

Gregor M.F., Hotamisligil G.S. (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415-445

Harari O. A., Alcaide P., Ahl D., Lusinskas F. W., Liao J.K. (2006) Absence of TRAM restricts Toll-like receptor 4 signaling in vascular endothelial cells to the MyD88 pathway. *Circ Res* **98**, 1134–1140.

Harding C. V. (2007) gp96 leads the way for toll-like receptors. *Immunity* **26**, 141-143

Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C.A., Ezekowitz R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8.

Hotamisligil G. S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-7.

Hotamisligil G. S. (2010a) Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med* **16**, 396-9.

Hotamisligil G.S. (2010b) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900-917

Hotamisligil G. S. (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, S53-55.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., and Spiegelman, B. M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**, 2409-2415.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91.

Iwasaki A., Medzhitov R. (2010) Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* **327**, 291-5.

Jacob S.S., Shastry P., Sudhakaran P.R. (2002) Monocyte-macrophage differentiation in vitro: modulation by extracellular matrix protein substratum. *Mol. Cell Biochem* **233**, 9-17.

Janeway C. A., Medzhitov R. (2002) Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**,197–216

Janeway C.A., (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **54**, 1–13.

Katsuki A., Sumida Y., Murashima S., Murata K., Takarada Y., Ito K., Fujii M., Tsuchihashi K., Goto H., Nakatani K., Yano Y. (1998) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 859–862.

Kaufman R. J., Scheuner D., Schroder M., Shen X., Lee K., Liu C. Y., et al. (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 411-21.

Kellerer M., Mushack J., Seffer E., Mischak H., Ullrich A., Häring H. U. (1998) Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* **41**, 833–838.

Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R., and Simsolo, R. B. (1995) The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* **95**, 2111-2119.

Kim D. S., Jeong S.K., Kim H. R., Chae S. W., Chae H. J. (2007) Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 140-5.

Kim J. K., Fillmore J. J., Sunshine M. J., Albrecht B., Higashimori T., Kim D. W., Liu Z. X., Soos T. J., Cline G. W., O'Brien W. R., Littman D. R., Shulman G. I. (2004) PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **114**, 823-7.

Kou P.M., Babensee J. E. (2011) Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *J Biomed Mater Res Part A* **96A**, 239–260.

Lee A. S. (2001) The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* **26**, 504-10.

Lee J. Y., Sohn K. H., Rhee S. H., Hwang D. (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 16683-16689.

Liang Chien-Ping., Han S., Senokichi T., Tall A. R. (2007) The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circulation Research* **100**, 1546-1555.

Ma Y., Hendershot L. M. (2001) The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* **107**, 827-30.

MacEwan D. J. (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* **14**, 477-492.

Martinon F., Chen X., Lee A. H., Glimcher L. H. (2010) TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature immunology* **11**, 411-418

Medzhitov R., Janeway C.A. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* **173**, 89–97

Medzhitov R., Janeway C.A. (2000b) Fly immunity: great expectations. *Genome Biology* **1**, 106.1–106.4

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397.

Milanski M., Degasperi G., Coope A., Morari J., Denis R., Cintra D. E., Tsukumo D. M., Anhe G., Amaral M. E., Takahashi H. K., Curi R., Oliveira H. C., Carnevali J. B., Bordin S., Saad M. J., Velloso L. A. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* **29**, 359-370

Miyake K., Ogata H., Nagai Y., Akashi S., Kimoto M. (2000) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4/MD-2 and RP105/MD-1. *J Endotoxin Res* **6**, 389-391.

Mogensen T. H. (2009) Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* **2**, 240-73



Mushegian A., Medzhitov R. (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J Cell Biol* **155**, 705-10.

Nagai Y., Akashi S., Nagafuku M., Ogata M., Iwakura Y., Akira S., Kitamura T., Kosugi A., Kimoto M., Miyake K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**, 667-672.

Nakatani Y., Kaneto H., Kawamori D., Yoshiuchi K., Hatazaki M., Matsuoka T. A., Ozawa K., Ogawa S., Hori M., Yamasaki Y., Matsuhisa M. (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* **280**, 847-851.

Nomura F., Akashi S., Sakao Y., Sato S., Kawai T., Matsumoto M., Nakanishi K., Kimoto M., Miyake K., Takeda K., Akira S. (2000) Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**, 3476-3479

Olefsky J. M., Glass C. K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol* **72**, 219–46

Ozawa K., Miyazaki M., Matsuhisa M., Takano K., Nakatani Y., Hatazaki M., Tamatani T., Yamagata K., Miyagawa J., Kitao Y., Hori O., Yamasaki Y., Ogawa S. (2005) The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 657-663.

Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R. O., Görgün C. Z., Hotamisligil G. S. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137-1140.

Ozcan U., Cao Q., Yilmaz E., Lee A. H., Iwakoshi N. N., Ozdelen E., Tuncman G., Gorgun C., Glimcher L. H. and Hotamisligil G. S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461.

Pahl H. L., Baeuerle P. A. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-KappaB. *Embo J.* **14**, 2580-2588.

Prada, P. O., Zecchin, H. G., Gasparetti, A. L., Torsoni, M. A., Ueno, M., Hirata, A. E., Corezola do Amaral, M. E., Hoer, N. F., Boschero, A. C., and Saad, M. J. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* **146**, 1576-1587.

Puka J., Mattos H. H. R. V., Gavron A. C., Vianna S. O., Vaz R. S. (2005) Origem e tipos de fagócitos *RUBS* **1**, 17-24.

Randow F., Seed B. (2001) Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* **3**, 891-896.

Rassa J. C., Meyers J. L., Zhang Y., Kudaravalli R., Ross S. R. (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2281-2286.

Ronald P.C., Beutler B. (2010) Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* **330**, 1061-4.

Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R., and Kern, P. A. (1996) The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* **97**, 1111-1116.

Saitoh S, Miyake K. (2009) Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev* **227**, 32-43.

Saitoh S. (2009) Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation. *Immunobiology* **214**, 594-600

Saltiel A. R. and Kahn C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Schröder M., Kaufman R. J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* **569**, 29-63.

Seimon T. A., Obstfeld A., Moore K. J., Golenbock D. T., Tabas I. (2006) Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19794-19799

Serbina N.V., Jia T., Hohl T. M., Pamer E. G. (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* **26**, 421-452.

Seya T., Oshiumi H., Sasai M., Akazawa T., Matsumoto M. (2005) TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 524-9.

Shi Z., Cai Z., Wen S., Chen C., Gendron C., Sanchez A., Patterson K., Fu S., Yang J., Wildman D., Finnell R. H., Zhang D. (2009) Transcriptional regulation of the novel Toll-like receptor Tlr13. *J Biol Chem* **284**, 20540-7.

Shi H., Kokoeva M. V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J. S., (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid - induced insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 3015-3025.

Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. (1999) MD-2 a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777-1782.

Shoelson S. E., Lee J. and Yuan M. (2003) Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, S49-52.

Smiley S. T., King J. A., Hancock W. W. (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **16**, 2887-2894.

Tabas I., Tall A., Accili D. (2010) The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circ Res* **106**, 58-67

Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-940.

Tsukumo D. M., Carvalho-Filho M. A., Carvalheira J. B., Prada P. O., Hirabara S. M., Schenka A. A., Araujo E. P., Vassallo J., Curi R., Velloso L. A., Saad M. J. (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**:1986-98.

Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H. P., et al. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**(5453), 664-6.

Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C. J., Issels R. D., Wagner H. (2002a) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* **277**, 15107-15112.

Vabulas R. M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirschning C. J., Da Costa C., Rammensee H-G., Wagner H., Schild H. (2002b)

The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein gp96 activates dendritic cells via the toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* **277**, 20847-20853.

Velloso L. A., Folli F., Sun X. J., White M. F., Saad M. J., Kahn C. R. (1996) Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12490-5.

Velloso L. A., Kampe O., Hallberg A., Christmanson L., Betsholtz C. and Karlsson F. A. (1993) Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* **91**, 2084-2090.

Visintin A., Mazzoni A., Spitzer J. H., Wyllie D. H., Dower S. K., Segal D. M. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *Journal of immunology* **166**, 249-255

Waage A., Brandtzaeg P., Halstensen A., Kierulf P., Espevik T. (1989) The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*; **169**:333-338

Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45–65.

Wakabayashi Y., Kobayashi M., Akashi-Takamura S., Tanimura N., Konno K., Takahashi K., Ishii T., Mizutani T., Iba H., Kouro T., Takaki S., Takatsu K., Oda Y., Ishihama Y., Saitoh S., Miyake K. (2006) A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *J Immunol* **177**, 1772-1779.

Watowich S. S., Morimoto R. I., Lamb R. A. (1991) Flux of the paramyxovirus hemagglutinin - neuraminidase glycoprotein through the endoplasmic reticulum activates transcription of the GRP78 - BiP gene. *J Virol* **65**, 3590-3597.

Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin. Investig* **112**, 1796–808

Wellen K. E., Hotamisligil G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* **115**, 1111-1119.

Woo C. W., Cui D., Arellano J., Dorweiler B., Harding H., Fitzgerald K. A., Ron D., Tabas I. (2009) Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* **11**, 1473-1480

Xu C., Bailly-Maitre B. and Reed J. C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**, 2656-2664.

Xu H., Barnes G. T., Yang Q., Tan G., Yang D., et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin. Investig* **112**, 1821–30

Xu X. H., et al. (2001) Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**, 3103-3108.

Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**, 6668-6672.

Yamazaki H., Hiramatsu N., Hayakawa K., Tagawa Y., Okamura M., Ogata R., Huang T., Nakajima S., Yao J., Paton A.W., Paton J. C., Kitamura M. (2009).

Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J. Immunol.* **183**, 1480–1487.

Yan Z., Hansson G. K. (2007) Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunological Reviews* **219**, 187-203.

Yang Y., Li Z. (2005) Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Molecules and cells* **20**, 173-182

Yang Y., Liu B., Dai J., Srivastava P. K., Zammit D. J., Lefrancois L., Li Z. (2007) Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* **26**, 215-226.

Yoshida H. (2007) ER stress and diseases *FEBS Journal* **274**, 630-658.

Yu C., Chen Y., Cline G. W., Zhang D., Zong H., Wang Y., Bergeron R., Kim J. K., Cushman S. W., Cooney G. J., Atcheson B., White M. F., Kraegen E. W., Shulman G. I. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem* **277**, 50230–50236.

Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J., Hansen L., Li Z. W., Karin M. and Shoelson S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673-1677.

Zhu J., Mohan C. (2010) Toll-Like Receptor Signaling Pathways-Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm* **2010**,781235.

Ziegler-Heitbrock H. W., Blumenstein M., Kafferlein E., Kieper D., Petersmann I., Endres S., Flegel W. A., Northoff H., Riethmuller G., Haas J. G. (1992) In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology* **75**, 264-268

*ANEXO I*

Andressa Coope dos Santos  
*Anexo I*



## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Cultura de monócitos humanos**

A linhagem celular de monócitos humanos THP-1 foi cultivada em placas de cultura contendo meio de cultura RPMI 1640, na presença de soro fetal bovino (FBS) 10 % em uma densidade final de  $1,0 \times 10^6$  células viáveis/ml, incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Os monócitos foram submetidos ao tratamento com LPS (0,5 µg/mL) ou outras concentrações mostrado de acordo com as figuras. A viabilidade e quantificação dos macrófagos foram realizadas em câmara de Neubauer após coloração com azul de Trypan. A expressão/ativação de proteínas envolvidas com ERE e TLR4 foi determinada por *Real-Time* PCR, *imunoblot*, ou citometria de fluxo. Para experimentos que se desejava avaliar a associação de proteínas foi utilizado o ensaio de imunoprecipitação de proteínas. A inibição farmacológica do ERE foi alcançada através da pré-incubação dos monócitos por 1 h a 37 °C com uma chaperona química (PBA) na concentração final de 3 mM, após esse período as células foram tratadas com LPS (0,5 µg/mL) por 24 h. Para experimentos em que se objetivou avaliar a inibição da sinalização do TLR4, as células foram incubadas com 2 µg/ml de anticorpo anti-CD14 (*The purified NA/LE mouse anti-human CD14, Catalog Number: 555395, BD Pharmingen™*) por 1 h, após esse período as células foram incubadas com LPS (0,5 µg/mL) por 24 h. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes.

## **Privação de glicose**

Os monócitos da linhagem THP-1 foram submetidos à privação de glicose para se aumentar a produção endógena de chaperonas segundo protocolo já estabelecido anteriormente (Lee, 2001). Neste ensaio, as células foram privadas de glicose por 6 h em meio RPMI sem glicose contendo 10 % de FBS, após esse período, a glicose foi restabelecida na concentração final de 11 mM. A avaliação da expressão das chaperonas e/ou a incubação com LPS foi realizado 24 h após o restabelecimento da glicose no meio.

## **RNA de interferência (siRNA)**

Para inibir a expressão das chaperonas GRP94 e GRP78 foi realizado silenciamento por siRNA. As células foram transfectadas com 50 nM de GRP78 siRNA (GRP78 siRNA, sc29338, Santa Cruz Biotechnology) ou com 80 nM de GRP94 siRNA (GRP94 siRNA, sc35523, Santa Cruz Biotechnology), conjugados com Lipofectamine™ 2000 por 7 h. Foram realizadas padronizações de tempo e dose ótimos de ação do siRNA. Os experimentos foram realizados de 35-60 h após a transfecção.

## **Citometria de fluxo**

Ao final do período de incubação com LPS, os monócitos foram obtidos, centrifugados a 800 rpm por 10 minutos a 37°C e ressuspendidos em tampão de PBS. Para a marcação com os anticorpos: F4/80, TLR4 e MD-2, as células não

foram submetidas a nenhum protocolo de permeabilização. Para a marcação das proteínas: GRP94, p-JNK, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$  e GRP78, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de saponina. Os anticorpos primários foram incubados por 15 min na concentração final de 2,5  $\mu$ g/mL, em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC na diluição final de 1:100. A análise de expressão das proteínas descritas acima, foi feita em um citômetro de fluxo, FACSCalibur, equipado com laser de argônio (10000 eventos/segundo), e a análise dos histogramas foi realizada com auxílio do software CellQuest (Becon-Dickinson, San Jose, CA, USA). As diferenças são mostradas como percentual de variação do controle.

### **Extração protéica**

Os monócitos foram obtidos e homogeneizado em aproximadamente 250  $\mu$ L de tampão de solubilização contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm a 4 °C em um rotor “Beckman 70,1”, por 30 minutos para remoção de material insolúvel. A proteína total do sobrenadante foi determinada por meio do método colorimétrico pela reação de Bradford (Bradford, 1976) com leitura 595 nm por ELISA. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de imunoprecipitação de proteínas (Velloso et al., 1993) e preparação de extrato total protéico (ET).

## **Imunoprecipitação**

Nos experimentos nos quais se desejava verificar a associação entre proteínas, foi empregado o método de imunoprecipitação. As amostras solubilizadas foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para imunoprecipitação. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (0,35 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4°C. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4°C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4°C/11.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-Hcl, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (Velloso et al., 1996). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 20 µl de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/l de DTT.

## **Imunoblot**

Após rápida fervura (5 min/100°C) dos extratos totais protéicos ressuspensos em tampão de Laemmli, as amostras tanto de imunoprecipitado quanto de ET (contendo 0,06 mg de proteínas) foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de

transferência durante 1:30 horas a 120 Volts em gelo. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com um anticorpo específico. A ligação do anticorpo às proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por 2 horas. A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimiluminescência utilizando um kit da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Após a revelação das auto-radiografias as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica (Velloso et al., 1996; Araujo et al., 2005).

### **Extração de RNA**

Foi feita extração de RNA total das células THP-1, segundo método do reagente *Trizol* (Invitrogen). Para a produção do cDNA, utilizamos o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), sendo a concentração final do cDNA de 3 µg para os experimentos subseqüentes. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

## Real Time PCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para o gene TLR4 utilizamos o *assay* TLR4: Hs\_00152939\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para o MD-2 utilizamos o *assay* LY96: Hs\_00209771\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para a chaperona GRP94 utilizamos o *assay* HSP90B1: Hs\_00427665\_g1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para a PERK utilizamos o *assay* EIF2AK3: Hs\_00178128\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para o ATF3 utilizamos o *assay* ATF3: Hs\_00231069\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para o ATF6 utilizamos o *assay* ATF6: Hs\_00232586\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para a Calreticulina utilizamos o *assay* CALR: Hs\_00189032\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para a Estaniocalcina 2 utilizamos o *assay* STC2: Hs\_00175027\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems), para o DNAJC3 utilizamos o *assay* DNAJC3: Hs\_00534483\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems). O gene GAPDH (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda GAPD está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto os *primers* para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, TLR4, HSP90B1, LY96, CALR, DNAJC3, ATF3, ATF6, STC2 e EIF2AK3,

com o controle endógeno GAPDH. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. A concentração de amostra validada como eficiente para os genes GAPDH, TLR4, HSP90B1, LY96, CALR, DNAJC3, ATF3, ATF6, STC2 e EIF2AK3 foi de 25 ng de cDNA.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de *Real-Time* PCR foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25  $\mu$ L de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625  $\mu$ L da solução de primers e sonda, 1,625  $\mu$ L de água e 4,0  $\mu$ L de cDNA (com a concentração final de 25 ng), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0  $\mu$ l de água ao invés do cDNA. A expressão gênica foi avaliada em células tratadas com LPS, além dos controles negativos e dos veículos. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores numéricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos de teste *post hoc* (Tukey). Em todos os experimentos o nível de significância foi  $p < 0,05$  e  $n \geq 5$ .

*ANEXO II*

Andressa Coope dos Santos  
*Anexo II*



ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 09, 2011

---

This is a License Agreement between Andressa Coope ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Andressa Coope
Customer address	472, Alzira de Aguiar Aranha street, Campinas, other 13084768
License number	2684821143185
License date	Jun 09, 2011
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Atherosclerosis
Licensed content title	Reduction of endoplasmic reticulum stress—A novel mechanism of action of statins in the protection against atherosclerosis
Licensed content author	Ikaro Breder, Andressa Coope, Ana Paula Arruda, Daniela Razolli, Marciane Milanski, Gabriel de Gabriel Dorighello, Helena C.F. de Oliveira, Lício A. Velloso
Licensed content date	September 2010
Licensed content volume number	212
Licensed content issue number	1
Number of pages	2
Start Page	30
End Page	31
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	A expressão deficiente das chaperonas GRP78 e GRP94 conecta a sinalização de TLR4 com o estresse de retículo endoplasmático.
Expected completion date	Jun 2011
Estimated size (number of pages)	100

---

Andressa Coope dos Santos

Anexo II



## Letter to the Editor

## Reduction of endoplasmic reticulum stress—A novel mechanism of action of statins in the protection against atherosclerosis

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Inflammation  
Macrophage  
Therapeutics  
Pravastatin  
Simvastatin

## ABSTRACT

Fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress has been recently described as a novel mechanism involved in the genesis of atherosclerosis. Here we show that statins, a class of drug widely employed in the clinical management of hypercholesterolemia, reduces lipid-induced macrophage endoplasmic reticulum stress in an isolated cell system and in LDL receptor knockout mice. Given the importance of endoplasmic reticulum stress as an inducer of inflammation, we suspect that the novel mechanism of action herein described for statins may play a major role on its beneficial effects in the prevention of cardiovascular disease.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Dear Editor,

In a recently published study [1], strong evidence was presented to support a role for endoplasmic reticulum stress (ER-stress) on the genesis of atherosclerosis. Accordingly, the chaperone  $\alpha$ 2 mediates lipid-induced ER-stress in macrophages and the inhibition of this protein by chemical or genetic approaches mitigates ER-stress and alleviates atherosclerosis.

In clinical practice, the HMG-CoA reductase inhibitors, statins, are widely used to control atherosclerosis providing up to 60% reduction in the number of cardiac events [2] and almost 20% reduction in the risk of stroke [3]. The inhibition of the first step of the cholesterol synthetic pathway is regarded as the main mechanism of action of the statins [4]. However, as the clinical use of statins leads to only 25–30% reduction of baseline LDL-cholesterol, it was predicted that other effects should contribute to the outstanding clinical outcomes provided by this class of drug. Indeed, a number of studies showed that besides its primary role on cholesterol lowering, statins reduced inflammation, increased plaque stability and improved endothelial function [5]. Nevertheless, the molecular mechanisms behind all these pleiotropic effects are not completely elucidated. Here we show that statins prevent fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress in a macrophage cell line and reduce ER-stress in activated macrophages present in the arterial walls of an animal model of atherosclerosis.

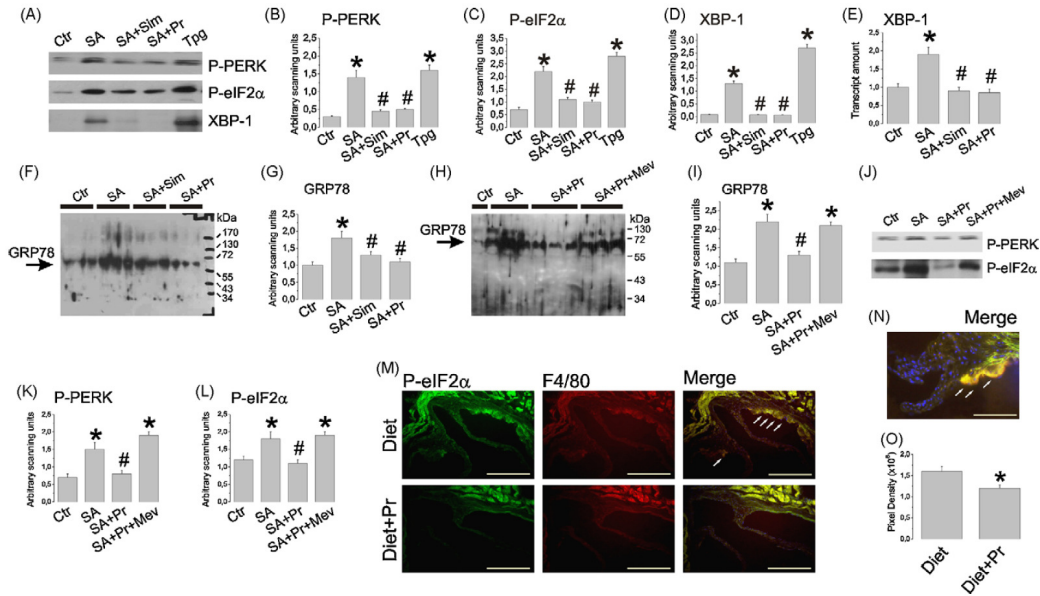
The treatment of the monocyte/macrophage cell line Thp-1 with long-chain saturated fatty acids, such as stearate (SA, Fig. 1) or palmitate (not shown), induce ER-stress as determined by the increased phosphorylation of the ER membrane kinase PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) (Fig. 1A, upper blot; and Fig. 1B) and its substrate, eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ) (Fig. 1A, blot in the middle; and Fig. 1C), the increased expres-

sion of the spliced form of the transcription factor XBP-1 (X-box binding protein-1) (Fig. 1A, lower blot; and Fig. 1D) and also of its precursor mRNA (Fig. 1E), and the increased expression of the chaperone GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein) (Fig. 1F and G). The treatment of the cells with either simvastatin (Sim) or pravastatin (Pr), significantly reduced the expression of all markers of ER-stress, independently of the pathway analyzed (Fig. 1A–G). The effect of the statins to inhibit ER-stress was apparently dependent on its control of HMG-CoA reductase activity because bypassing the inhibition of the enzyme with mevalonate hampered the inhibitory effect of pravastatin upon ER-stress (Fig. 1H–L). In addition, the treatment of an animal model of atherosclerosis, the LDL receptor deficient mouse, LDLR (–/–) [6], with pravastatin, significantly reduced the coexpression of P-eIF2 $\alpha$  with F4/80 in the arterial wall indicating a reduction of ER-stress in activated macrophages in a site of atherosclerotic plaque formation (Fig. 1M–O).

At least one previous study has shown that statins can induce some degree of activation of ER-stress in macrophages [7]. Indeed, in our hands, the treatment of naive Thp-1 cells with either simvastatin or pravastatin promoted a discrete, but significant increase in the activation of all markers of ER-stress analyzed (P-PERK, P-eIF2 $\alpha$ , XBP-1 and GRP78, not shown). However, once Thp-1 cells were chased with fatty acids, the level of expression of ER-stress markers increased outstandingly, an effect that was abrogated by the statins.

Interestingly, a recent study [8] showed that when ER-stress is induced in the heart by pressure overload, the beneficial effect of pravastatin on cardiac remodeling is accompanied by reduction of ER-stress, suggesting that statins can inhibit ER-stress in different clinical contexts and not only when induced by fatty acids.

Thus, inhibition of ER-stress in macrophages is yet another mechanism of action of this highly pleiotropic class of drug. As mevalonate overcame the effect of statins on ER-stress, it seems that, at least part of the anti-ER-stress action of statins depends on its classical mechanism of action.



**Fig. 1.** (A)–(L) Thp-1 cells were plated to confluence ( $10^7$  cells/plate) in RPMI and treated for 24 h either with vehicle (Ctr, ethanol to a final concentration of 0.05%), or stearic acid (SA, 100  $\mu$ M), or SA + simvastatin (SA + Sim, 100  $\mu$ M + 2  $\mu$ M, respectively), or SA + pravastatin (SA + Pr, 100  $\mu$ M + 2  $\mu$ M, respectively) or taspargin (Tpg, 2  $\mu$ M) or SA + Pr + mevalonate (SA + Pr + Mev, 100  $\mu$ M + 2  $\mu$ M + 100  $\mu$ M, respectively); phosphorylated forms of PERK (P-PERK) and eIF2 $\alpha$  (P-eIF2 $\alpha$ ), and spliced form of XBP-1 were determined by immunoblot of 40  $\mu$ g protein extracts separated by SDS-PAGE (A) and (J); quantification of specific protein bands are depicted in (B)–(D) for P-PERK, P-eIF2 $\alpha$  and XBP-1, respectively, and (K) and (L) for P-PERK and P-eIF2 $\alpha$ , respectively. The transcript amount of the spliced form of XBP-1 was determined by PCR (E). Expression of GRP78 was determined by immunoblot of 40  $\mu$ g protein extracts separated by SDS-PAGE (F) and (H) and quantifications of specific bands are depicted in (G) and (I). (M)–(O) LDL receptor knockout mice were treated for 10 days with a diet containing 40% fat (predominantly saturated fat from lard) (Diet) or with the same diet plus pravastatin (15 mg/kg day, Diet + Pr) for 10 days; at the end of the experimental period the aorta was obtained for immunofluorescence staining with anti-P-eIF2 $\alpha$  (green) and anti-F4/80 (red). Co-immunolocalizations (arrows) of P-eIF2 $\alpha$  and F4/80 are depicted in M, Merge, and in N, at higher magnification. Quantification of areas presenting double staining was performed by the Image-J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and results are depicted in O. In all experiments  $n = 6$ . In (B)–(E), (J), (I) and (K), (L), \* $p < 0.05$  vs. Ctr; # $p < 0.05$  vs. SA. In (O) \* $p < 0.05$  vs. Diet. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

#### Acknowledgements

The grants for this study were provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. The Laboratory of Cell Signaling belongs to the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Obesidade e Diabetes. We thank L.P. Manzo for editing the English grammar.

#### References

- [1] Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* 2009;15:1383–91.
- [2] Preiss D, Sattar N. Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: a review of the evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:815–28.
- [3] Amarenco P, Labreuche J. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol* 2009;8:453–63.
- [4] Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat Med* 2008;14:1050–2.
- [5] Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. *Atherosclerosis* 2009;203:325–30.
- [6] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993;92:883–93.
- [7] Chen JC, Wu ML, Huang KC, Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression. *Cardiovasc Res* 2008;80:138–50.
- [8] Zhao H, Liao Y, Minamino T, et al. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertens Res* 2008;31:1977–87.

Ikaro Breder<sup>1</sup>  
 Andressa Coope<sup>1</sup>  
 Ana Paula Arruda  
 Daniela Razolli  
 Marciane Milanski  
 Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas,  
 Brazil

Gabriel de Gabriel Dorighele  
 Helena C.F. de Oliveira  
 Department of Physiology and Biophysics, University  
 of Campinas, Brazil

Lício A. Velloso\*  
 Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas,  
 Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 35218022;  
 fax: +55 19 35218950.  
 E-mail address: lavelloso.unicamp@gmail.com  
 (L.A. Velloso)

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

25 February 2010  
 Available online 6 May 2010