PEDRO MANOEL MENDES DE MORAES VIEIRA

LEPTINA: UM MODULADOR CENTRAL DAS RESPOSTAS IMUNES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

PEDRO MANOEL MENDES DE MORAES VIEIRA

LEPTINA: UM MODULADOR CENTRAL DAS RESPOSTAS IMUNES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof[a]. Dr. Niels Olsen Câmara

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vieira, Pedro Manoel Mendes de Moraes.
Leptina:um modulador central das respostas imunes / Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunometabolismo.

Versão do título para o inglês: Leptin:a central modulator of immune responses

Descritores: 1. Leptina 2. Transplante de pele 3. Imunologia dos transplantes 4. Imunologia I. Câmara, Niels Olsen Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira.

Título da Tese: Leptina: um modulador central das respostas imunes.

Orientador(a): Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.08.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 118/07/CEEA datado de 06/12/07, por solicitação do Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Camara, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira** ao projeto de pesquisa *"Investigando o papel da heme-oxigenase 1 em diferentes processos inflamatórios renais em modelos animais"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 02 de março de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

A minha mãe, Cecília Mendes,
pelo amor e apoio incondicional

Agradecimentos

É impossível na vida trilharmos uma jornada, como um doutorado, sem que tenhamos o apoio, a amizade e a cumplicidade entre várias pessoas e que me ajudaram, e muito, no decorrer desse percurso, por isso, sinceramente, eu agradeço:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Niels Olsen, por toda a confianca depositada em mim, pelo seu incentivo e amizade. Você foi o grande responsável pelo meu amadurecimento científico e, apesar de ser carioca, espero sempre chegar próximo das suas expectativas.

Ao professor Terry Strom por ter me recebido em seu laboratório, pela excelente convivência e sua participação no projeto.

Ao professor Alexandre Basso que me ajudou muito no decorrer desse projeto, com inúmeras discussões, ideias e camundongos.

Aos professores Ronaldo Araujo, Ana Paula Lepique e Francisco Quintana pela ajuda no decorrer do projeto.

Aos professores do departamento de Imunologia.

À minha família pelo amor, incentivo e apoio, em especial a minha mãe Cecília.

À minha namorada e companheira nesses últimos 7 anos pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos do departamento e de cursão Lucas e Zé, pela convivência nesses anos, as inúmeras histórias e suas participações direta e indireta neste trabalho.

Aos amigos Ênio e Rafa, ambos essenciais para o desenrolar desse trabalho, com sugestões, experimentos, cervejadas...

Aos amigos do departamento, Alex Keller, Jean, Patrícia, Rodrigo, Isabela, Grazi, Bruna, Henrique, Thais, Juci, Simone, Vunvunzela, Josias, Angela, Paulo, Mari, Ana, Luizão, Lorena, Matheus, Esther, Jack, Érica, Gabi, Joilson, Francisco, Carina, Julia, Alexandra, Lucas da Alê, e todos os outros pelo convívio e amizade.

Aos amigos de laboratório, Mateus, Tarcio, Zidane, Carla, Candinho, Rosa, Gi, Mari, Ângela, Claudinha, Carol, Denis, Maristela, Richard, Reinaldo e todos os demais pelo convívio ao longo desse período.

Aos meus amigos fora laboratório, em especial a morena (Hernandez), pela amizade ao longo desses anos e a minha grande amiga Maisa em que trilhamos um baita caminho juntos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Men proposes,
God disposes
(Thomas a Kempis)

RESUMO

MORAES-VIEIRA, PM. **Leptina: um modulador central das respostas imunes**. 2011.143 f. Tese (Doutorado em Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A leptina é um mediador tanto de respostas neuroendócrinas como imunes, e tem sido associada a diversas autoimunidades. O nosso objetivo foi estudar a importância da leptina na modulação da resposta imunológica no transplante experimental, com especial atenção ao seu papel na plasticidade de linfócitos T e de células dendríticas (DC). Observamos que os animais deficientes em leptina têm uma sobrevida aumentada do enxerto de pele, uma menor porcentagem de células T $CD4^+$, $CD8^+$ e células T $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$. Uma maior frequência de células T reguladoras, de células Th2 e de células Th17 também foram encontradas. Observamos uma maior diferenciação de células T CD4 *naive* em células T reguladoras e Th17 tanto em condições de co-cultivo com DC como em condições livres de DC, na ausência de leptina. A deficiência de leptina acarretou em uma menor capacidade proliferativa de linfócitos T CD4 *in vivo*. A transferência de células T CD4 de animais deficientes em leptina, em seu receptor e de animais normais em animais $Rag^{-/-}$ transplantados mostrou que a sinalização via receptor de leptina é importante na resposta alogênica. Além disso, nossos dados indicam que a geração de DC derivadas de medula óssea, tanto imaturas como maduras, é comprometida na ausência de leptina. Essas células induziram uma menor proliferação de linfócitos $CD4^+$ e maior geração/expansão de células T $CD4^+Foxp3^+$, $CD4^+IL\text{-}17^+$ e $CD4^+IL\text{-}4^+$, tanto *in vitro* como *in vivo*. Nossos resultados indicam que a ausência de leptina resultou num predomínio de células T reguladoras e num padrão Th2 que, em conjunto com o perfil tolerogênico das DC, poderiam ser um dos mecanismos responsáveis pela resposta imune alogênica nos camundongos $Lep^{ob/ob}$.

Palavras-chave: Leptina. Célula T reguladora. Th17. Transplante. Célula dendrítica.

ABSTRACT

MORAES-VIEIRA, PM. **Leptin: a central modulator of imune responses**. 2011. 143 p. Thesis (Doctor in Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Leptin is a mediator of both neuroendocrine and immune responses and it has been associated with several autoimmune. Our goal was to study the importance of leptin in modulating the alloimmune response and its role in T cell plasticity. We observed that leptin deficient animals have an increased skin graft survival, lower percentages of $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+$IFN-γ^+ T cells and a higher frequency of regulatory T cells ($CD4^+Foxp3^+$), Th2 cells ($CD4^+$GATA-3^+ and $CD4^+$IL-4^+) and Th17 cells. A higher genratiom of both regulatory and Th17 T cells from *naïve* precursors was observed in the absence of leptin, both in dendritic cells co-culture and dendritic cells-free. The deficiency of leptin signaling led to a lower proliferative fitness of $CD4^+$ T lymphocytes *in vivo*. The transfer of $CD4^+$ T cells from leptin deficient, leptin receptor deficient and normal mice into $Rag^{-/-}$ transplant recipients showed that leptin receptor signaling pathway was important in allogeneic response. Furthermore, our data showed that the generation of immature and mature bone marrow derived dendritic cells was compromised in the absence of leptin. These cells induced a lower $CD4^+$ T lymphocyte proliferation and increased ability to induce the generation/expansion of $CD4^+Foxp3^+$, $CD4^+$IL-17^+ and $CD4^+$IL-4^+ T cells, both *in vitro* and *in vivo*. Our results indicated that the lack of leptin resulted in higher frequency of regulatory T cells and a Th2 immune response deviation, which together with a tolerogenic dendritic cells profile could account for the mechanisms involved in the $Lep^{ob/ob}$ mice graft immune response.

Key words: Leptin. Regulatory T cell. Th17. Transplantation. Dendritic cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Via de sinalização desencadeada pela ligação da leptina ao seu receptor e possíveis alvos de STAT-3 ativada pela ligação da leptina ao seu receptor (ObRb) em linfócitos T.	9
Figura 2.	Purificação de células T CD4 naives por citometria de fluxo.	47
Figura 3.	Sobrevida do enxerto de pele e citocinas presentes no soro..	60
Figura 4.	Frequência de células $CD4^+$ e $CD8^+$ e $CD11c^+$, no linfonodo drenante de animais transplantados, 7 dias após o transplante.	61
Figura 5.	Reação linfocitária mista. Células esplênicas irradiadas de camundongos CBA foram incubadas com esplenócitos de camundongos C57BL/6 normais (WT) ou deficientes em leptina ($Lep^{ob/ob}$).	62
Figura 6.	Frequência de células T reguladoras no linfonodo drenante, 7 dias após o transplante	63
Figura 7.	Análise da produção de IFN-g, IL17, IL-4 e IL-10 no linfonodo drenante de animais enxertados, 7 dias após o transplante de pele, por citometria de fluxo.	64
Figura 8.	Relação entre células T $CD4^+$ produtoras de IFN-g e de IL-4 e detecção intracelular de GATA-3 em células T $CD4^+$.	64
Figura 9.	Marcação intracitoplasmática para detecção de CTLA-4 em células T reguladoras.	65
Figura 10.	Análise da expressão de CTLA-4 em células T $CD4^+Foxp3^-$.	66
Figura 11.	Expressão gênica de Foxp3 no enxerto de pele, 10 dias após o transplante.	67
Figura 12.	Análise da expressão do receptor de leptina em leucócitos.	68
Figura 13.	Análise da via de sinalização Leptina/STAT3 em células esplênicas.	68
Figura 14.	Geração de células T reguladoras.	69
Figura 15.	Geração de células Th17.	71
Figura 16.	Proliferação homeostática competitiva.	73
Figura 17.	Sobrevida do enxerto de pele em animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos com células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ e WT.	74
Figura 18.	Protocolo de geração de células dendríticas derivadas de medula óssea.	76
Figura	Avaliação da eficiência de geração de células dendríticas derivadas de	77

19.	medula óssea.	
Figura 20.	Avaliação da expressão genes relacionados com apresentação de antígeno e com a função de células dendríticas.	78
Figura 21.	Avaliação da expressão de moléculas de coestimulação e de MHC II em células dendríticas derivadas de medula óssea.	79
Figura 22.	Produção de citocinas, moléculas imunoreguladoras e TGF-b por BMDC.	80
Figura 23.	Ensaio de proliferação com mDC derivadas da medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e selvagens (WT).	81
Figura 24.	Avaliação da expressão de moléculas de coestimulação e de MHC II em células dendríticas derivadas de medula óssea.	83
Figura 25.	Geração de células T reguladoras por iDC derivadas de medula óssea.	85
Figura 26.	Avaliação da expansão de células T reguladoras pelas BMDC.	86
Figura 27.	Avaliação da ação do TGF-β na expansão de células T reguladoras pelas BMDC.	87
Figura 28.	Avaliação da capacidade de células $CD11c^{+}$ esplênicas na geração de células T reguladoras.	88
Figura 29.	Geração de células Th17 por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas de medula óssea.	89
Figura 30.	Expressão gênica de fatores de transcrição e da produção das citocinas IFN-g e IL-17 por células Th17 polarizadas.	90
Figura 31.	Geração de células Th17 por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas de medula óssea.	91
Figura 32.	Geração de células Th17 por mDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT.	92
Figura 33.	Geração de células Th1 e Th2 por iDCs de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT derivadas de medula óssea.	93
Figura 34.	Geração de células T reguladoras e Th17 por iDC derivadas de medula óssea.	94
Figura 35.	Análise da expressão de Foxp3 em células T $CD4^{+}FR\text{-}4^{+}CD25^{+}$ e da freqüência de células T $CD4^{+}$ de memória produtoras de IL-17.	96
Figura 36.	A leptina modula, in vivo, a frequência de células $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$, $CD11c^{+}$ e T reguladoras.	97
Figura 37.	A leptina modula, in vivo, a frequência de células $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ e T reguladoras de forma antígeno específico.	98
Figura 38.	Reação de hipersensibilidade do tipo tardio, DTH.	99

Figura 39.	Indução de EAE em animais normais e deficientes em leptina.	99
Figura 40.	Avaliação das vias de sinalização STAT3 e Akt na modulação do fenótipo de células dendríticas derivadas da medula óssea de animais WT.	101
Figura 41.	Geração de células T reguladoras por iDC derivadas de medula óssea tratadas com inibidores de STAT3 e Akt.	102
Figura 42.	Avaliação da expressão genes relacionados com a via de sinalização mTOR em células dendríticas imaturas derivadas de medula óssea.	104
Figura 43.	Avaliação, por agrupamento, da expressão genes relacionados com a via de sinalização mTOR em células dendríticas imaturas derivadas de medula óssea.	105
Figura 44.	Avaliação da via de sinalização mTOR em células dendríticas imaturas, derivadas de medula óssea.	106
Figura 45.	Produção intracelular de IL-12 por células dendríticas derivadas de medula óssea tratadas com Rapamicina.	107
Figura 46.	Sobrevida do enxerto de pele em animais tratados com rapamicina.	108
Figura 47.	Modelo da regulação da resposta aloimune em animais $Lep^{ob/ob}$ e WT.	125

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BMDC	Célula dendrítica derivada de medula óssea
CART	*"Coccaine and amphetamine-regulated transcript"*
CFA	Adjuvante completo de Freund
CTLA-4	*"Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4"*
DC	Célula dendrítica
dLN	Linfonodo drenante
DTH	Reação de hipersensibilidade do tipo tardio
EAE	Encefalite autoimune experimental
FCS	Soro fetal bovino
Foxp3	*"Forkhead Box P3"*
FSC	*"Forward scatter"*
GM-CSF	*"Granulocyte-monocyte colony-stimulating fator"*
H&E	Hematoxilina e Eiosina
IDO	*"Idoleamina 2,3-deoxygenase"*
IA^b	Marcados para a expressão de classe II em monócitos
iDC	Célula dendrítica imatura
IFN-γ	Interferon-γ
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12 (p40)	Subunidade p40 da interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
i.p.	Intraperitoneal
KO	*"knockdown"*ou deficnente
$Lep^{ob/ob}$	Camudongo deficiente em leptina
$Lep^{db/db}$	Camundongo deficiente no receptor de leptina
LN	Linfonodo
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	*"Monocyte chemoattractant protein-1"*
mDC	Célula dendrítica madura
MHCII	Complexo principal de histocompatibilidade II
MLR	Reação linfocitária mista
NFκB	Fator nuclear κB
MOG	*"Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein"*
NK	*"Natural killer"*
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR*b*	Forma longa do receptor de leptina
PBS	Solução salina de tampão fosfato

POMC	*"Pro-opiomelanocortin*
RAG	*Recombination activating gene*
TGF-β	*"Transforming groth fator β "*
Th1	Célula T auxiliar tipo I
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
Th17	Célula T auxiliar tipo 17
Rlep	Leptina recombinante
RORC	*"Related orphan receptor gene"*
RORγT	*"Related orphan receptor γ"*
SSC	*"Side scatter"*
STAT	*"Signal transducer and activator of transcription"*
Treg	Célula T reguladora
TNF	Fator de necrose tumoral
WT	*"Wild Type"*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 LEPTINA 17
1.2 LEPTINA E O CONTROLE DA FOME 20
1.3 LEPTINA E O SISTEMA IMUNE 21
1.4 LEPTINA E IMUNIDADE INATA 22
1.5 LEPTINA E IMUNIDADE ADAPTATIVA 24
1.6 LEPTINA, CÉLULAS T REGULADORAS E TH17 25
1.7 mTOR, LEPTINA E SISTEMA IMUNE 30
1.8 TRANSPLANTE 34
2 JUSTIFICATIVA 37
3 OBJETIVOS 38
3.1 OBJETIVO GERAL 38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 38
4 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 ANIMAIS 40
4.2 TRANSPLANTE DE PELE 40
4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS TRANSPLANTADOS COM RAPAMICINA 41
4.4 IMUNIZAÇÃO PARA INDUÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO (DTH) 41
4.4.1 *IMUNIZAÇÃO* 42
4.4.2 *DTH* 42
4.5 INDUÇÃO DE EAE E AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA 42
4.6 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E PRESENTES NOS LINFONODOS 43
4.7 ANÁLISE DE LINFÓCITOS T CD4+ DE ANIMAIS 2D2 ANTÍGENO ESPECÍFICOS 43
4.8 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T POR ESFERAS MAGNÉTICAS 44
4.9 GERAÇÃO, *IN VITRO*, DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA 44
4.10 PCR EM TEMPO REAL *ARRAY* 45
4.11 PURIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO 46
4.12 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO 47
4.13 CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS – REAÇÃO LINFOCITÁRIA MISTA (MLR) 48
4.15 PCR EM TEMPO REAL 49
4.16 CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO 51
4.17 CITOMETRIA DE FLUXO - MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE 51
4.18 CITOMETRIA DE FLUXO - DETECÇÃO INTRACELULAR DE FOXP3, DE CTLA-4 E DE GATA-3 52
4.19 CITOMETRIA DE FLUXO - DETECÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS 52

4.20 AVALIAÇÃO DA VIA LEPTINA/STAT3 – *PHOSFLOW* 53
4.21 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR BIOPLEX.. 54
4.22 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TGF-β 55
4.23 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DE TGF-B DURANTE O CO-CULTIVO DE BMDC E CÉLULAS T $CD4^+CD62L^+$ 55
4.24 TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS T $CD4^+$ EM ANIMAIS $RAG^{-/-}$ TRANSPLANTADOS 55
4.25 PROLIFERAÇÃO HOMEOSTÁTICA COMPETITIVA DE CÉLULAS T $CD4^+$ DE ANIMAIS WT, $LEP^{OB/OB}$ E $LEP^{DB/DB}$ EM ANIMAIS $RAG^{-/-}$ 56
4.26 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DE LISADOS DE CULTURA DE BMDC 56
4.27 *WESTERN BLOTTING* 57
4.28 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 58
5 RESULTADOS 59
5.1 A LEPTINA MODIFICA A RESPOSTA IMUNE AO TRANSPLANTE E CONTRIBUI PARA UMA MAIOR SOBREVIDA DO ENXERTO 59
5.2 A LEPTINA DESEMPENHA UMA PAPEL CENTRAL NA MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE DE CÉLULAS T $CD4^+$ 67
5.3 A LEPTINA MODIFICA FENOTIPICAMENTE E FUNCIONALMENTE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS 75
5.4 BMDC DE ANIMAIS $LEP^{OB/OB}$ MODULAM DIFERENCIALMENTE A GERAÇÃO E A EXPANSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS 83
5.5 BMDC DE ANIMAIS $LEP^{OB/OB}$ MODULAM A PLASTICIDADE DE CELULAS T $CD4^+$ 88
5.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DEFICIENES EM LEPTINA MODULAM A GERAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS E TH17 93
5.7 A LEPTINA, *IN VIVO*, MODULA CÉLULAS T CD4 PRODUTORAS DE IL-17, CÉLULAS T REGULADORAS E AUMENTA A DTH 95
5.8 CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA NA AUSÊNCIA DE LEPTINA APRESENTAM UMA ATIVAÇÃO DIFERENCIADA DE mTOR E SÃO RESISTENTES AO TRATAMENTO COM RAPAMICINA 100
6 DISCUSSÃO 109
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 124
8 CONCLUSÕES 126
REFERÊNCIA 127
ANEXO 143

1 INTRODUÇÃO

Inicialmente considerado como um tecido inerte e com função de armazenamento de energia, o tecido adiposo tem se mostrado importante na regulação de diversos processos patológicos e fisiológicos.

A obesidade, um dos problemas mais comuns de saúde pública nos dias atuais, é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas patologias, como arteriosclerose, diabetes e síndrome metabólica (Djiane e Attig, 2008; Feuerer et al., 2009). Além da associação entre a obesidade e algumas doenças, interações importantes existem entre o metabolismo e o sistema imune, sendo essas interações orquestradas por uma complexa rede de fatores solúveis derivados tanto de células do sistema imune como do tecido adiposo.

A obesidade está associada a um estado pró-inflamatório sendo que alguns marcadores de inflamação mostram-se elevados em indivíduos obesos (Posey et al., 2008). Dentre esses fatores, destacam-se algumas adipocinas que contribuem para um estado de leve inflamação em indivíduos obesos, como leptina, IL-6 e TNF (Bastard et al., 2006). O termo adipocina é usado para descrever uma citocina produzida principalmente por adipócitos (Maclaren, Cui e Cianflone, 2008). As adipocinas, além de serem produzidas pelos adipócitos, são moduladas e produzidas por macrófagos infiltrantes (Li et al., 2007). Dentre as adipocinas, a leptina tem despertado grande interesse pela comunidade científica devido a sua capacidade de modular tanto o metabolismo e o consumo alimentar como o sistema imunológico.

1.1 LEPTINA

Em meados da década de 50, Gordon Kennedy foi o primeiro a propor que fatores circulantes gerados proporcionalmente à quantidade de depósitos de gordura influenciavam o consumo de alimentos e o gasto energético de forma a regularem o peso corpóreo (Kennedy, 1953). Contudo, apenas em meados da década de 90, a

leptina foi descrita por Zhang e colaboradores (Zhang et al., 1994) e seu estudo se iniciou de fato, com a descrição de dois modelos de camundongos, um deles obeso (*ob*) e o outro diabético (*db*) (Flier, 1995; Friedman e Halaas, 1998). Mutações em homozigose nesses *locus* (*ob*/*ob* e *db*/*db*) causam hiperfagia e diminuição da taxa metabólica. Embora estudos genéticos tenham mapeado esses genes em *loci* diferentes (Chung et al., 1996; Geffroy et al., 1995; Isse et al., 1995), sua correlação foi sugerida por estudos de parabiose. Nesses estudos, a parabiose de animais *ob*/*ob* tanto com animais selvagens como *db*/*db* acabavam com o fenótipo observado em animais *ob*/*ob*, sugerindo que o produto do gene *ob* era um fator circulante encontrado em animais selvagens e *db*/*db* (Coleman, 1973; Coleman e Hummel, 1969). Esses autores observaram que, ao contrário do observado para os animais *ob*/*ob*, os animais *db*/*db* não tinham seu fenótipo revertido, sugerindo que os animais *db*/*db*, apesar de possuírem esse fator, eram insensíveis a ele. Isso levou a suposição de que o receptor do gene *ob* não era funcional no animal *db*/*db*.

A hipótese levantada por esses experimentos clássicos foi confirmada quando o gene *ob* foi clonado e seu produto identificado como sendo a leptina (Flier, 1995; Friedman e Halaas, 1998). Logo após a clonagem e identificação do produto do gene *ob*, o receptor da leptina foi clonado (Tartaglia et al., 1995). Após a clonagem do gene deste receptor, observou-se que o gene responsável por sua transcrição possuía uma mutação no animal *db*/*db* (Chua et al., 1996).

Os receptores de leptina são produtos de um único gene denominado de *lepr* (do inglês; *leptin receptor*) e existem sob várias formas resultantes de *splicing* alternativo e clivagens proteolíticas (Chua et al., 1997). Os receptores de leptina podem ser subdivididos em três categorias: forma secretada, forma curta e forma longa (Chua et al., 1997; Tartaglia, 1997). Enquanto que as funções dos receptores de leptina de forma curta não são bem conhecidas, a forma longa, ObRb, é fundamental para a função da leptina. O ObRb é um receptor que ativa Jaks quinases induzindo a fosforilação e ativação de STAT3 (do inglês; *signal transducer and activator of transcription 3*) (Baumann et al., 1996) (Figura 1).

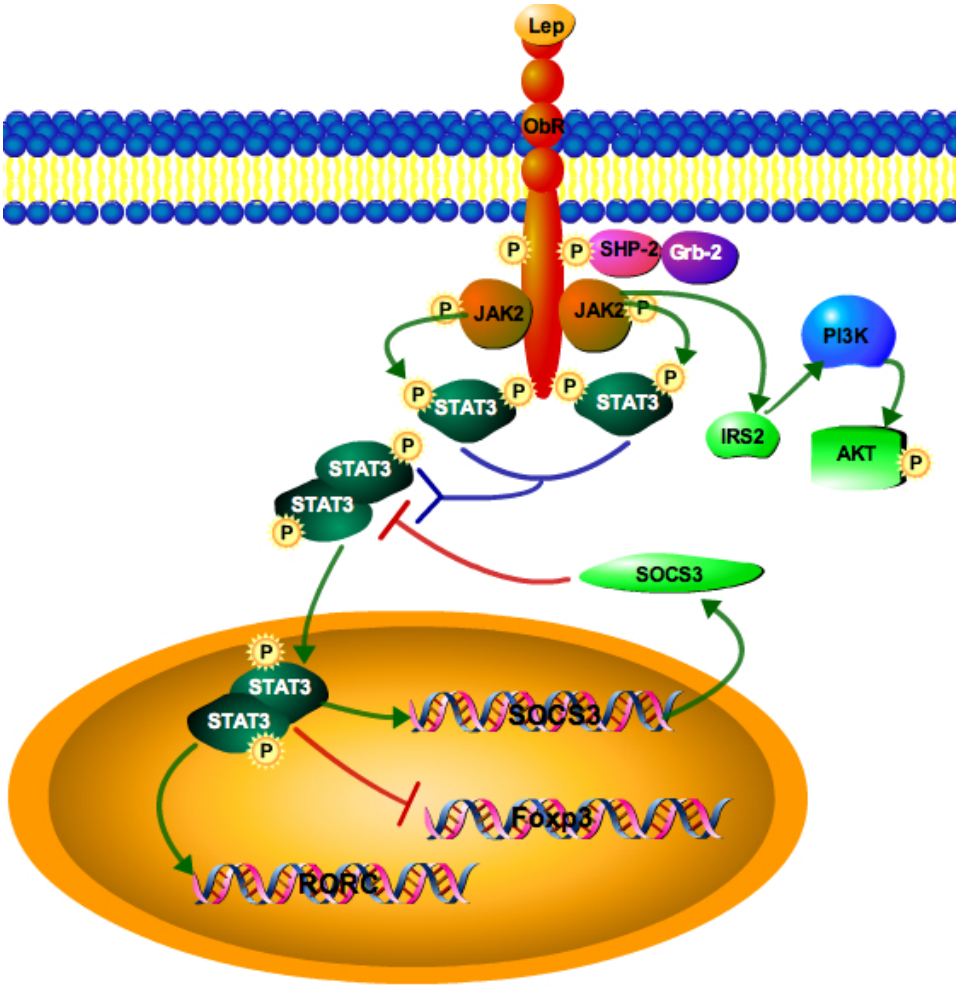

Figura 1. Via de sinalização desencadeada pela ligação da leptina ao seu receptor e possíveis alvos de STAT-3 ativada pela ligação da leptina ao seu receptor (ObRb) em linfócitos T. A ligação da leptina ao seu receptor induz o recrutamento de SHP-2 (do inglês, *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*) e Jak2 (Janus quinase 2). A Jak2 é fosforilada e recruta e fosforila STAT-3. O homodímero de STAT-3 migra para o núcleo e promove a transcrição de genes alvo. A SHP-2 quando recrutada e ativada liga-se a Jak2 que também recruta e ativa IRS2, levando a ativação da via PI3K/Akt (do inglês, *Phosphatidylinositol 3-kinases/Protein kinaes B* – PTB). A via PI3K/Akt culmina com a ativação do complexo mTor (do inglês, *mammalian target of rapamycin*). A ativação via receptor de leptina também induz a transcrição, por regulação negativa, de SOCS3 (do inglês, *suppressor of cytokine signaling 3*) que promove a inibição da fosforilação de STAT-3. Foxp3 - *forkhead box P3*; RORC - *retinoid-related orphan receptor gamma*, codifica a proteina RORγT.

Após esses estudos iniciais, sabe-se, hoje, que a leptina é um hormônio peptídico, não glicosilado, pertencente a classe I da superfamília das citocinas, sintetizado principalmente por adipócitos e que, via sua ação no hipotálamo, regula o apetite e o gasto energético (Halaas et al., 1995). Níveis circulantes de leptina correlacionam-se diretamente com a quantidade de tecido adiposo (Considine et al.,

1996). A leptina é uma citocina com características hormonais e funções pleiotrópicas (Lago et al., 2007).

1.2 LEPTINA E O CONTROLE DA FOME

Especulações filosóficas antigas sugeriam que o instinto de sentir fome que controlava o consumo de alimento se originava na cavidade abdominal uma vez que esse canal alimentar tornava-se vazio. Hipóteses mais específicas foram feitas por Galen (A.D. 138-201), o qual descreveu o estômago como o responsável pelo controle do apetite, conforme referenciado por Meyer e colaboradores (Mayer e Thomas, 1967). Essas idéias perpetuaram até o fisiologista Haller escrever, em 1901, pela primeira vez, sobre o instinto de sentir fome e sede como sendo uma dor intolerável devido ao estômago vazio, conforme também referenciado por Mayer e Thomas (Mayer e Thomas, 1967).

Ainda, o hipotálamo foi inicialmente implicado no controle do consumo alimentar e obesidade pela primeira descrição clínica de que uma lesão no eixo hipotálamo-pituitária resultou em obesidade, há mais de 170 anos por Bernhard Mohr (Brobeck, 1946). Na virada do século passado, Joseph Babinski e Alfred Frolich também descreveram que uma condição de obesidade e desenvolvimento sexual retardado era atribuído a lesão neste eixo (Williams e Elmquist, 2011). Posteriormente, Camus e Roussey em 1913, e, Bailey e Bremer em 1921, sugeriram que obesidade extrema em pacientes com a síndrome de *Frohlich* (também conhecida como distrofia adiposo-genital) era devido a lesões hipotalâmicas, conforme referenciado por Brooks (Brooks, 1988). Embora esses achados indicassem o hipotálamo como centro controlador do consumo de alimentos, somente na década de 40, Hetherington e Ranson descreveram que lesões hipotalâmicas no núcleo paraventricular levavam a obesidade (Brooks, 1988). Anand e colaboradores denominaram esse efeito de síndrome de hiperfagia hipotalâmica (Anand e Brobeck, 1952; Anand e Brobeck, 1951).

Nos dias atuais, sabe-se que a leptina diminui o consumo de alimento e aumenta o gasto energético por meio da sua ação no hipotálamo (Boguszewski, Paz-Filho e Velloso, 2010). O núcleo arqueado hipotalâmico é o principal sítio de sinalização da leptina e, consequentemente, da resistência a leptina (Mercer et al., 1996a; Mercer et al., 1996b; Velloso, Araujo e De Souza, 2008). No núcleo arqueado hipotalâmico, existem duas populações de neurônios responsivos a leptina (Cone, 2005). A primeira população neuronal expressa dois potentes peptídeos estimuladores do apetite (orexigeno), o AgRP (do inglês; *agonist Agouti-related peptide*) e o Neuropeptídeo Y (NPY). A segunda classe de neurônios expressa o peptídeo POMC (do inglês, *pro-opiomelanocortin*) e transcritos regulados pela anfetamina e cocaína (CART; do inglês, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) (Flier, 2004). Esses neurônios se projetam para neurônios tidos como de "segunda ordem" localizados no núcleo paraventricular.

A leptina inibe os neurônios NPY/AgRP e o déficit energético aumenta significantemente a expressão de NPY e AgRP, os quais estimulam o comportamento alimentar (Coll, Farooqi e O'rahilly, 2007). Em contrapartida aos neurônios NPY/AgRP, os neurônios POMC/CART são estimulados pela leptina e o déficit energético diminui a expressão de POMC (Lopez, Lelliott e Vidal-Puig, 2007). Embora a deficiência em CART não pareça influenciar o balanço energético, peptídeos POMC desempenham um papel central no comportamento alimentar em humanos e em camundongos, sendo sua deficiência relacionada a hiperfagia e obesidade (Coll, Farooqi e O'rahilly, 2007).

1.3 LEPTINA E O SISTEMA IMUNE

A leptina, devido a sua ação na regulação do metabolismo, é um mediador tanto de respostas neuroendócrinas como imunes (Guzik et al., 2007). No sistema imune, a ausência da leptina ou a incapacidade dessa adipocina em sinalizar via seu receptor provoca diversas alterações no sistema imunológico. Animais $Lep^{db/db}$ (Chua

et al., 1996) possuem atrofia tímica e animais $Lep^{ob/ob}$ possuem tendência a se tornarem imunodeficientes por apresentarem respostas de células B e células T comprometidas em diferentes modelos, como na artrite autoimune experimental e EAE (encefalomielite autoimune experimental, do inglês: *experimental autoimmune encephalomuelitis*) (Busso et al., 2002; De Rosa et al., 2006; Howard et al., 1999; Lord et al., 1998), com mecanismos ainda não completamente compreendidos. Algumas ações da leptina no sistema imune incluem a modulação de monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK (do inglês; *natural killer*), células dendríticas e linfócitos (Busso et al., 2002; Dovio et al., 2004; Fujita et al., 2002; Li et al., 2007; Macia et al., 2006). A leptina pode induzir a ativação de células T e modificar o equilíbrio entre as células produtoras de citocinas de perfil Th1 e Th2, favorecendo a produção de citocinas do padrão Th1, mostrando um papel pró-inflamatório da leptina (Busso et al., 2002). A leptina é produzida por células inflamatórias e a transcrição e tradução do gene da leptina são aumentadas por estímulos inflamatórios como o lipopolissacarídeo (LPS), a IL-1β e a IL-6 (Landman et al., 2003; Sarraf et al., 1997).

1.4 LEPTINA E IMUNIDADE INATA

Na imunidade inata, a leptina parece atuar na ativação de monócitos e macrófagos, favorecendo sua função fagocítica e a secreção de leucotrieno B4, cicloxigenase, oxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1β (Mancuso et al., 2002; Zarkesh-Esfahani et al., 2001). Nos neutrófilos, a leptina induz quimiotaxia e liberação de radicais de oxigênio, sendo que em humanos esses efeitos parecem ser indiretos via a produção de TNF pelos macrófagos (Caldefie-Chezet et al., 2001; Caldefie-Chezet, Poulin e Vasson, 2003; Zarkesh-Esfahani et al., 2004). Além disso, animais obesos apresentam uma resposta inflamatória prolongada e aumentada na peritonite induzida por zimozan, caracterizada por elevados níveis de IL-6 (Pini et al., 2008). Também foi relatado, por esses mesmos pesquisadores, no

mesmo modelo, um maior infiltrado neutrofílico nos animais obesos, deficientes em leptina, e maior produção IL-17 na cavidade peritoneal, sendo os neutrófilos os principais produtores de IL-17. Essa produção de IL-17 contribui para o processo inflamatório, sendo inibida pela adição de leptina recombinante em animais $Lep^{ob/ob}$ (Pini e Fantuzzi, 2010).

Nas células NK, a leptina afeta a sua ativação e desenvolvimento, tanto *in vitro* como *in vivo* (Tian et al., 2002; Zhao et al., 2003). Como as células NK expressam ObRb e camundongos $Lep^{db/db}$ possuem um déficit de células NK é provável que a leptina influencie tanto o desenvolvimento como a manutenção dessas células, *in vivo*. Um importante papel de ObRb nas células NK é promover sua função citotóxica via a ativação de STAT3, além da transcrição de IL-2 e perforinas (Siegmund et al., 2002; Tian et al., 2002; Zhao et al., 2003).

Outra população celular de grande importância na regulação da resposta imune, que também tem a sua função modulada pela leptina, são as células dendríticas (DC; do inglês, *dendritic cell*). Dois trabalhos, um utilizando animais $Lep^{ob/ob}$ e outro animais $Lep^{db/db}$, relataram diferentes resultados em relação a ação da leptina na modulação de DC obtidas de medula óssea (Lam et al., 2006; Macia et a*l.*, 2006) . Macia e colaboradores, usando medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ mostraram que não havia diferenças fenotípicas entre DC de animais $Lep^{ob/ob}$ comparativamente a animais selvagens (Macia et al., 2006). Em contrapartida, Lam e colaboradores descreveram que DC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ apresentavam menor expressão de moléculas coestimuladoras comparativamente a animais selvagens (Lam et al., 2006).

Outros dados foram encontrados em relação à ação da leptina nas DCs. Conforme descrito, apesar das DCs de animais $Lep^{ob/ob}$ apresentarem características fenotípicas normais, essas DCs eram menos potentes na indução de proliferação alogênica de células T e animais $Lep^{ob/ob}$ tinham um número diminuído de DC da epiderme, as células de Langerhans, sendo essa quantidade restaurada pela administração de leptina exógena (Macia et al., 2006). Esse estudo, apesar de

sugerir, não atribuiu um efeito direto da leptina nas DC. Posteriormente, observou-se que o receptor da leptina, ObRb, era expresso em DC e que as originadas da medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ tinham reduzida sobrevivência e maturação (Lam et al., 2006).

1.5 LEPTINA E IMUNIDADE ADAPTATIVA

Na imunidade adaptativa, a influência da leptina tem sido mais estudada nas células T $CD4^+$. A leptina aumenta a ativação de células T $CD4^+$ e sua migração para sítios de inflamação, possivelmente devido a um aumento na expressão de moléculas de adesão, como ICAM (do inglês, *intercellular adhension molecules*) e VLA2 (do inglês, *very late antigen 2*) em resposta ao IFNγ (Lord et al., 1998).

A privação de energia em camundongos $Lep^{ob/ob}$ causa uma diminuição da concentração sérica da leptina que é acompanhada por uma redução nas reações de hipersensibilidade do tipo tardia e atrofia tímica, as quais são revertidas pela administração de leptina (Howard et al., 1999; Lord et al., 2001). Observou-se, posteriormente, que a leptina inibe a atrofia tímica possivelmente por inibir a apoptose de timócitos independentemente da via JAK-2 e dependentemente das vias IRS-1 e PI3K (Mansour et al., 2006).

Animais $Lep^{ob/ob}$ secretam menos IL-2, IFNγ, TNF e IL-18 e mais IL-4 e IL10, após estímulo mitogênico, fator que pode levar esses animais a serem resistentes a algumas doenças autoimunes induzidas experimentalmente (Busso et al., 2002; Faggioni et al., 2000), como a EAE (Matarese et al., 2001a), o diabetes do tipo 1 (Wang et al., 2010) e a artrite induzida por antígeno (Ozata, Ozdemir e Licinio, 1999), embora atualmente sabe-se que as células Th17 desempenham um papel central nessas doenças autoimunes, conforme será descrito posteriormente.

Apesar da leptina ser tida como uma adipocina que favoreça um perfil Th1 e, sua ausência a uma mudança para um perfil Th2, recentemente foi investigado, de fato, o papel da leptina na polarização Th1 *versus* Th2 (Batra et al., 2010). Batra e

colaboradores descreveram que a presença de leptina induzia um aumento na produção de IFN-γ durante a polarização Th1 e, durante a polarização Th2, suprimia a produção de IL-4. Apesar desses dados obtidos com experimentos *in vitro*, a ausência de leptina em animais $Lep^{ob/ob}$ induziu proteção tanto da inflamação intestinal mediada por células Th1 como por células Th2 (Batra et al., 2010).

1.6 LEPTINA, CÉLULAS T REGULADORAS E TH17

O paradigma entre as células Th1/Th2 forneceu uma importante descrição a respeito da regulação mútua entre esses dois subtipos celulares no sistema imune, contudo existem muitos dados que não podem ser explicados por essa relação. A descoberta das células Th17 e sua participação nas doenças autoimunes foi um importante fator na quebra desse paradigma.

As células Th1 foram implicadas na patogênese de muitas doenças autoimunes, como esclerose múltipla e artrite reumatóide. Entretanto, resultados obtidos com a neutralização da IL-12 e do IFN-γ ou mesmo com o uso de animais *knockouts* para essas citocinas mostraram diferentes efeitos na indução de EAE, modelo animal para a doença humana esclerose múltipla (Cua et al., 2003). Foi mostrado que animais *knockouts* para a subunidade p40 da IL-12 eram resistentes ao desenvolvimento da EAE, enquanto que animais *knockouts* de IFN-γ eram mais sensíveis. A identificação da IL-23, que é constituída pela subunidade p40 da IL-12 em conjunto com a cadeia p19, levou a vários questionamentos a respeito do papel da IL-12, IL-23 e das células Th1 no desenvolvimento da EAE (Cua et al., 2003). Foi verificado, posteriormente, que a IL-23 desempenha um papel central na indução da EAE e, devido à relação entre a IL-23 e a expressão de IL-17, uma nova linhagem de célula T foi identificada, a Th17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005).

As células Th17 são distintas das células Th1 e Th2 baseada na evidência de que as células Th17 não produzem as citocinas clássicas de um perfil Th1 ou Th2 e expressam níveis baixos de T-bet (fator de transcrição de células Th1) e GATA-3

(fator de transcrição de células Th2) (Zhou e Littman, 2009). Outro ponto é as citocinas IL-4 e IFN-γ suprimirem a diferenciação de células Th17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Seguindo-se esses estudos iniciais, o fator de transcrição RORγT (do inglês, *Related Orphan Receptor γ*) foi identificado como regulador de células Th17 (Ivanov et al., 2006).

As células Th17 são inibidas por IFN-γ e IL-27, citocinas secretadas por células Th1, e atuam como mediadoras do recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação, sendo dependentes de IL-23 para sua sobrevivência e manutenção (Ivanov, Zhou e Littman, 2007; Mcgeachy e Cua, 2008). Apesar de alguns pesquisadores apontarem a IL-23 como um fator importante apenas para a expansão de células Th17, foi mostrado que a IL-23 é necessária para promover um fenótipo patogênico às células Th17, confirmando os estudos iniciais sobre a função indispensável de IL-23 nos modelos de doenças autoimunes induzidas por Th17 (Gyulveszi, Haak e Becher, 2009; Segal, 2009; Stritesky, Yeh e Kaplan, 2008).

Dentro deste contexto, uma dicotomia foi observada entre a diferenciação de células T reguladoras e Th17 (Bettelli et al., 2006; Mucida et al., 2007). A diferenciação de células Th17, *in vitro*, pode ser induzida, a partir de células T $CD4^+$, por estimulação do TCR em conjunto com fator de crescimento transformador β (TGF-β; do inglês, *Transforming Growth Factor*) e IL-6 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006) e a diferenciação de células T reguladoras por estimulação do TCR em conjunto com TGF-β (Tone et al., 2008). Entretanto, recentemente foi descrito que TGF- não é essencial para o desenvolvimento de células Th17, sendo necessário apenas para suprimir os fatores de transcrição T-bet e GATA-3 (Das et al., 2009) e que células Th17 podem ser induzidas apenas pela IL-6 (Ghoreschi et al., 2010).

O papel das células Th17 no processo de rejeição do enxerto ainda não foi bem avaliado. Contudo, sua relevância em modelos de hipersensibilidade mediada por células, como em doenças auto-imunes, já havia sido bem descrita (Busso et al., 2002; De Rosa et al., 2006). Também não existem dados na literatura de como a leptina poderia modular a diferenciação de células T reguladoras e Th17, uma vez que, como

a IL-6, ativa STAT3, podendo modular a ontogenia de ambos os tipos celulares, Th17 e célula T reguladora (Figura 1).

As células T, com papel regulador, foram sugeridas inicialmente por Gershon e Kondo na década de 70, sendo denominadas de células supressoras (Gershon e Kondo, 1970). Porém, foi somente a partir dos anos 90, com a identificação das células T reguladoras $CD4^+CD25^+$, que a existência destas células supressoras passou a ter uma aceitação maior por parte dos pesquisadores (Sakaguchi et al., 1995).

Os diversos mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica têm despertado interesse da comunidade científica. Uma variedade de células tem sido descritas por apresentarem uma atividade reguladora. Groux e colaboradores descreveram que células T antígeno-específicas têm a capacidade de suprimir a proliferação de células T $CD4^+$, em resposta a um determinado antígeno, prevenindo a ocorrência de colite auto-imune em camundongos SCID (modelo de imunodeficiência severa combinada, em camundongos; do inglês, *Severe combined immunodeficiency*). Essas células foram chamadas de células T reguladoras tipo 1 (Tr-1) (Groux et al., 1997). Em 1994, Chen e colaboradores descreveram outro tipo de célula T com característica reguladora, células T auxiliares do tipo 3 (do inglês, *T helper 3*, Th3), capazes de inibir a proliferação de clones de células T por meio do TGF-β (Chen et al., 1994). Posteriormente, Sakaguchi e colaboradores identificaram, em 1995, um terceiro tipo de células T $CD4^+$, expressando a cadeia α do receptor de IL-2, com capacidade de controlar células T auto-reativas *in vitro* e *in vivo.*

A essas células foi atribuído o nome de células T reguladoras naturais e, atualmente, é a população de células com atividade reguladora mais estudada e melhor caracterizada. As células T $CD4^+CD25^+$ naturais originam-se no timo e constituem cerca de 5-15% de todas as células T periféricas, no sistema murino, exibindo uma potente atividade reguladora tanto *in vivo* como *in vitro (*Sakaguchi *et al,*1995). Essas células T reguladoras suprimem a proliferação e a resposta efetora de células T $CD4^+CD25^-$, células T $CD8^+$, células B, células NK, mastócitos, DC, neutrófilos, entre outros, tanto *in vitro* como *in vivo* (Piccirillo e Shevach, 2001;

Shevach, 2009). Logo, células T com características reguladoras também foram encontradas em humanos (Dieckmann et al., 2001).

As células T reguladoras possuem uma alta expressão do fator de transcrição chamado Foxp3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) (Hori, Nomura e Sakaguchi, 2003). O Foxp3 é um fator da proteína escurfina pertencendo à família de fatores de transcrição *forkhead* (Li, Weidenfeld e Morrisey, 2004).

A manutenção e sobrevivência das células T $CD4^+$ $CD25^+Foxp3^+$ é regulada por IL-2. O uso de anticorpos anti-IL-2 anula completamente a função supressora destas células, *in vitro* (Setoguchi et al., 2005). Esses autores também demonstraram que a neutralização de IL-2, *in vivo,* inibe a proliferação homeostática de células T $CD4^+CD25^+$ periféricas em animais linfopênicos.

Diversas moléculas de superfície foram identificadas e associadas com células T reguladoras murinas e humanas, como o CTLA-4 (Read, Malmstrom e Powrie, 2000), neutropilina-1 (Bruder et al., 2004), LAG-3 (do inglês: *Lymphocyte activation gene-3*) (Huang et al., 2004) GITR (do inglês: *Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Family-Releted Receptor*) (Mchugh et al., 2002), receptores de quimiocinas CCR4 e CCR8 (Iellem et al., 2001), L-selectina (Taylor et al., 2004), CD73, CD39, galectina-1, FR4 (do inglês, *folate receptor 4*) (Yamaguchi et al., 2007), dentre outras (Ohkura e Sakaguchi, 2010).

As células T reguladoras podem atuar suprimindo a resposta imune tanto por meio de fatores solúveis como o TGF-β e a IL-10 quanto por um mecanismo dependente de contato célula a célula, como mediados pelo CTLA-4 (Kingsley et al., 2002; Read et al., 2006; You et al., 2007). Novos mecanismos de supressão, mediados pelas células T reguladoras, têm surgido. Uma forma de supressão baseia-se na capacidade dessas células consumirem os fatores de crescimento presentes no microambiente, como a IL-2, privando as células efetoras desses fatores. A depleção de IL-2 realizada pelas células T reguladoras induz apoptose em células efetoras (Pandiyan et al., 2007). As células T reguladoras possuem uma maior quantidade de receptores de alta afinidade para a IL-2, o que as dá uma vantagem competitiva com

outras células do sistema imune, além de fornecer um mecanismo de supressão adicional, a secreção de IL-10 induzida por IL-2 (De La Rosa et al., 2004). Outro mecanismo de supressão descrito é mediado pelo cAMP (do inglês, *Cyclic adenosine monophosphate*). Nesse modelo de supressão contato-dependente, células T reguladoras têm altas concentrações de cAMP e, por meio de junções do tipo Gap, o cAMP presente nas células T reguladoras é transportado a outra célula, suprimindo sua resposta (Bopp et al., 2007). O mecanismo pelo qual o cAMP age ainda não é completamente conhecido, mas parece estar relacionado com a inibição da produção de IL-2 mediada pela ICER (do inglês: *cAMP inducible early repressor*) (Bodor et al., 2007a; Bodor et al., 2007b; Bodor et al., 2001).

O metabolismo de adenosina também foi relatado como presente no processo de supressão mediado pelas células T reguladoras. A regulação do catabolismo extracelular de ATP, pelas células T reguladoras, leva à geração de adenosina. O passo inicial é realizado pelo CD39 que quebra ATP em ADP e ADP em AMP. O AMP é rapidamente degradado em nucleotídeo pelo CD73. A adenosina gera seus efeitos supressores ao se ligar em receptores purinérgicos acoplados à proteína G, o receptor A2A, presente em células T, (Deaglio et al., 2007).

Novos trabalhos associaram mais complexidade às funções supressoras das células T reguladoras. Sugeriu-se que a célula T reguladora, para exercer sua função supressora e migrar para o foco inflamatório frente a respostas do padrão Th1, Th2 ou Th17, precisa co-expressar o Foxp3 e os fatores de transcrição T-bet (padrão Th1), IRF-4 (padrão Th2) ou STAT-3 (padrão Th17), de acordo com o padrão inflamatório presente no tecido alvo (Chaudhry et al., 2009; Koch et al., 2009; Zheng et al., 2009). Como pode ser observado pela grande variedade de mecanismos supressores, diversos são os caminhos para a tolerância e para a regulação imune.

Recentemente, dois estudos descreveram a ação da leptina nas células T reguladoras. Taleb e colaboradores mostraram que a deficiência de leptina levou a um aumento da expressão de Foxp3 e células T $CD4^{+}CD25^{+}$, na quantidade dessas células no baço de animais $Lep^{db/db}$ e a uma maior capacidade supressora. A

transferência de células T reguladoras de um animal $Lep^{db/db}$ juntamente com esplenócitos de animais deficientes em células T reguladoras para um animal $Rag^{-/-}$ resultou em uma redução da lesão vascular e uma inibição da produção de IFN-γ quando comparado a células T reguladoras provenientes de um animal selvagem (Taleb et al., 2007).

De Rosa e colaboradores descreveram que células T reguladoras humanas expressam maiores quantidades de ObRb do que células T $CD4^{+}CD25^{-}$ e que a leptina inibe a proliferação de células T reguladoras. A neutralização de leptina aumenta a proliferação de células T reguladoras estimuladas *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28, dependentemente de IL-2 e, *in vivo,* a deficiência de leptina promoveu uma maior proliferação de células T reguladoras e manutenção de sua função supressora (De Rosa et al., 2007).

Apesar das células T reguladoras estarem relacionadas à indução e à manutenção de tolerância ao enxerto, inexiste na literatura dados de como a deficiência de leptina poderia, por meio das células T reguladoras, levar a um estado de tolerância a um órgão transplantado. O estudo da interação da leptina com a função e manutenção das células T reguladoras, no contexto do transplante, pode ajudar no estabelecimento de novas imunoterapias para condições caracterizadas por uma redução do número de células T reguladoras, como observado em processos de rejeição crônica (Moraes-Vieira et al., 2010).

1.7 mTOR, LEPTINA E SISTEMA IMUNE

A proteína quinase mTOR (do inglês, *mammalain target of rapamycin*) é um membro filogeneticamente conservado da família das quinases PI3K (fosfatidilinositol-3-OH quinase) possuindo um papel central na regulação do metabolismo, síntese protéica, balanço energético, proliferação e sobrevivência celular (Maya-Monteiro e Bozza, 2008; Papatriantafyllou, 2011; Powell e Delgoffe, 2010). A quinase mTOR detecta alterações e moléculas no microambiente extracelular

e intracelular como aminoácidos, insulina, fatores de crescimento, como a leptina, e integra esses sinais para regular o metabolismo celular (Hay e Sonenberg, 2004). O mTOR forma o núcleo de dois complexos distintos de sinalização, sendo que suas ativações são reguladas de formas distintas. O complexo mTORC1 contém a proteína Raptor (do inglês, *regulatory associated protein of mTOR*), assim como as subunidades mLST8 (conhecida como, GβL), PRAS40 (conhecida como AKT1S) e DEPTOR (conhecido como DEPDC6; do inglês, *DEP domain-containing protein 6*) (Laplante e Sabatini, 2009). A ativação de mTORC1 é mediada pelas quinases PI3K, PDK1 (do inglês, *Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1)* e Akt. Esse complexo, quando ativado, promove a fosforilação de reguladores traducionais S6 (proteína ribossômica) e 4E-BP1 (do inglês, *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) e é tido como tendo um papel central na regulação do crescimento celular e proliferação por modular o metabolismo celular. Enquanto S6, quando fosforilada (pS6) é ativada, a proteína 4E-BP1 quando fosforilada por mTOR é direcionada para a degradação. O segundo complexo de sinalização de mTOR, mTORC2, consiste de mLST8, da proteína Rictor (do inglês, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*) e das subunidades mSIN1 (do inglês, *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) e Protor (do inglês, *protein observed with Rictor-1*) (Laplante e Sabatini, 2009). A ativação de mTORC2 pode ser mensurada pela fosforilação de um resíduo hidrofóbico de Akt na serina 473 e em outras quinases da família AGC (quinases A, G e C) (Guertin et al., 2006). A via de sinalização que leva a ativação do mTORC2 ainda não é conhecida, assim como as conseqüências fisiológicas distintas de cada complexo de mTOR.

Um importante papel de mTOR na percepção do "microambiente" imunológico vem ganhando destaque. Células T CD4+ que não são capazes de sinalizar via mTOR não se diferenciam em células efetoras e condições polarizantes (Delgoffe et al., 2009). Em contrapartida, esses autores mostraram que na ausência de sinalização via mTOR, as células T CD4+ se tornam reguladoras. Essa menor eficiência em se diferenciar em células T efetoras é relacionada a uma menor ativação

de STAT4, STAT6 e STAT3 em resposta as citocinas IL-12, IL-4 e IL-6, respectivamente (Delgoffe et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que a diferenciação tanto de células Th1 como de células Th2 efetoras requerem a sinalização via mTORC1, enquanto que a diferenciação para células Th2 foi mantida na ausência de mTORC1 (Delgoffe et al., 2011). Esses autores também descreveram que na ausência de mTORC1, animais ficam resistentes a indução de EAE e que embora as células se diferenciem mais facilmente para um perfil Th1, elas mantêm a capacidade de se diferenciarem tanto para Th1 como Th17, uma vez que a sinalização por mTORC1 é restabelecida. Em conjunto, esses dados indicam que nas células T CD4+, a via mTOR regula o destino das células T através do balanço da ativação dos complexos mTORC1 e mTORC2.

Mudanças no microambiente influenciam diretamente o status energético intracelular. Nesse contexto, a leptina poderia agir como um fator que detectaria alterações no *status* energético, agindo como um elo essencial entre o ambiente (disponibilidade de nutrientes), metabolismo e resposta imune. Foi mostrado que a leptina inibe a proliferação de células T reguladoras (De Rosa et al., 2007). Além disso, a neutralização da leptina ou de seu receptor durante a ativação via TCR rapida e eficientemente reverte a hiporreatividade, *in vitro*, das células T reguladoras (De Rosa et al., 2007). Foi demonstrado que o eixo mTOR-leptina é responsável pela hiporreatividade das células T reguladoras (Procaccini et al., 2010). Esses autores também descreveram que, apesar da inibição transiente de mTOR pela rapamicina reduzir a proliferação de células T efetoras $CD4^{+}CD25^{-}$, essa condição leva a proliferação de células T reguladoras funcionais.

Ademais, a leptina modula a sobrevivência de células T $CD4^{+}$ autorreativas pela da via de sinalização de mTOR. Nesse contexto, animais $Lep^{ob/ob}$ são protegidos da EAE induzida pela transferência adotiva de células T $CD4^{+}$ MOG_{35-55} autorreativas, devido a baixa sobrevivência dessas células, apresentando uma baixa produção de citocinas Th1/Th17 (Galgani et al., 2010). Importante ressaltar que essa característica foi acompanhada por uma inativação da via Akt-mTOR, a qual poderia ser reativada

pela administração, *in vivo*, de leptina recombinante, induzindo a ativação de mTOR em células T $CD4^+$ transferidas, aumentando sua sobrevivência (Galgani et al., 2010).

Assim, a ativação de mTOR mediada pela leptina indica que existe um suprimento energético sistêmico suficiente para manter uma resposta imune adequada e, em contrapartida, baixos níveis de leptina sinalizariam para o sistema que as reservas energéticas estariam baixas e, por isso, limitar as respostas imunes tornar-se-ia essencial. A ação da leptina nas células T reguladoras se enquadraria perfeitamente nessa hipótese.

A via de sinalização de mTOR tem sido amplamente estudada através do uso do imunossupressor rapamicina. A rapamicina, um produto natural da bactéria *Streptomyces hydroscopicus*, foi primeiramente identificada em 1975 como um antifúngico (Vezina, Kudelski e Sehgal, 1975). A rapamicina tem uma seletividade por seu alvo molecular, o mTOR. A rapamicina tem uma grande importância devido a sua capacidade imunossupressora, atribuída essencialmente a inibição da expansão/proliferação de linfócitos (Janes e Fruman, 2009). Entretanto, mTOR também é encontrado em células que não proliferam ou proliferam pouco, incluindo macrófagos e DC. Nesse contexto, a ativação da via PI3k em macrófagos e em DC mielóides atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, enquanto promove a produção de citocinas anti-inflamatória, como a IL-10 (Fukao et al., 2002; Guha e Mackman, 2002). Em contraste, a via PI3K promove a síntese de interferons do tipo I em DC plasmocitóides (Guiducci et al., 2008). A exposição à rapamicina prolongada tanto *in vitro* como *in vivo* suprime a geração de DC mielóides, sua maturação e sua capacidade em estimular linfócitos T (Hackstein et al., 2003; Taner et al., 2005; Turnquist et al., 2007).

Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC; do inglês, *bone marrow derived dendritic cells*) maduras geradas na presença de rapamicina expressam baixos níveis de MHC-II e moléculas co-estimuladoras, mesmo após ativação com agonistas de TLR (receptores do tipo toll; do inglês, *toll like receptor*) e CD40 (Hackstein et al., 2003; Turnquist et al., 2007). Apesar dessas características, BMDC geradas na

presença de rapamicina induzem maiores quantidades de células T reguladoras. Em discordância com esses dados, a inibição de mTOR foi implicada com a secreção de citocinas pró-inflamatórias. A exposição à rapamicina antes da ativação de TLR reduz a secreção de IL-10, promovendo uma elevação na produção de IL-12 (Ohtani et al., 2008; Schmitz et al., 2008). DC ativadas nesse contexto são potentes indutores de células Th1 e Th17 (Weichhart et al., 2008). Entretanto, outros dados mostram que DC tratadas com rapamicina e ativadas com LPS, apesar de produzirem maiores quantidades de IL-12, especialmente em células $CD86^{low}$, não são capazes de induzir células Th1 (Turnquist et al., 2010). Esses autores ainda descreveram que a atividade aumentada de GSK-3 (do inglês, *glycogen synthase kinase-3*) e a produção de IL12 eram essenciais para que as DC ativadas com LPS e tratadas com rapamicina induzissem a expressão de Foxp3 em células T $CD4^+$ (Turnquist et al., 2010). Assim, o efeito da rapamicina na função das DC ainda parece ser pouco conhecida bem como sua via de sinalização ativada pela leptina envolvida na modulação da função destas células.

1.8 TRANSPLANTE

Diversos protocolos para indução de tolerância ao aloenxerto têm sido bem sucedidos em modelos experimentais animais. Além disso, os avanços do conhecimento celular e molecular sobre a imunobiologia da reposta ao alotransplante, tanto na rejeição como em estados de não rejeição e tolerância, têm contribuído para a melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na regulação da resposta inflamatória ao enxerto. Diversos protocolos para induzir tolerância no contexto do transplante já foram testados em modelos experimentais, como por exemplo, transfusão doador-específica, injeção intratímica de aloantígeno, administração endovenosa e oral de aloantígeno, assim como o uso de diversos anticorpos monoclonais como anti-CD4, anti-CD8 e anti-moléculas coestimuladoras, revisado por Rossini e colaboradores (Rossini, Greiner e Mordes, 1999).

A tolerância ao aloenxerto parece ser induzida e mantida através de vários mecanismos que podem atuar em conjunto, como anergia, deleção periférica e mecanismos ativos, mediados por células reguladoras (Jiang et al., 2006; Lechler et al., 2001; Lechler, Ng e Camara, 2001; Li, 2010). A tolerância ao aloenxerto mediada por células reguladoras tem sido caracterizada em vários modelos de transplante. Há relatos de que a supressão mediada por estas células pode ser alcançada através de diversos mecanismos, como pela ação de citocinas anti-inflamatórias e tolerância infecciosa, caracterizada pela capacidade que determinados linfócitos tolerizados têm de "infectar", de tornar tolerante outros linfócitos de animais *naïve* (Cobbold e Waldmann, 1998; Waldmann et al., 2006). Devido à ausência de dados sobre a homeostase de células T reguladoras na ausência de leptina em modelos de transplante, o estudo de células T reguladoras em animais $Lep^{ob/ob}$ e $Lep^{db/db}$ transplantados pode fornecer importantes indícios e mecanismos de como o sistema neuroendócrino pode atuar na modulação da resposta imune ao enxerto.

No contexto do transplante, o equilíbrio Th1/Th2 tem se mostrado importante no desfecho do órgão transplantado, seja em rejeição ou tolerância. As células do padrão Th2 são descritas, por diversos pesquisadores, como tendo um efeito protetor em relação a processos de rejeição do enxerto (Davidson et al., 2007; Lee et al., 2000; Waaga et al., 2001). Esses dados indicam um possível papel das células Th2 no processo de homeostase do enxerto. Apesar disso, não há na literatura estudos de como a ausência da leptina e/ou sua modulação poderia agir no contexto do transplante. Uma polarização para um perfil Th2, na ausência da leptina ou por meio de sua neutralização, poderia auxiliar no estabelecimento de um estado de não agressão ao enxerto e fornecer subsídios que auxiliem no entendimento de como a resposta alogênica é regulada em indivíduos obesos.

Finalmente, do ponto de vista experimental, a ausência de leptina pode ser revertida com o transplante de tecido adiposo. Como a principal fonte de leptina é o tecido adiposo, o transplante de adipócitos de um animal normal para um recipiente $Lep^{ob/ob}$ promove uma redução do peso e ingestão de alimento, redução de insulina,

glicose e corticosteróides e restabelecimento da fertilidade em animais $Lep^{ob/ob}$, apesar dos níveis de leptina séricos serem apenas 20% de um animal saudável (Barros et al., 2009; Klebanov et al., 2005). O transplante de adipócitos também foi capaz de melhorar a celularidade do timo e do baço e de restaurar a inflamação intestinal em animais $Lep^{ob/ob}$ (Sennello et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos têm sido realizados buscando entender como os fatores neuroendócrinos poderiam influenciar as respostas imunes. Dentre esses fatores, a leptina tem despertado grande interesse por controlar o consumo de alimentos e o gasto energético e, recentemente, por atuar de diversas formas modulando a resposta imune. Sabe-se que a obesidade causa diversas perturbações na homeostase imunológica e que indivíduos obesos possuem elevadas concentrações de leptina. Entretanto, embora a obesidade seja um problema mundial crescente, o estudo de fatores imunológicos relacionados com essa doença ainda é escasso. A leptina, por atuar em células centrais do sistema imune, como DC e células T $CD4^+$, pode afetar diretamente a forma com a qual respostas imunológicas são montadas, mantidas e orquestradas.

Dados indicam que a obesidade é um fator de risco para o transplante de órgãos, sendo a sobrevida tanto do paciente como do enxerto diminuídas em indivíduos obesos (Bumgardner et al., 1995; Chang, Coates e Mcdonald, 2007; Ghahramani, Reeves e Hollenbeak, 2008). A indução de tolerância em transplante de órgãos ainda representa um grande desafio na prática clínica e a crescente obesidade mundial um desafio ainda maior a esse processo. Dados experimentais demonstram que a tolerância pode ser atingida usando-se células com potencial regulador. Devido às ações da leptina no favorecimento de uma polarização Th1 e na inibição da proliferação de células T reguladoras é provável que a ausência dessa adipocina favoreça um estado de imunorregulação que tenha como desfecho um aumento da sobrevida do enxerto, mesmo em um indivíduo obeso, mas leptina deficiente.

Frente a essas lacunas de conhecimento nosso objetivo é avaliar a importância da leptina na resposta aloimune e suas implicações imunológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a importância da leptina na modulação da resposta imunológica alogênica, seu papel na plasticidade de células T reguladoras/Th17 e sua função na geração e função de células dendríticas. Visou-se assim contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos na imunorregulação da leptina e sua participação na resposta aloimune.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Num modelo experimental de transplante alogênico de pele e protocolos de imunização, intencionou-se:

a) Analisar a importância da leptina na resposta alogênica, estudando a sobrevida dos enxertos de pele;

b) Caracterizar o fenótipo das células do linfonodo drenante do enxerto e a expressão de citocinas produzidas por elas;

c) Investigar o balanço Th1/Th2 e o papel das células T reguladoras na resposta aloimune nos animais $Lep^{ob/ob}$; e

d) Analisar o papel da leptina na indução de respostas imunes antígeno-específicas.

Num modelo de ativação celular *in vitro*, intencionou-se:

a) Caracterizar o fenótipo e a função de células dendríticas derivadas de medula óssea de animais deficientes em leptina e em seu receptor;

b) Estudar a ação da leptina na plasticidade de células T CD4;

c) Avaliar a proliferação celular de células T CD4 induzida por células dendríticas derivadas de medula óssea derivadas com e sem leptina;

d) Analisar a capacidade de células dendríticas derivadas de medula óssea, com e sem leptina, em modular a geração de células Th17, Th1, Th2 e T reguladoras; e

e) Analisar os possíveis mecanismos moleculares pelo qual a leptina poderia modular a função de células dendríticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os animais foram divididos em grupos para responder aos objetivos propostos: Para os experimentos com transplante de pele foram usados camundongos com o *background* H-2^b e H-2^k, isogênicos, machos e fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas. Os seguintes animais foram utilizados: C57BL/6, CBA, C57BL/6-$Lep^{ob/ob}$, C57BL/6-$Foxp3^{gfp}$, 2D2 C57BL/6-$Foxp3^{gfp}$, C57BL/6-$Rag^{-/-}$, C57BL/6-$Lep^{db/db}$, BALBc, BALBc-$Lep^{db/db}$ e BALBc-$Foxp3^{gfp}$. Os animais C57BL/6 e CBA foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo e os C57BL/6-$Foxp3^{gfp}$ e 2D2 C57BL/6-$Foxp3^{gfp}$ pela Universidade Federal de São Paulo. Os C57BL/6-$Rag^{-/-}$ foram fornecidos pelo Instituto Ludwig de Pesquisa e os animais C57BL/6, C57BL/6-$Lep^{ob/ob}$, C57BL/6-$Lep^{db/db}$, BALBc, BALBc-$Lep^{db/db}$, BALBc-$Foxp3^{gfp}$ e C57BL/6-$Rag^{-/-}$ foram adquiridos da Jackson Laboratory (Boston, MA, EUA) e mantidos no Biotério de experimentação animal do Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School. Antes e após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acondicionados em microisoladores coletivos, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 ^oC e com suprimentos de água e alimento autoclavados *ad libitum*. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, CEEA.08.09.

4.2 TRANSPLANTE DE PELE

O transplante de pele foi realizado segundo a técnica descrita por Markees (Markees et al., 1997). Os camundongos doadores foram eutanasiados e, com o auxílio de um bisturi, a pele da cauda foi removida, seccionada em quadrados de 2

cm^2, sendo os cantos abaulados. A secção de tecido foi mantida em solução salina tamponada (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*), no gelo, até o momento do uso. Os camundongos receptores foram anestesiados com 350 μL (i.p., intraperitoneal) de uma mistura de cloridrato de ketamina (0,5%, Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa, EUA) e cloridrato de xilazina (0,3%, Fort Dodge) em PBS. Os animais tiveram seu dorso depilado, e a assepsia realizada com etanol 70%. Uma "cama" para o enxerto na região dorsal foi preparada removendo-se uma área da epiderme e derme até o nível do músculo intrínseco, do tamanho do enxerto. Os enxertos foram colocados na "cama" e suturados com fio de nylon 6.0 de agulha triangular. A sobrevida do enxerto foi monitorada 5 vezes na semana por avaliação visual e de tato, por um período de até 100 dias. O aceite foi definido a partir do dia em que o enxerto incorporou-se a pele do camundongo. Considerou-se como perda do enxerto quando apenas 10% do implante permaneceu no animal. As análises patológicas dos cortes histológicos foram realizadas na UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro). Na eutanásia dos animais, dias 6 e 10 pós-transplante, foram retirados os linfonodos drenantes axilares e a pele transplantada, respectivamente, para análises posteriores.

4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS TRANSPLANTADOS COM RAPAMICINA

Os animais WT e $Lep^{ob/ob}$ transplantados foram tratados diariamente com 3 mg/kg de rapamicina (i.p.) (LC laboratories, Woburn, MA, EUA). A rapamicina foi diluída em uma concentração de 10 mg/mL em uma solução de carboximetilcelulose de sódio (2 mg/mL e 0,3% Tween 20).

4.4 IMUNIZAÇÃO PARA INDUÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO (DTH)

4.4.1 *IMUNIZAÇÃO*

Os animais C57BL/6 Foxp3^{gfp} e 2D2 C57BL/6-Foxp3^{gfp} foram imunizados, na base da cauda, com CFA (adjuvante completo de Freund; do inglês, *complete freund's adjuvante*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) emulsificada com 200 μg do peptídeo MOG_{35-55}. Em um dos grupos adicionou-se a emulsão 100 μg de leptina recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA).

4.4.2 *DTH*

A DTH ao peptídeo MOG_{35-55} foi quantificada pelo inchaço relativo da pata posterior, em um período de 6-72 h. Os animais imunizados foram desafiados, 7 dias após a imunização, com 100 μg do peptídeo MOG_{35-55} em 50 μL de PBS, na pata posterior direita. Apenas PBS foi injetado na pata posterior contralateral como controle. O inchaço da pata posterior direita relativa à pata contralateral foi mensurado em intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 h, após o desafio, com o auxílio de um paquímetro (Insize, São Paulo, SP, Brasil). Os resultados foram apresentados como mm de inchaço da pata desafiada com o antígeno MOG_{35-55} relativamente a pata contralateral controle.

4.5 INDUÇÃO DE EAE E AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA

Os animais C57BL/6 Lep$^{ob/ob}$ e C57BL/6 normais (WT) foram imunizados, no dia 0, na base da cauda, com CFA (Sigma Aldrich) emulsificada com 200 μg do peptídeo MOG_{35-55} e 200 ng de toxina *pertussis* (i.p.) (Sigma Aldrich). No dia 2, administrou-se novamente 200 ng de toxina *pertussis* (i.p.). Os animais foram avaliados diariamente para os sinais clínicos da EAE até o trigésimo dia após a imunização. Os animais foram avaliados de acordo com a severidade dos sintomas numa escala de 0 a 5, com 0,5 pontos de intervalo entre os sinais clínicos: 0 – nenhum

sinal da doença; 0,5 – perda parcial do tônus da cauda; 1 – reduzido tônus da cauda e perda parcial da mobilidade das patas posteriores; 2 – perda completa do tônus da cauda, perda moderada da mobilidade das patas posteriores, perda da habilidade de virar para um determinado lado; 3 - fraqueza ou paralisia parcial dos membros posteriores; 4 – paralisia completa dos membros posteriores ou fraqueza nos 4 membros; 5 – tetraplegia ou estado moribundo. Os dados foram analisados diariamente como média dos pontos dos sinais clínicos. Nenhum animal chegou ao escore de 4.

4.6 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E PRESENTES NOS LINFONODOS

Os linfonodos (LN) drenantes e o baço foram removidos cirurgicamente e acondicionados em meio DMEN (GIBCO, CA, EUA). Em seguida, o baço e os LN foram macerados e centrifugados a 600 g por 5 min. Após a lise de eritrócitos o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 3 mL de meio DMEN. As células foram contadas na câmara de Neubauer e utilizadas em seus respectivos ensaios.

4.7 ANÁLISE DE LINFÓCITOS T CD4+ DE ANIMAIS 2D2 ANTÍGENO ESPECÍFICOS

Os animais 2D2 C57BL/6-Foxp3^{gfp} (animais transgênicos com o TCR específico para o antígeno MOG_{35-55}) foram imunizados, na base da cauda, com CFA (Sigma Aldrich) emulsificada com 200 μg do peptídeo MOG_{35-55}. Em um dos grupos adicionou-se a emulsão 100 μg de leptina recombinante (Peprotech). Após 7 dias o LN drenante foi obtido e as células mononucleares isoladas. Um total de 3.10^6 células foram cultivadas por 3 dias na presença de 1 μg/mL de MOG_{35-55}. No terceiro dia, adicionou-se brefeldina (Sigma Aldrich) aos poços, incubou-se as células à 37º por 5

horas e avaliou-se a produção intracelular de IL-17, IFN-γ por células T $CD4^+$ e a frequência de células T $CD4^+Foxp3^{gfp+}$ por citometria de fluxo.

4.8 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T POR ESFERAS MAGNÉTICAS

As células obtidas do baço ou dos LNs, dependendo do ensaio, foram submetidas à separação por microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EUA). Dois processos de separação foram utilizados, um de separação positiva e outro de separação negativa. Para os experimentos de diferenciação de células T reguladoras e Th17, usou-se primeiramente a separação negativa e posteriormente a separação positiva com o kit $CD4^+CD62L^+$ T *Cell Isolation Ki*t II, conforme descrito pelo fabricante (Miltenyi Biotec). Nos ensaios de proliferação e de transferência adotiva usou-se o kit CD4 (L3T4) *MicroBeads* (Miltenyi Biotec) para obtenção de células T $CD4^+$, conforme instruções do fabricante. Para a realização da purificação celular por citometria de fluxo, as células foram primeiramente enriquecidas por separação magnética negativa com o Kit de purificação de células T $CD4^+$ (Miltenyi Biotec), conforme descrito pelo fabricante. Para a realização de purificação celular de células dendríticas esplênicas e derivadas de medula óssea, as células foram purificadas por separação magnética negativa com o Kit de purificação de células $CD11c^+$ (Miltenyi Biotec), conforme indicado pelo fabricante.

4.9 GERAÇÃO, *IN VITRO*, DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

As células dendríticas imaturas e maduras foram geradas a partir da medula óssea de animais C57BL/6-$Lep^{ob/ob}$, C57BL/6-$Lep^{db/db}$, BALBc-$Lep^{db/db}$ e selvagens C57BL/6 e BALBc, conforme descrito previamente (Cao et al., 1998). Ambos os fêmures e tíbias dos animais foram obtidos e a medula lavada com 10 mL de PBS. Centrifugou-se por 5 min a 600 g e realizou-se a depleção de eritrócitos com tampão

de lise (Sigma Aldrich). Após essa depleção as células foram contadas e cultivadas em meio DMEN *Low-glucose* (GIBCO) suplementado com 10 % de soro. No caso dos $Lep^{ob/ob}$ animais, o meio foi suplementado com soro autólogo, para excluirmos contaminação por leptina presente no soro fetal bovino. Adicionou-se 20 ng/mL de GM-CSF (R&D system, Minneapolis, MN, EUA) e, dependendo do ensaio, 1 μg/mL de leptina recombinante (Peprotech) foi adicionada. No quinto dia de cultura, trocou-se metade do meio de cultura, adicionando-se novo meio de cultura e GM-CSF. No sétimo dia de cultura, células não aderentes eram em sua maioria células dendríticas imaturas (iDC). A maturação dessas células foi realizada adicionando-se 100 ng/mL de LPS (Sigma) e cultivada por 2 dias. No dia 9, as células dendríticas maduras (mDC) foram obtidas e utilizadas nos ensaios. Ambas as células dendríticas imaturas e maduras foram analisadas por PCR em tempo real *array* e por citometria de fluxo. Os sobrenadantes das cultuas foram coletados nos dias 7 e 9 para estudo da produção de citocinas.

4.10 PCR EM TEMPO REAL *ARRAY*

No sétimo dia de derivação de BMDC de animais C57BL/6 WT e $Lep^{ob/ob}$ na ausência de leptina ou com a adição de leptina recombinante, células CD11c foram purificadas por *beads* magnéticas. O mRNA das BMDC foram extraídos pelo *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e tratadas com DNase com o *kit RNase-Free DNase set* (Qiagen), conforme descrito pelo fabricante. Após extração, o mRNA foi transcrito em cDNA com o *kit High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme instruções do fabricante. O cDNA de BMDC imaturas de animais C57BL/6 WT e $Lep^{ob/ob}$ na ausência de leptina ou com a adição de leptina recombinante foram usados para a realização do PCR em tempo real *array*. Dois Kits de PCR *array* foram usados: (i) *Mouse Dendritic and Antigen Presenting Cell* RT^2 *Profiler*™*PCR Array* (Qiagen) e o *mTOR signaling* RT^2 *Profiler*™*PCR Array* (SAbiosciences, Frederick, MD, USA), conforme descrito do fabricante. Na reação de

PCR em tempo real usou-se a enzima *RT²Real-Time™SYBR GREEN/ROX PCR master mix PCR Array* (SAbiosciences). A placa foi lida no aparelho de PCR em tempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems). A análise dos dados foi realizada pelo *software RT² Profiler PCR Array Data Analysis* (SAbioscience).

4.11 PURIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células T *naive* e/ou T CD4+ totais purificadas por citometria de fluxo foram previamente enriquecidas por *beads* magnéticas, conforme descrito. Para a separação de células T $CD4^+$ totais de animais C57BL/6 WT, $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ e BALBc, as células foram inicialmente enriquecidas por separação magnética usando anticorpo anti-CD4 *Pacific Blue* (Biolegend, San Diego, CA, USA). Na separação de células T CD4 *naive*, duas estratégias de separação foram utilizadas: (i) para a purificação de células *naive* de animais C57BL/6 WT e $Lep^{ob/ob}$, as células foram anteriormente enriquecidas por separação magnética negativa, conforme descrito, e marcadas com anticorpos anti-CD4 *Pacific Blue*, anti-CD62L Percp, anti-CD44-PECy7 e antiCD25 FITC (Biolegend) com pureza superior a 98%. A estratégia e a pureza estão mostrados na Figura 2A e 2B; (ii) para a purificação de células T CD4 *naive* de animais C57BL/6 $Foxp3^{GFP}$ e BALBc $Foxp3^{gfp}$, as células foram anteriormente enriquecidas por separação magnética negativa, conforme descrito, e marcadas com anticorpos anti-CD4 *Pacific Blue*, anti-CD62L Percp e anti-CD44-PECy7 (Biolegend), também com pureza superior a 98%. A estratégia e a pureza estão mostradas na Figura C e D. As células foram separadas no citômetro de fluxo ARIA II (BD, San Jose, CA, USA) da *Flow Cytometry Core*, Beth Israel Deacones Medical Center, Harvard Medical School.

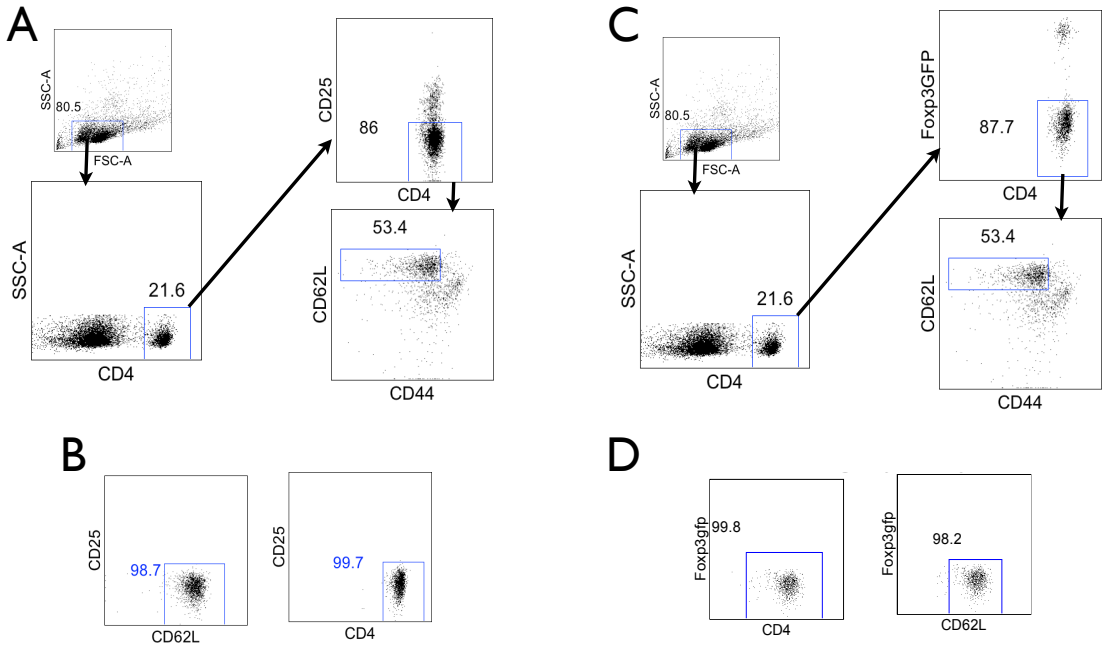

Figura 2. Purificação de células T CD4 *naive* por citometria de fluxo. (A) *Dot plot* representativo da estratégia de separação de células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}CD25^{-}$. (B) *Dot plot* representativo da pureza obtida da separação de células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}CD25^{-}$. (C) *Dot plot* representativo da estratégia de separação de células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-}$. (D) *Dot plot* representativo da pureza obtida da separação de células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-}$.

4.12 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

As células T $CD4^{+}$ de animais C57BL/6 ou BALBc obtidas por purificação por citometria de fluxo foram semeadas em placas de 96 poços juntamente com BMDC, de animais C57BL/6 ou BALBc $Lep^{ob/ob}$ e WT, respectivamente. As células T $CD4^{+}$ foram marcadas com 2 µM de *cell tracer violet* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A co-cultura foi mantida durante 96 h à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO_2. Vinte e cinco microlitros do sobrenadante foram coletados nos dias 2 e 4 de cultura para avaliação da produção de citocinas por *multiplex*. No quarto dia, as células foram analisadas por citometria de fluxo. O índice e a porcentagem de divisão celular foram avaliados usando-se o *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA).

4.13 CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS – REAÇÃO LINFOCITÁRIA MISTA (MLR)

Os esplenócitos dos animais receptores do enxerto de pele foram utilizados como células respondedoras, e as células esplênicas irradiadas (5000 rads) usadas como células estimuladoras, de acordo com seus respectivos doadores. As células respondedoras foram marcadas com 2,5 μM de CFSE (do inglês, 5,6 *carboxyfluorescein diacetate succinimidylester*) (Sigma). A co-cultura foi mantida durante 5 dias à 37 ^{o}C com atmosfera contendo 5 % de CO_2. No quinto dia, as células foram analisadas por citometria de fluxo. O índice e a porcentagem de divisão celular foram avaliados usando-se o *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Star inc.).

4.14 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS, TH1, TH2 E TH17

Células T *naive*, purificadas por citometria de fluxo ($CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}CD25^{-}$, células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-}$) ou por *beads* magnéticas ($CD4^{+}CD62L^{+}$) de animais C57BL/6, C57BL/6 $Lep^{ob/ob}$, C57BL/6 $Foxp3^{GFP}$, 2D2 C57BL/6 $Foxp3^{GFP}$, e BALBc $Foxp3^{gfp}$ foram cultivadas com iDC ou mDC, de animais C57BL/6 $Lep^{ob/ob}$, C57BL/6 $Lep^{db/db}$, BALBc $Lep^{db/db}$ e seus respectivos controles normais (WT), por 5 dias. Nos ensaios de diferenciação sem APC (células apresentadoras de antígeno, do inglês, *antigen presenting cells*), o anticorpo anti-CD3 (Biolegend, Cidade, Pais) foi imobilizado~~s~~ em placas de 96 poços de fundo chato em uma concentração de 2 μg/mL. Foram semeadas 2.10^5 células em cada poço contendo 4 μg/mL de anticorpo anti-CD28 (Biolegend), citocinas e anticorpos neutralizantes, utilizados de acordo com a condição em que se queira polarizar, conforme mostrado na tabela 1. Nos ensaios de diferenciação com APC, 2.10^5 células T *naive* foram incubadas com $0,5.10^5$ APC, adicionando-se 2 μg/mL de anticorpos anti-CD3 (Biolegend) e citocinas

utilizadas de acordo com a condição em que se queira polarizar, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 1 - Condições sem APC

Th17	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
IL-6	50ng/mL
TGF-β	1ng/mL
Anti-IFN-γ	1µg/mL
Anti-IL-4	1µg/mL
Treg	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
TGF-β	5ng/mL
Anti-IFN-γ	1µg/mL
Anti-IL-4	1µg/mL

Tabela 2 - Condições com APC

Th17	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
IL-6	50ng/mL
TGF-β	1ng/mL
Treg	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
TGF-β	5ng/mL
Th1	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
IL-12	5ng/mL
IL-2	10ng/mL
Th2	
Citocinas/Anticorpos	Concentração
IL-4	10ng/mL

4.15 PCR EM TEMPO REAL

O mRNA da pele foi extraído pelo método descrito por Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987), o qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total. O mRNA proveniente das culturas celulares foi extraído com o kit *RNeasy Mini* (Qiagen). Quantificou-se o mRNA purificado por espectrofotometria (Beckman, Fullerton, CA, USA) e a sua

integridade foi avaliada por gel de agarose 1,2%. As amostras de mRNA foram tratadas com DNAse com o *kit RNase-Free DNase set* (Qiagen) para evitar interferência de DNA na reação de PCR em tempo real. Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do mRNA em cDNA foi feita com 2 μg de RNA total utilizando-se o *Kit High capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems), conforme descrito pelo fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em tubos, com o *RT²Real-Time™ SYBR Green/ROX PCR master mix* (SABioscience) e os equipamentos Perkin-Elmer ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* ou *StepOnePlus* (Applied Biosystems). A reação foi realizada conforme instruções do fabricante. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi realizado pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme descrito por Livak e Schmittegen (Livak e Schmittgen, 2001) e utilizando como gene de referência o GAPDH (do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) foi:

$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔCt= Ct alvo – Ct referência, e ΔΔCt= ΔCt amostra ΔCt controle

Os genes avaliados foram: Foxp3, GATA-3, RORC, Tbx-21, IDO, IL-10 e PDL-1, usando-se como controle endógeno o gene GAPDH. As sequências dos iniciadores estão representadas na tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores

Gene	Forward	Reverse
Foxp3	CCC ATC CCC AGG AGT CTT	CC ATG ACT AGG GGC ACT GTA
Tbx-21	AGC AAG GAC GGC GAA TGT T	GGG TGG ACA TAT AAG CGG TTC
GATA-3	CTC GGC CAT TCG TAC ATG GAA	GGA TAC CTC TGC ACC GTA GC
RORC	GAC CCA CAC CTC ACA AAT TGA	AGT AGG CCA CAT TAC ACT GCT
IDO	ATT GGT GGA AAT CGC AGC TTC	ACA AAG TCA CGC ATC CTC TTA AA
PDL-1	GCT CCA AAG GAC TTG TAC GTG	TGA TCT GAA GGG CAG CAT TTC
IL-10	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT
GAPDH	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA

4.16 CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: (i) RNA íntegro visualizado em gel de agarose 1,2%, (ii) presença de controles brancos adequados, sem amplificação, (iii) curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, com o seu início de aumento antes do Ct de 30, (iv) ocorrência de amplificação do gene de interesse com Ct de até 35, (vi) triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 Ct, (v) curva de dissociação com pico único.

4.17 CITOMETRIA DE FLUXO - MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE

As células marcadas, após incubação de 30 min em 4 ^{o}C no escuro foram analisadas nos citômetros de fluxo FACSCanto II, FACSCalibur ou LSRII (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Foram usados anticorpos marcados com isotiocinato de fluoroceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina conjugada ao flourocromo Cy7 (PE-Cy7), complexo protéico peridina clorofila I (PerCP) conjugado ou não ao fluorocromo Cy-Chrome 5.5 (PerCP Cy5.5), aloficocianina (APC) e *Pacific Blue*, na combinação adequada para a análise da população celular em estudo e seus respectivos controles isotípicos. Todos os anticorpos foram usados na diluição 1/200 μL e adquiridos da BD Bioscience Pharmigen ou Biolegend. Anticorpos conjugados com FITC: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 e anti-IA^{b}. Anticorpos conjugados com PE: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD40, anti-CCR4, anti-CD62L, anti-Gr1, anti-NK1.1 e anti-CD19. Anticorpos conjugados com PE-Cy7: anti-CD44. Anticorpos marcados com PerCP: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD80, anti-CD86 e Anti-CCR5. Anticorpos marcados com APC: anti-CD86, anti-FR4 e anti-CCR7. Anticorpos marcados com *Pacific Blue*: anti-CD4, anti-CD11c e anti-CD25.

4.18 CITOMETRIA DE FLUXO - DETECÇÃO INTRACELULAR DE FOXP3, DE CTLA-4 E DE GATA-3

Neste ensaio, usou-se o kit para marcação intracitoplasmática *Mouse Regulatory T Cell Staining Kit* (eBioscience, San Diego, EUA). Inicialmente, 2.10^5 células foram ressuspensas em 100 μL de PBS 1X 2% FCS (Soro fetal bovino, do inglês, *calf fetal serum,* da Gibco, EUA). Fez-se a marcação de superfície incubando-se por 30 minutos a 4 °C no escuro. Após centrifugação e descarte do sobrenadante as células foram fixadas com uma solução de fixação/permeabilização 1x fornecida pelo kit. Incubou-se por 1 hora no escuro à 4 °C . Após esse período, adicionou-se 1 mL de PBS 2% FCS gelado e centrifugou-se por 5 minutos a 600 *g*, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 μL de tampão de permeabilização 1x e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos a 600 *g*, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esse passo mais uma vez. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente o tubo e adicionou-se os anticorpos anti-Foxp3 PE ou APC, anti-CTLA-4 PE ou anti-GATA-3 APC, dependendo do ensaio, incubando-se por 30 minutos no gelo e no escuro. Após essa etapa, lavaram-se 2 vezes as células com 200 μL de tampão de permeabilização. O sedimento foi ressuspendido em 300 μL de tampão Facs (PBS 1X 2% FCS) e analisado no citômetro de fluxo FACSCanto (Becton & Dickinson). Um total de 1.10^5 células foi adquirido na região de linfócitos. A análise foi realizada no *software* FlowJo 8.7.6. (Tree Star inc.).

4.19 CITOMETRIA DE FLUXO - DETECÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS

Neste ensaio, usou-se o kit para marcação intracitoplasmática da BD® (*Cytofix/Cytoperm*). Inicialmente, as células foram estimuladas com o coquetel de ativação: *Leucocyte Activation Cocktail, with GoldiPlug* (BD), conforme descrito pelo fabricante, incubando-se por um período de 4 h. Após esse período, as células foram suspensas em 400 μL de PBS 1X 2% FCS. Fez-se uma etapa de lavagem e seguiu-se a

marcação de superfície incubando-se por 30 minutos a 4 °C no escuro com os devidos anticorpos. Após centrifugação e descarte do sobrenadante as células foram permeabilizadas e fixadas com a solução *Cytofix/cytoperm* 1x fornecida pelo kit. Incubou-se por 20 min no escuro em 4 °C. Após esse período adicionaram-se 400 μL de PBS 2% FCS gelado e centrifugou-se por 5 min a 600 *g*, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 μL do tampão *PermWash* 1x e centrifugou-se a suspensão por 5 min a 600 *g*, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esse passo mais uma vez. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente e adicionaram-se os anticorpos anti-citocinas, incubando-se por 30 minutos no gelo e no escuro. Os anticorpos utilizados foram: anti-IL17 PE, anti-IL17 Pacific Blue, anti-IL-10 APC, anti-IL-4 PE, anti-IL-12(p40) PE, anti-IFNγ FITC ou APC, anti-IL-6 PE e anti-TNF APC. Após essa etapa, lavaram-se duas vezes as células com 200 μL de tampão de permeabilização. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 300 μL de tampão Facs (PBS 1X 2% FCS). Em seguida, fez-se a aquisição nos citômetros de fluxo FACSCanto II, FACScalibur ou LSR II (Becton & Dickinson). Um total de 1.10^5 células foi adquirido na região de linfócitos. A análise foi realizada no software FloJo 8.7.6. (Tree Star inc.).

4.20 AVALIAÇÃO DA VIA LEPTINA/STAT3 – *PHOSFLOW*

Um total de 1.10^5 células foram centrifugadas por 5 minutos a 600 *g*. Adicionaram-se 300 μL de meio RPMI 10% SFC pré aquecido a 37 °C. Adicionou-se 10 μg de leptina recombinante (Peprotech), incubando-se por 15 min à 37 °C. Como controle positivo usou-se 6 ng de IL-6 (Peprotech). Após o estímulo, as células foram fixadas acrescentando-se 300 uL de *Lyse/Fix Buffer* (BD Bioscience Pharmigen), incubadas por 10 minutos a 37 °C. Após lavagem, adicionou-se 1 mL de *Phosflow Perm Buffer III* (BD Bioscience Pharmigen) e incubou-se, no gelo, por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de *Stain Buffer* (BD Bioscience Pharmigen) e centrifugou-se a suspensão celular por 5 minutos a 600 *g*. Após descarte do

sobrenadante, adicionaram 100 μL de *Stain Buffer* incubando-se a suspensão celular por 15 minutos, à temperatura ambiente, para reidratação. Seguindo-se a reidratação, acrescentaram-se 200 μL de *Stain Buffer* e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos a 600 *g*, repetindo-se essa etapa uma vez. Descartou-se o sobrenadante, resuspendeu-se o sedimento celular e acrescentaram-se, tanto nas células estimuladas como não estimuladas, o anticorpo PE anti-STAT3 pY705 (BD Bioscience Pharmigen) e o marcador de superfície anti-TCR-β APC (BD Bioscience Pharmigen). Incubou-se a suspensão celular por 30 minutos no gelo e no escuro. Após esse período, realizaram-se 3 lavagens com *Stain Buffer* (BD Bioscience Pharmigen) e, após a última centrifugação, resuspendeu-se o sedimento celular em 400 μL de *Stain Buffer* (BD Bioscience Pharmigen). A aquisição da amostra foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto (Becton Dickinson). A análise dos dados foram feitas no programa FlowJo 8.7.6. (Tree Star inc.) . Um total de 50.000 eventos foram adiquiridos na região de linfócitos.

4.21 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR BIOPLEX

A concentração de citocinas e quimiocinas presentes no soro e no sobrenadante de culturas foi analisada usando-se o *kit Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay* (Biorad, CA, EUA) contendo as citocinas e quimiocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-17, IFN-γ, MCP-1 e TNF. O ensaio foi realizado no equipamento Bio-Plex 200 Systems com o *software* Bio-Plex Manager 5.0 (Biorad, Hercules, CA, USA), conforme descrito pelo fabricante.

4.22 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TGF-β

A presença de TGF-b1 bioativo (Promega, Madison, WI, EUA), no sobrenadante de cultura, foi quantificada pelo método de ELISA, em placa plástica de 96 poços de fundo chato, com anticorpos monoclonais (mAbs) apropriados e com os anticorpos secundários biotinilados, segundo especificação do fabricante e como descrito por Russo e colaboradores (Russo et al., 2001).

4.23 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DE TGF-B DURANTE O CO-CULTIVO DE BMDC E CÉLULAS T $CD4^+CD62L^+$

As células T *naive* $CD4^+CD62L^+$ de animais C57BL/6 $Foxp3^{gfp}$, purificadas por *beads* magnéticas, foram co-cultivadas com iDC de animais C57BL/6 WT, $Lep^{ob/ob}$ e $Lep^{db/db}$ por um período de 5 dias. A esse ensaio foi adicionado 2 ng/mL do anticorpo neutralizante anti-TGF-β (R&D) e a frequência de células T $CD4^+Foxp3^+$ foram avaliadas por citometria de fluxo.

4.24 TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS T $CD4^+$ EM ANIMAIS $RAG^{-/-}$ TRANSPLANTADOS

Células T $CD4^+$ esplênicas foram separadas magneticamente, conforme descrito anteriormente, de animais normais (WT), animais $Lep^{ob/ob}$ e animais $Lep^{db/db}$. Um total de 2.10^5 células T $CD4^+$ foram transferidas para animais $Rag^{-/-}$ pela veia caudal. No mesmo dia em que foi realizada a transferência adotiva fez-se um transplante de pele de doadores da linhagem CBA nos animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos. A sobrevida do enxerto de pele foi acompanhada por um período de 23 dias. No fim de 23 dias, o baço e os linfonodos axilares dos animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos foram retirados cirurgicamente e a porcentagem de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foi analisada por citometria de fluxo.

4.25 PROLIFERAÇÃO HOMEOSTÁTICA COMPETITIVA DE CÉLULAS T $CD4^+$ DE ANIMAIS WT, $LEP^{OB/OB}$ E $LEP^{DB/DB}$ EM ANIMAIS $RAG^{-/-}$

Células T $CD4^+$ esplênicas foram enriquecidas inicialmente magneticamente e posteriormente isoladas por citometria de fluxo, de animais WT, animais normais expressando constitutivamente a proteína GFP (do inglês, *green fluorescent protein*), animais $Lep^{ob/ob}$ e animais $Lep^{db/db}$. Um total de 1.10^6 células T $CD4^+$ de animais WT GFP foi misturado com 1.10^6 células T $CD4^+$ de animais WT, $Lep^{ob/ob}$ ou $Lep^{db/db}$ e transferido para animais $Rag^{-/-}$ pela veia caudal. A proliferação homeostática competitiva entre células T $CD4^+$ GFP^+ e $CD4^+GFP^-$ foi avaliada 10 dias após a transferência por citometria de fluxo.

4.26 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DE LISADOS DE CULTURA DE BMDC

As células foram lavadas 2x com PBS e ressuspendidas em tampão de lise (10 mM EDTA, 2 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), 1 mM iodoacetamida diluído em PBS a 1 % de Triton X-100 e 0,5% de dioxicolato de sódio) e rompidas por lise mecânica com o auxílio do pipetador. As amostras de sobrenadante foram separadamente concentradas com o auxílio de SpeedVac Concentrator Savant SPD131DDA (Thermo Electron Corporation, San Diego, CA, EUA). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se o reagente (Biorad) diluído em água (1:5). As amostras do lisado foram diluídas a 1:50 e 1:10, respectivamente, antes da determinação da concentração protéica. Equivalentes concentrações protéicas das culturas de DC foram submetidas à eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%. As amostras de lisado celular foram aplicadas nas concentrações de 12 μg e 2 μg de proteínas totais, respectivamente.

4.27 *WESTERN BLOTTING*

Culturas celulares contendo 10^6 DC foram lisadas e a concentração protéica do lisado obtida. Após normalização da concentração protéica das amostras, procedeu-se a separação protéica em SDS-PAGE a 10%. Ao término da corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência [48 mM Tris-HCl pH 7,5, 39 mM glicina, 0,037% SDS (p/v)]. Com auxílio da placa de transferência *Hoefer Semiphor* (Amersham Phamacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), a preparação foi submetida a uma corrente de 50 mA por 1 h. A membrana foi lavada com 20 mM Tris-base, 0,1% Tween20, 140 mM NaCl (TBST) sob agitação por 10 min à temperatura ambiente (TA), seguida por bloqueio com tampão TBST contendo 5% de leite desnatado, a 4 °C por 18 h. Feito isto, a membrana foi lavada 3x com tampão TBST, sob agitação, à TA por 5 min e incubada com anti-pS6 feito em coelho, ou anticorpo policlonal anti-4E-BP1 feito em cabra (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), ambos diluídos em TBST contendo 5% de leite desnatado (1:10.000) por 4 h à TA. Ao término da incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e incubada com anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase de raiz forte (Cell Signaling) diluídos em TBST a 5% de leite desnatado (1:10.000 e 1:40.000, respectivamente) por 1 h à TA. A membrana foi novamente lavada com TBST e incubada por 1min com solução de substrato *ECL plus* fornecida pelo fabricante do kit Amersham *ECL plus Western blotting detection system* (GE Healthcare, Munich, Alemanha). A membrana foi exposta a filme de alta sensibilidade *Hyperfilm* (GE Healthcare,) até atingir a intensidade desejada, empregando-se revelador e fixador da KODAK ou com o auxílio do GBox (Syngene, Frederick, MD, EUA).

4.28 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise dos resultados, utilizou-se os seguintes testes: *student T test*, para comparação entre dois grupos e *one-way* ANOVA, para comparação entre mais de dois grupos de estudo. A análise estatística da curva de DTH e de EAE foi realizada ponto a ponto pelo *student T test***.** A análise estatística de sobrevida do enxerto foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. A comparação entre grupos foi realizada utilizando-se o teste do "log-rank". As análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são apresentados como media e erro padrão. As seguintes diferenças foram consideradas estatisticamente significativas entre os grupos: * $p>0,05$; ** $p>0,01$; *** $p>0,001$.

5 RESULTADOS

5.1 A LEPTINA MODIFICA A RESPOSTA IMUNE AO TRANSPLANTE E CONTRIBUI PARA UMA MAIOR SOBREVIDA DO ENXERTO

Iniciamos o estudo avaliando a sobrevida do enxerto de pele alogênico em animais $Lep^{ob/ob}$ comparativamente a animais selvagens (WT), em conjunto com os possíveis mecanismos envolvidos em uma resposta aloimune. Primeiramente, transplantamos peles provenientes da cauda de camundongos da linhagem CBA (doadores) em camundongos C57BL/6 (receptores) tanto WT como $Lep^{ob/ob}$. Como controles, realizamos transplantes de pele isogênicos, nos quais a pele de um camundongo C56BL/6 $Lep^{ob/ob}$ e CBA normais foram enxertadas em camundongos C57BL/6 $Lep^{ob/ob}$ e CBA, respectivamente. O transplante de pele foi acompanhado por um período de 100 dias e consideramos perda do enxerto quando apenas 10% da pele enxertada permaneceu no animal, conforme descrito nos materiais e métodos. Observamos que os animais $Lep^{ob/ob}$ apresentaram uma maior sobrevida do enxerto de pele quando comparada a dos animais WT (Figura 3A). Os receptores $Lep^{ob/ob}$, além de terem uma maior sobrevida do aloenxerto, apresentaram uma menor concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias IL-17, IL-12 (p40), TNF e IFN-γ (Figura 3B). A análise histológica do enxerto indicou que os animais WT apresentaram afinamento intenso do enxerto, com redução da espessura e maior hemorragia da derme, epiderme afinada e não aderida à derme e intenso infiltrado inflamatório. Em contrapartida, animais $Lep^{ob/ob}$ enxertados apresentaram área do enxerto com preservação da espessura da epiderme e da derme e discreto infiltrado inflamatório (Figura 3C). Os animais WT transplantados também apresentaram uma maior deposição de colágeno e, consequentemente, maior índice de fibrose quando comparados aos animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados (Figura 3D).

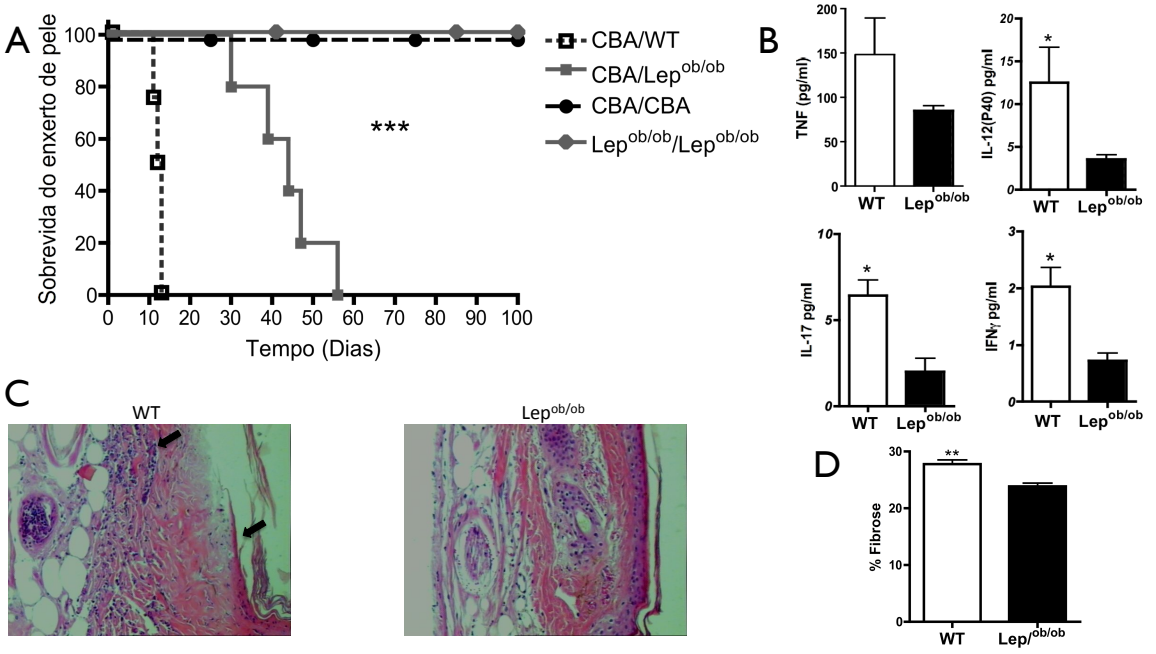

Figura 3. Sobrevida do enxerto de pele e citocinas presentes no soro. (A) A pele de camundongos CBA foram transplantadas em ambos os camundongos WT e Lep$^{ob/ob}$ e os enxertos avaliados diariamente por sinais de rejeição. Transplantes isogênicos foram também realizados. Foi considerado perda do enxerto quando apenas 10% do enxerto permaneceu no animal. (B) As citocinas IL-17, TNF, IL-12 (p40) e IFN-γ foram avaliadas, no soro dos animais transplantados, 7 dias após o transplante de pele, por *bioplex*. (C) Análise histológica de 1 animal representativo dos grupos Lep$^{ob/ob}$ e WT, as setas apontam o maior infiltrado inflamatório e alterações na epiderme. (D) Percentual de fibrose tecidual analisado pelo método de picro-sírius. Dados mostrados como media ± erro padrão. Dados representativos de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 6 animais/grupo. * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), ***($p<0.001$).

A deficiência de leptina resultou em uma maior sobrevida do enxerto de pele e, frente a esse resultado, investigamos os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. Primeiramente, avaliamos frequência de células T CD4$^+$, CD8$^+$ e células CD11c$^+$ no linfonodo drenante, 7 dias após o transplante de pele. Observamos que os animais Lep$^{ob/ob}$ apresentaram uma menor frequência de células CD8$^+$, CD4$^+$ e CD11c$^+$, no linfonodo drenante, comparativamente aos animais WT transplantados (Figura 4A e 4B). Para excluirmos que essa não era uma característica intrínseca dos animais Lep$^{ob/ob}$, avaliamos a frequência de células T CD4$^+$, CD8$^+$ e CD11c$^+$ em animais *naive* com 10 semanas de idade e não observamos diferença nas populações de células T CD4$^+$ e CD8$^+$, entre animais Lep$^{ob/ob}$ e WT (Figura 4C). Entretanto, quando analisamos

a freqüência de células CD11c$^+$ em animais não transplantados observamos que os animais Lep$^{ob/ob}$ possuíam uma menor frequência comparada aos animais WT (Figura 4D). No animais transplantados, observamos que havia um aumento na porcentagem de células CD11c$^+$ em relação aos animais não transplantados (Figuras 4B e 4D), sugerindo seu maior recrutamento. Contudo, os animais Lep$^{ob/ob}$ mantêm o mesmo perfil, com uma menor frequência de células CD11c$^+$. Esse dado indica que os animais Lep$^{ob/ob}$ parecem possuir um defeito intrínseco na população de células CD11c$^+$, sendo que essas células não são recrutadas para o linfonodo drenante tão eficientemente como as células CD11c$^+$ de animais WT.

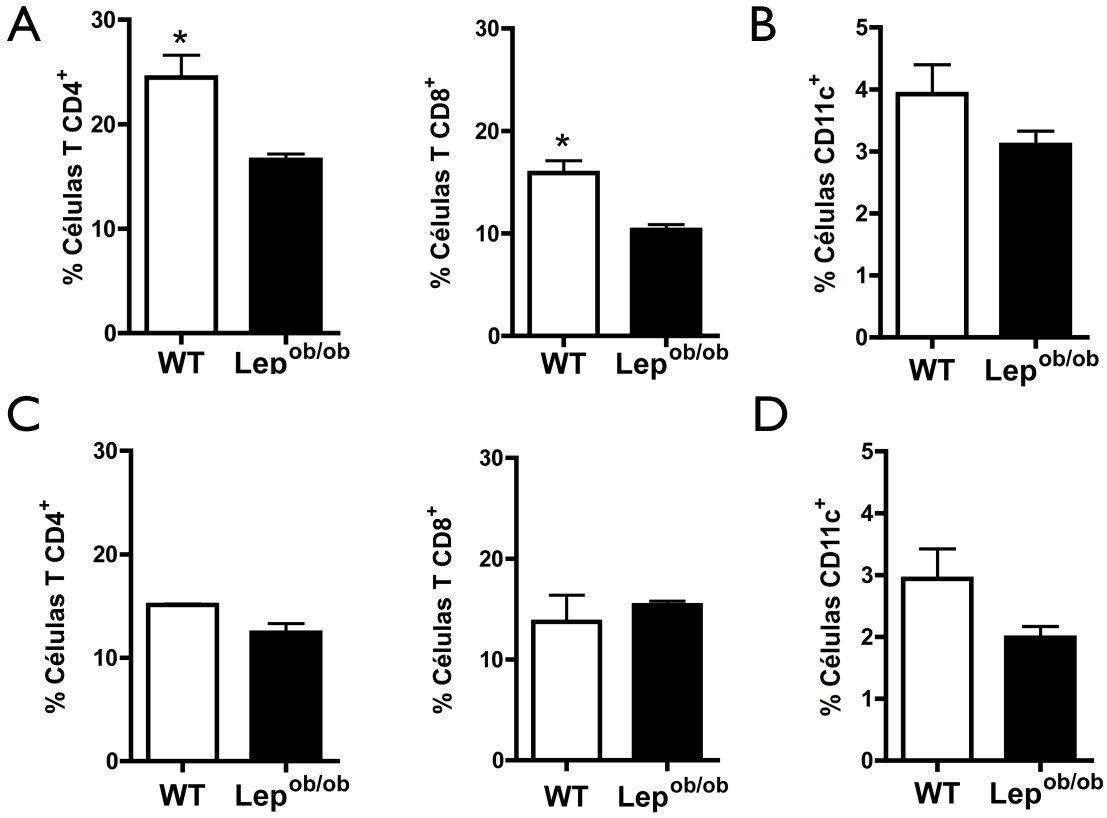

Figura 4. Frequência de células CD4$^+$ e CD8$^+$ e CD11c$^+$ foram analisadas, no linfonodo drenante de animais transplantados, 7 dias após o transplante . (A) Frequência de célula T CD8$^+$ e CD4$^+$ em animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e WT transplantados. (B) Frequência de célula CD11c$^+$ em animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e WT transplantados. (C) Frequência de célula T CD8$^+$ e CD4$^+$ em animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e WT não transplantados. (D) Frequência de célula CD11c$^+$ em animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e WT não transplantados. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 5 animais/grupo. Dados mostrados como média ± erro padrão. MFI: mediana da intensidade de fluorescência (do inglês, *median fluorescence intensity*). * ($p<0.05$).

Esses resultados podem sugerir que essa menor frequência de células T poderia ser resultado de uma menor aloreatividade nos animais Lep$^{ob/ob}$, corroborando com a maior sobrevida do enxerto encontrada. Dessa forma, realizamos uma MLR para investigar a resposta alogênica na ausência de leptina. Incubamos esplenócitos irradiados dos camundongos doadores (linhagem CBA) com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou Lep$^{ob/ob}$, por um período de 5 dias, e analisamos a proliferação pela diluição de CFSE, por citometria de fluxo (Figura 5A e 5B). Para assegurarmos a ausência de leptina no experimento, usamos soro autólogo de animais Lep$^{ob/ob}$ para fazermos o meio de cultura a 10% de soro. Em conjunto com a maior sobrevida observada, os esplenócitos dos animais Lep$^{ob/ob}$ apresentaram uma menor proliferação (reação alogênica) quando comparados a animais WT.

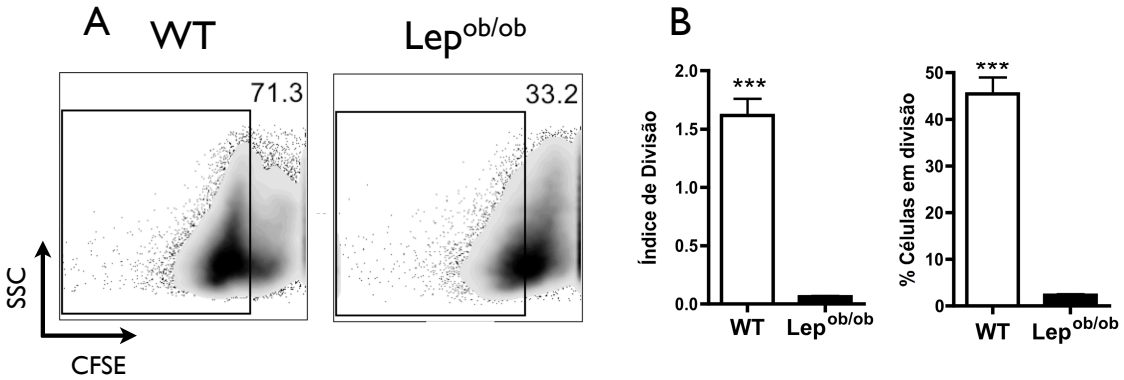

Figura 5. Reação linfocitária mista. Células esplênicas irradiadas de camundongos CBA foram incubadas com esplenócitos de camundongos C57BL/6 normais (WT) ou deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$). A proliferação foi avaliada por citometria de fluxo com CFSE. (A) *Density plot* representando a proliferação de esplenócitos de animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e animais normais (WT). Está representado no gráfico a porcentagem de células dentro da região delimitada. (B) Porcentagem de esplenócitos em divisão e índice de divisão de esplenócitos em proliferação. A porcentagem de esplenócitos em divisão e o índice de divisão foram calculados pelo *software* FlowJo. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados, com 5 animais/grupo. Dado apresentado como média ± erro padrão. ***($p<0.001$).

Além da frequência de células T CD4 totais, também investigamos a frequência de células T reguladoras e a produção das citocinas IL-10, IL-4, IL-17 e IFN-γ por células T CD4^{+}, no linfonodo drenante, 7 dias após o transplante de pele, por citometria de fluxo. Uma maior frequência de células T reguladoras

(CD4⁺Foxp3⁺) foram observadas no linfonodo drenante de animais Lep$^{ob/ob}$ transplantados comparativamente a animais WT transplantados (Figura 6). Consideramos como sendo células T reguladoras, as células T CD4⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3.

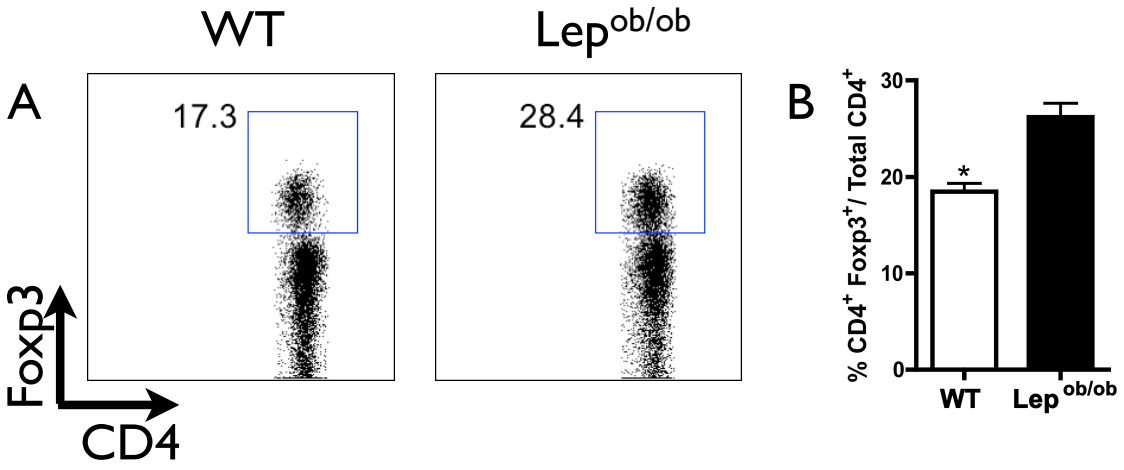

Figura 6. Frequência de células T reguladoras no linfonodo drenante, 7 dias após o transplante. (A) *Dot plot* representativo de células T CD4⁺Foxp3⁺ no linfonodo drenante de animais WT e Lep$^{ob/ob}$ transplantados. (B) Gráfico em barra da frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados, com 3 animais/grupo. Dados mostrados como média ± erro padrão. ** ($p<0.01$).

Somando-se a maior frequência de células T reguladoras, os animais Lep$^{ob/ob}$ enxertados apresentaram uma maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-4 e uma menor frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ, comparativamente a animais WT (Figura 7A e 7B). Interessantemente, observamos que animais Lep$^{ob/ob}$ tiveram uma maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 (Figura 7A e 7B). Não observamos diferenças na produção de IL-10. Esses dados sugerem que um desvio para um padrão Th2, observado pela relação entre IFN-γ/IL-4 (Figura 8A), pode ter um efeito positivo em relação à sobrevida do enxerto de pele. Para confirmarmos esse achado, analisamos a expressão do fator de transcrição GATA-3 em células T CD4⁺. Observamos que os animais Lep$^{ob/ob}$ apresentaram uma maior frequência de células CD4⁺GATA-3⁺, 7 dias após o transplante (Figuras 8B e 8C).

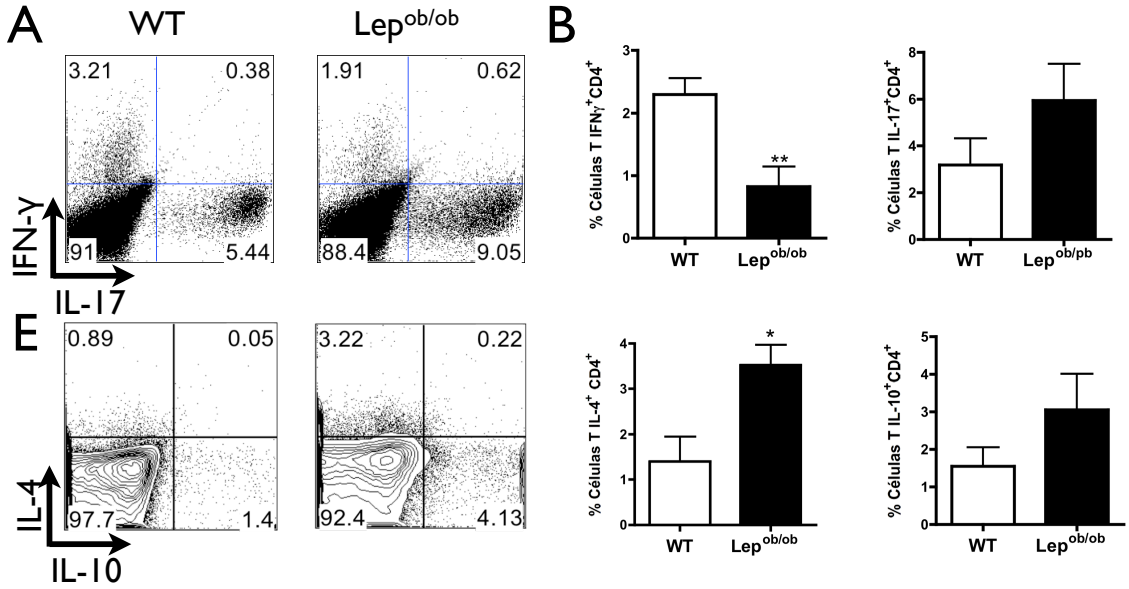

Figura 7. Análise da produção de IFN-γ, IL17, IL-4 e IL-10 no linfonodo drenante de animais enxertados, 7 dias após o transplante de pele, por citometria de fluxo. (A) Dentro da região de células T CD4+ analisou-se a produção de IFN-γ, IL17, IL-4 e IL-10. (B) Gráfico em barra da frequência de células T CD4+ produtoras de IFN-γ, IL-17, IL-4 e IL-10 em animais Lep$^{ob/ob}$ e normais (WT) transplantados. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos realizados com 3 animais/grupo. Dados mostrados como média ± erro padrão. * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

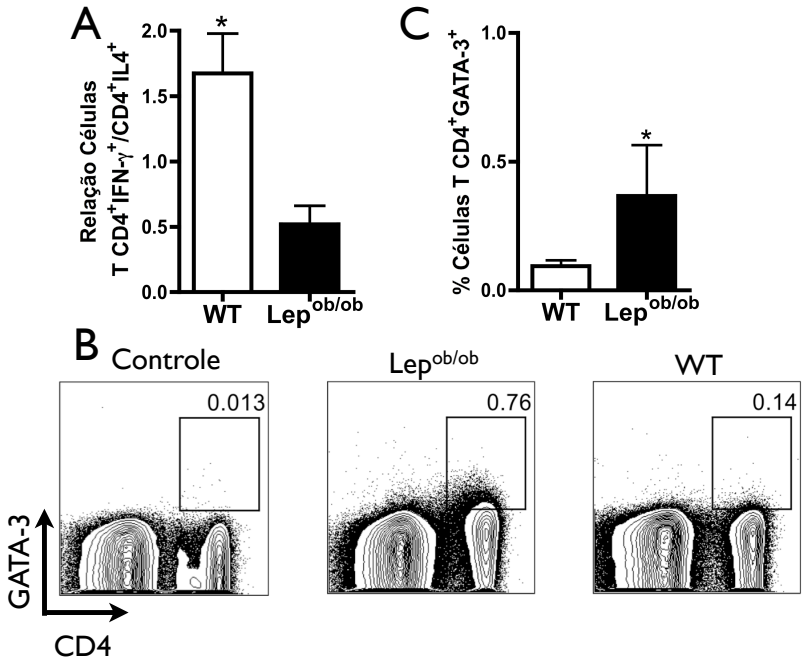

Figura 8. Relação entre células T CD4+ produtoras de IFN-γ e de IL-4 e detecção intracelular de GATA-3 em células T CD4+. (A) Razão entre células T CD4+ produtoras de IFN-γ e de IL-4. A detecção intracelular de GATA-3 em células T CD4+ foi realizada em células do linfonodo drenante, 7 dias após o transplante. (A) *Dot Plot* representativo da frequência de células T CD4+GATA-3+. (C) Gráfico em barra da frequência de células T CD4+GATA-3+ no linfonodo drenante. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados com 3 animais/grupo. Dados mostrados como média ± erro padrão. * ($p<0.05$).

Buscando-se melhor caracterizar a população de células T reguladoras, avaliamos a expressão de CTLA-4 e de CD25 por essas células. Não observamos diferenças na frequência e na expressão (MFI) de CTLA-4 pelas células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) entre animais $Lep^{ob/ob}$ e WT transplantados, sugerindo que a leptina possivelmente não afeta a expressão dessa molécula nas células T reguladoras (Figura 9). Entretanto, ao analisarmos a expressão de CTLA-4 em células T $CD4^+$ potencialmente efetoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$), encontramos uma maior expressão de CTLA-4 nessa população celular (Figura 10).

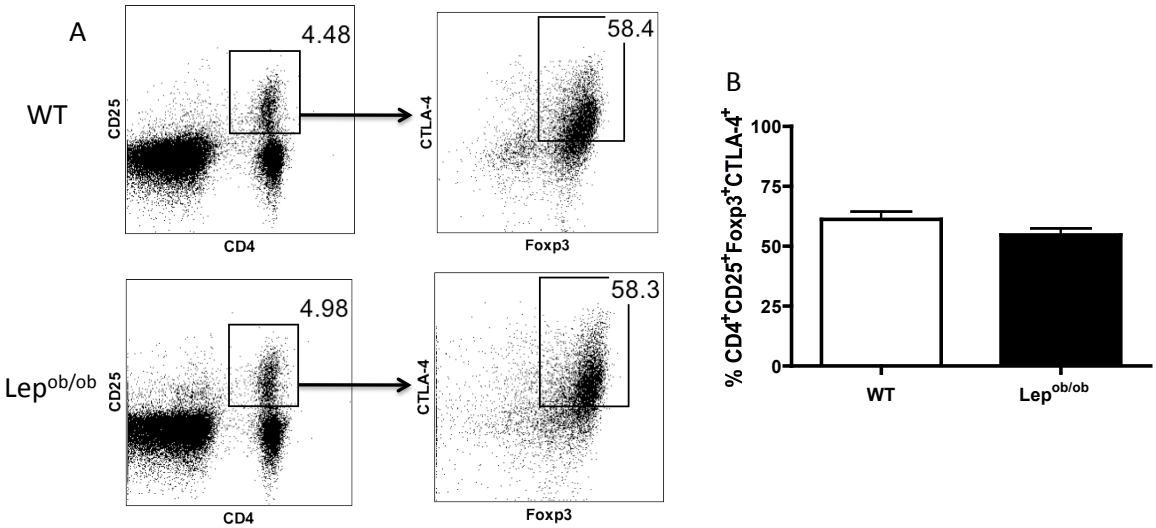

Figura 9. Marcação intracitoplasmática para detecção de CTLA-4 em células T reguladoras. (A) *Dot plot* representativo de células obtidas de linfonodos de animais deficientes em leptina ($Lep^{ob/ob}$) e animais selvagens (WT). Delimitou-se uma região de células T $CD4^+CD25^+$ e, dentro dessa população, analisou-se a porcentagem de células T $Foxp3^+CTLA\text{-}4^+$. (B) Gráfico em barra da porcentagem de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA\text{-}4^+$. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados com 3 animais/grupo. Resultado demonstrado como média ± erro padrão.

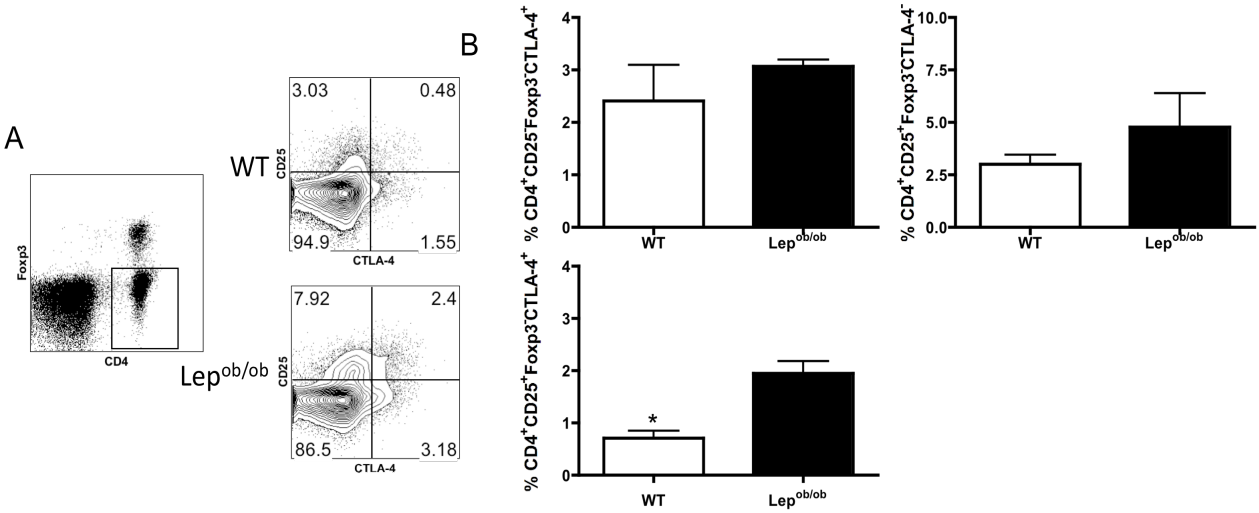

Figura 10. Análise da expressão de CTLA-4 em células T CD4+Foxp3-. (A) *Dot plot* representativo de células obtidas de linfonodos de animais deficientes em leptina ($Lep^{ob/ob}$) e animais normais (WT), 6 dias após o transplante de pele. Delimitou-se uma região de células T CD4+Foxp3- e, dentro dessa região, analisou-se a porcentagem de células T CD4+Foxp3- expressando CTLA-4 e CD25. (B) Gráfico em barra da porcentagem de células T CD4+Foxp3- expressando CD25 e CTLA-4. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados com 3 animais/grupo. Resultado demonstrado como média ± erro padrão. * ($p<0.05$).

Até o momento, analisamos a resposta imune ao aloenxerto apenas no linfonodo drenante. Outro ponto importante é como a resposta imune observada no linfonodo poderia modificar o infiltrado celular na pele transplantada. Analisamos, por PCR em tempo real, a expressão de Foxp3 na pele enxertada, com o intuito de confirmar se o aumento observado no linfonodo drenante poderia refletir em um aumento desse fator de transcrição, presente nas células T reguladoras, no sítio inflamatório, 10 dias após o transplante. Os animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados apresentaram uma maior expressão relativa de Foxp3 na pele em comparação aos animais WT (Figura 11).

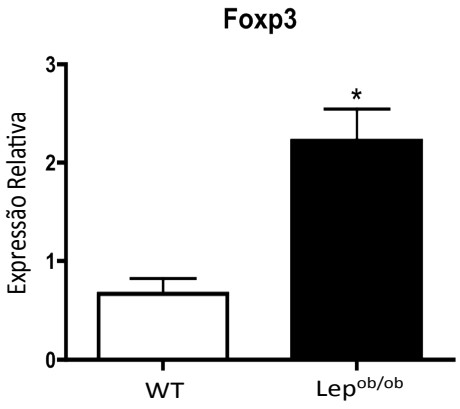

Figura 11. Expressão gênica de Foxp3 no enxerto de pele, 10 dias após o transplante. O mRNA foi normalizado com HPRT e a expressão relativa realizada comparativamente a expressão no grupo controle (WT). Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos realizados. N = 5 animais/grupo. Dados mostrados como média ± erro padrão. * ($p<0.05$).

5.2 A LEPTINA DESEMPENHA UMA PAPEL CENTRAL NA MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE DE CÉLULAS T CD4$^+$

Devido as alterações observadas nas células T CD4$^+$ pela deficiência em leptina na resposta aloimune, analisamos a expressão do receptor de leptina em células T CD4$^+$Foxp3^{gfp+} e CD4$^+$Foxp3^{gfp-}, assim como em células CD11c$^+$. Tanto células T CD4$^+$Foxp3$^+$ como CD4$^+$Foxp3$^-$ (Figura 12A), assim como células CD11c$^+$ expressam o receptor de leptina (Figura 12B). A forma longa do receptor de leptina é responsável pela ativação da via Jak2/STAT-3, e, portanto, após a confirmação da expressão do receptor de leptina em leucócitos, avaliamos sua funcionalidade. Observamos que a leptina induz a fosforilação de STAT-3 em linfócitos tanto em TCR-β positivos como negativos, assim como em células presentes na região de monócitos, compostos em sua maior parte por macrófagos e células dendríticas (Figura 13), indicando que além de expressarem o receptor de leptina, este é capaz de, quando ativado pela leptina, fosforilar STAT3.

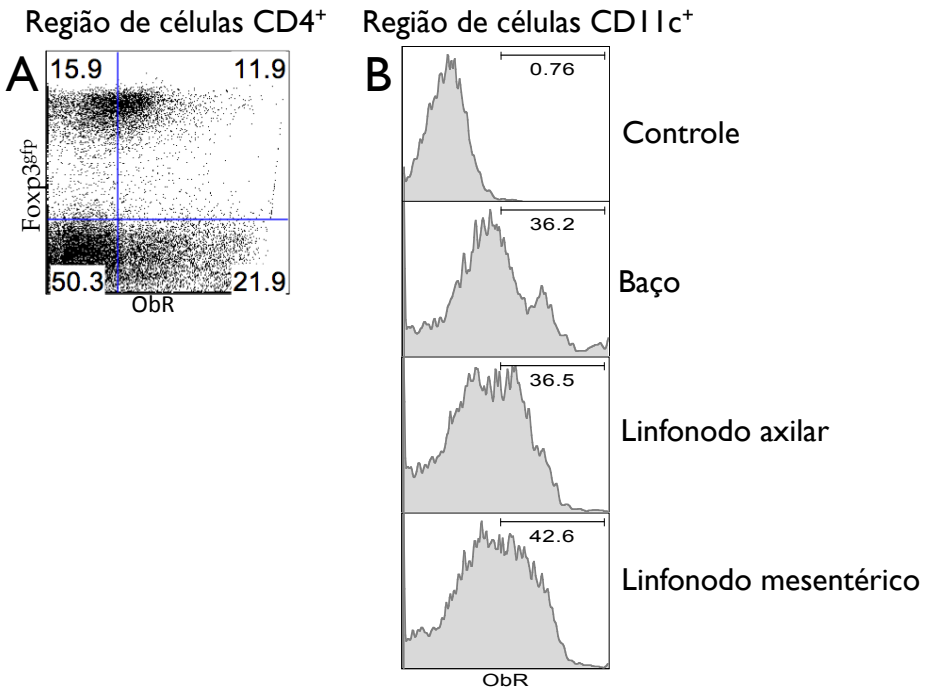

Figura 12. Análise da expressão do receptor de leptina em leucócitos. (A) A expressão do receptor de leptina foi analisado em células T CD4+ tanto reguladoras como não reguladoras, por citometria de fluxo. (B) Expressão do receptor de leptina em células CD11c+ obtidas do baço e linfonodos mesentéricos e axilares. Resultado representativo de 1 experimento. N = 3 animais/grupo.

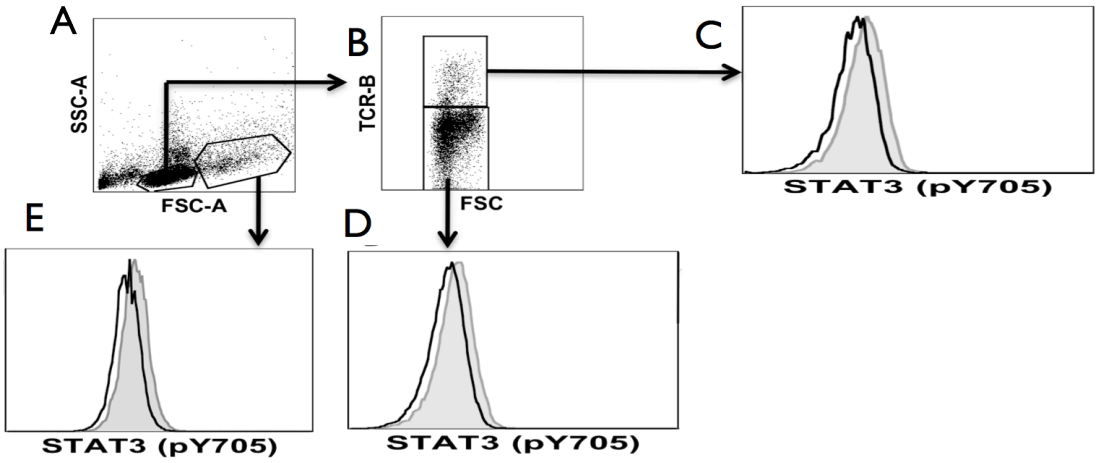

Figura 13. Análise da via de sinalização Leptina/STAT3 em células esplênicas. Os esplenócitos foram obtidos conforme descrito em material e métodos e a análise da fosforilação de STAT-3 realizada 15 minutos após o estímulo com leptina. (A) Delimitou-se primeiramente uma região de linfócitos e outra de monócitos. (B) Dentro da região de linfócitos obtiveram-se as populações de células TCR-β positivas e negativas. (C) Fosforilação de STAT-3 em linfócitos TCR-β positivos, frente a estímulo pela leptina. (D) Fosforilação de STAT-3 em linfócitos TCR-β negativos, frente a estímulo pela leptina. (E) Dentro da região de monócitos observou-se a fosforilação de STAT-3, frente a estímulo pela leptina. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 3 animais/grupo.

A análise da resposta aloimune nos animais lep$^{ob/ob}$ transplantados indicaram que as células T reguladoras podem ter um importante papel na sobrevida observada. Na literatura é descrito que a ausência de leptina promove a proliferação de células T reguladas, com manutenção de sua capacidade supressora (De Rosa et al., 2007). Dessa forma, buscamos analisar como a leptina poderia modular a diferenciação de células T reguladoras a partir de precursores *naive*. Purificamos, por citometria de fluxo, células T CD4$^+$ *naive* de animais lep$^{ob/ob}$ e WT. Consideramos como *naive* células T CD4$^+$CD62L$^+$CD44$^-$CD25$^-$, com pureza superior a 98%. Essas células T *naive* foram utilizadas em ensaios de polarização para células T reguladoras e para células Th17. Observamos que células T CD4$^+$ *naive* de animais lep$^{ob/ob}$ diferenciaram-se mais eficientemente em células T reguladoras quando comparadas a células T CD4$^+$ *naive* de animais WT (Figura 14), sendo que a adição de leptina recombinante pouco afetou a geração dessas células T reguladoras (Figura 14).

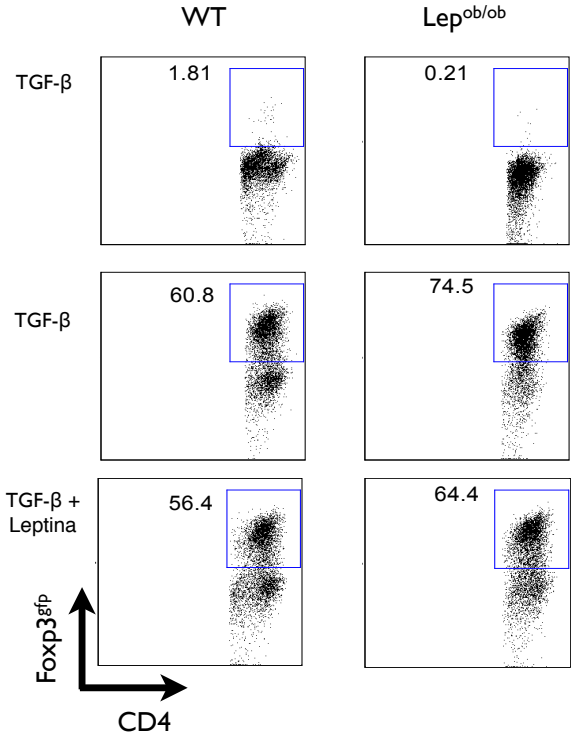

Figura 14. Geração de células T reguladoras. Células T *naive*, purificadas por citometria de fluxo, provenientes de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT, ambos C57BL/6, foram cultivadas por 5 dias sozinhas ou com a adição de TGF-β ou TGF-β e leptina e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão intracelular de Foxp3. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

Também tínhamos observado anteriormente que animais $lep^{ob/ob}$ transplantados apresentaram, no linfonodo drenante, uma elevada frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IL-17. Assim, realizamos um ensaio de diferenciação para células Th17 com células T $CD4^+$ *naives* de animais $lep^{ob/ob}$ e WT. Observamos que a ausência de leptina ($lep^{ob/ob}$) resultou em uma maior indução de células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 comparativamente as células T $CD4^+$ *naives* de animais WT (Figura 15A). Destacamos que, diferentemente do observado na indução de células T reguladoras, a adição de leptina recombinante ao grupo $lep^{ob/ob}$ resultou em uma inibição na geração de células $CD4^+$ produtoras de IL-17, resultado não observado no grupo WT (Figura 15A). Esse dado indica que a leptina atua diretamente em células T $CD4^+$ polarizadas para uma resposta Th17, inibindo sua geração. Para certificarmos que estávamos gerando uma célula com o perfil Th17, analisamos a expressão dos fatores de transcrição GATA-3, Tbx21 (T-bet), Foxp3 e RORC (RORγT), por células Th17 polarizadas *in vitro*. Observamos que nas condições onde houve a geração de células produtoras de IL-17, houve a expressão do mRNA do fator de transcrição RORγT e uma baixa expressão dos outros fatores de transcrição, específicos das células Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3) e T reguladora (Foxp3) (Figura 15B).

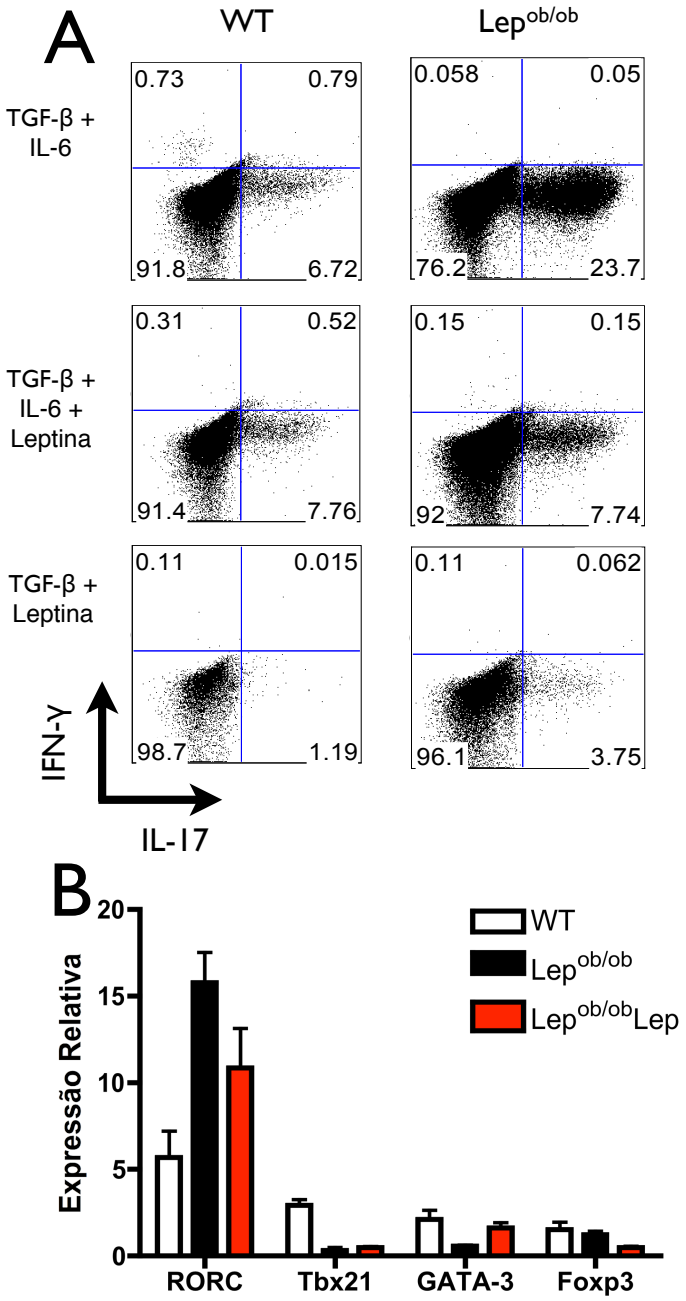

Figura 15. Geração de células Th17. Células T *naive*, purificadas por citometria de fluxo, provenientes de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT, ambos C57BL/6, foram cultivadas por 5 dias, com a adição de: TGF-β e IL-6; TGF-β, IL-6 e leptina ou IL-6 e leptina. (A) *Dot plot* representativo de 1 experimento de diferenciação de células para um perfil Th17. Dentro da região de linfócitos T CD4+ avaliou-se a freqüência de células positivas para IL-17 e IFN-γ. (B) No quinto dia de polarização, as células T foram isoladas e o expressão gênica de RORC, Tbx21, GATA-3 e Foxp3 avaliada por PCR em tempo real. O mRNA foi normalizado com GAPDH e a expressão relativa realizada comparativamente à expressão de células *naive* não polarizadas. Resultado representativo de 1 dos 3 experimentos independentes realizados. Dados mostrados como média ± erro padrão.

Esses dados indicam que leptina pode modular a resposta aloimune possivelmente por atuar na geração de células T reguladoras e Th17. Além disso, observamos que os animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados possuem uma menor aloreatividade. Essa menor aloreatividade poderia ser tanto devido a uma menor capacidade de células T $CD4^+$ proliferarem na ausência de leptina como uma menor capacidade das células dendríticas ativarem células T $CD4^+$. Para analisarmos a ação da leptina na capacidade proliferativa de células T $CD4^+$ isoladamente, realizamos um ensaio de proliferação homeostática de linfócitos T $CD4^+$ de animais $lep^{ob/ob}$, deficientes no receptor de leptina ($Lep^{db/db}$) e WT competitivamente a células T $CD4^+$ de animais WT^{gfp}. Purificamos células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$, WT e WT^{gfp} e reconstituímos animais $Rag^{-/-}$ com células T CD4 purificadas de animais WT^{gfp} em conjunto com células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ ou WT. Analisamos a frequência de células T $CD4^{gfp+}$ positivas (correspondendo a células $CD4^+$ de animais WT^{gfp}) e negativas (correspondendo a células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ ou WT), 10 dias após a transferência. Observamos que células $CD4^+$ $Lep^{ob/ob}$ proliferaram mais eficientemente, *in vivo*, comparativamente a células $CD4^{gfp+}$ (Figura 16), indicando que células provenientes de animais $Lep^{ob/ob}$ são hiperresponsivas a níveis séricos normais de leptina. Contudo, na ausência da sinalização do receptor de leptina ($Lep^{db/db}$), essas células tiveram uma menor capacidade proliferativa frente a células $CD4^+$ de animais WT GFP (Figura 16). Frequências similares entre células T $CD4^{gfp+}$ WT e WT^{gfp} foram observadas (Figura 16). Esses dados indicam que a leptina interfere na capacidade proliferativa de células T $CD4^+$, *in vivo*.

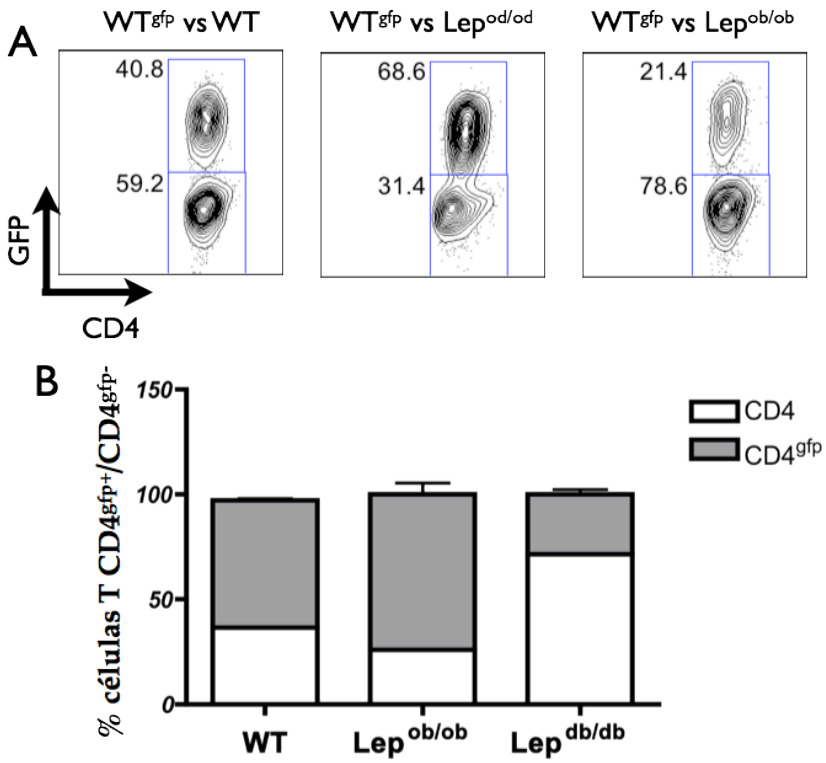

Figura 16. Proliferação homeostática competitiva. Animais Rag$^{-/-}$ foram reconstituídos com células T CD4^{+} de animais Lep$^{ob/ob}$, Lep$^{db/db}$ ou WT em conjunto com células T CD4^{+} de animais WT GFP e a expansão de células T CD4^{+} GFP positivas e negativas foi avaliada 10 dias após a reconstituição. (A) *Contour plot* representativo de 1 animal/grupo mostrando a porcentagem de células T CD4^{+} GFP positivas e negativas no baço dos animais Rag$^{-/-}$ reconstituídos. (B) Gráfico em barra da porcentagem de células T CD4^{gfp+} e CD4^{gfp-} presentes baço dos animais reconstituídos. Dados mostrados como media ± erro padrão. Resultado representativo de 1 experimento. N = 3 animais/grupo.

Até o momento observamos diversas ações da leptina em células T CD4^{+} que, em conjunto, poderiam levar a um aumento da sobrevida do enxerto. Entretanto, para confirmarmos se a modulação do *pool* de células T CD4^{+}, na ausência da leptina, é responsável pela maior sobrevida do enxerto de pele, transferimos células T CD4^{+} esplênicas de animais Lep$^{ob/ob}$, Lep$^{db/db}$ ou de animais WT em camundongos Rag$^{-/-}$ C57BL/6 transplantados com enxerto de pele proveniente de camundongos CBA. Observamos que os animais reconstituídos com células T CD4^{+} provenientes de animais Lep$^{db/db}$ tiveram uma maior sobrevida do enxerto de pele comparativamente a animais reconstituídos com células T CD4^{+} de animais WT e de animais Lep$^{ob/ob}$ (Figura 17A). Também observamos uma menor porcentagem de células T CD4^{+} no

linfonodo drenante dos animais reconstituídos com células T CD4+ Lep$^{db/db}$ comparativamente a animais Rag$^{-/-}$ reconstituídos com células T CD4+ Lep$^{ob/ob}$ e WT (Figura 15B e 15C).

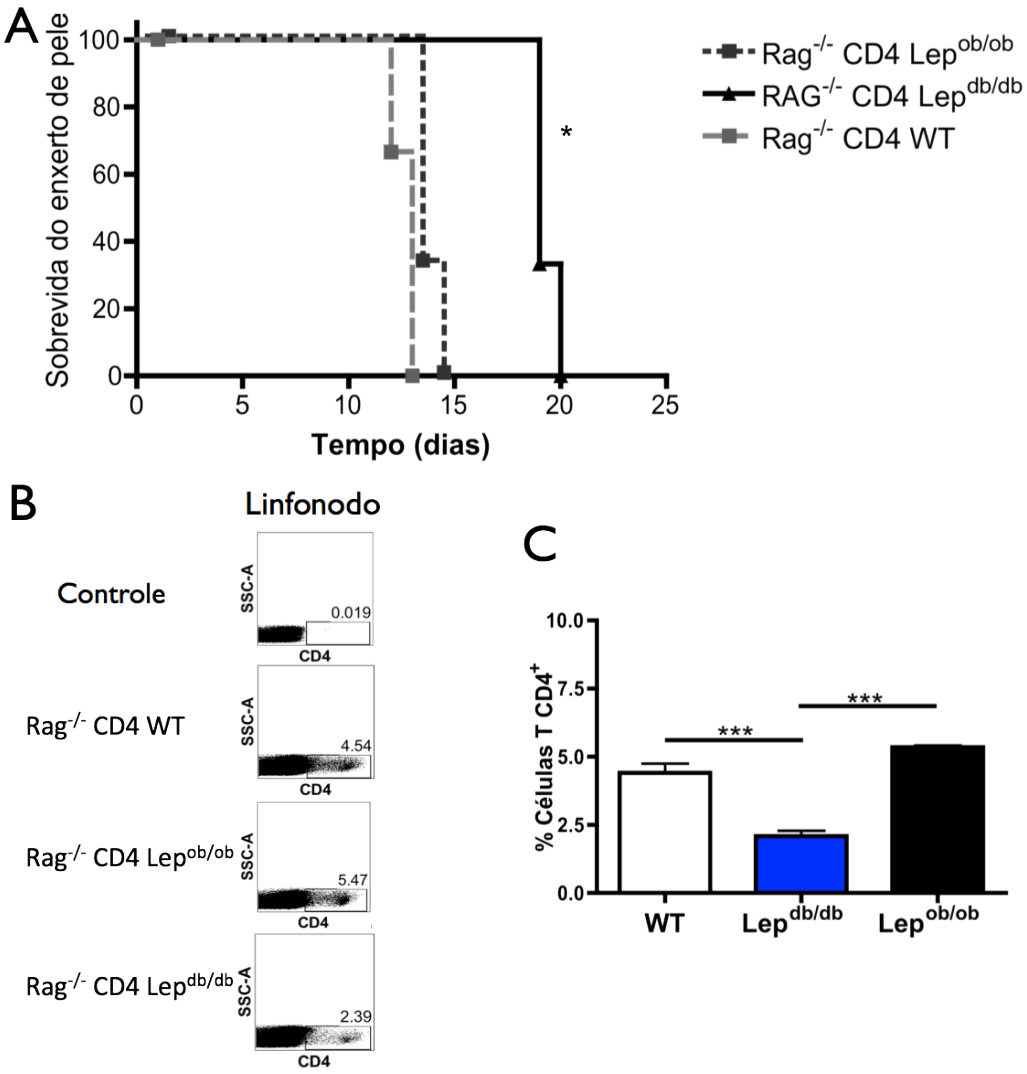

Figura 17. Sobrevida do enxerto de pele em animais Rag$^{-/-}$ reconstituídos com células T CD4+ de animais Lep$^{ob/ob}$, Lep$^{db/db}$ e WT. (A) Peles de camundongos CBA foram transplantadas em camundongos Rag$^{-/-}$ reconstituídos com células T CD4+ provenientes de camundongos WT, Lep$^{ob/ob}$ ou Lep$^{db/db}$ e os enxertos avaliados diariamente por sinais de rejeição. Foi considerado perda do enxerto quando apenas 10% do enxerto permaneceu no animal enxertado. (B) *Dot plot* representativo de 1 animal/grupo mostrando a porcentagem de células T CD4+ presentes no linfonodo dos animais transplantados. (C) Gráfico em barra da porcentagem de células T CD4+ presentes linfonodo (LN) dos animais transplantados. Dados mostrados como media ± erro padrão. Resultado representativo de 1 dos 2 experimento independentes realizados com 3 animais/grupo. * ($p<0.05$), *** ($p<0.001$).

Em conjunto, esses dados indicam que a leptina é um importante mediador da resposta aloimune e um importante regulador da homeostasia de células T $CD4^+$. Entretanto, ao compararmos a sobrevida do enxerto de pele entre os animais $Lep^{ob/ob}$ (Figura 3A) e os animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos com células T $CD4^+$ provenientes de camundongos $Lep^{db/db}$ (Figura 17A), observamos que a sobrevida do enxerto de pele nos camundongos $Lep^{ob/ob}$ foi maior. Assim, outros mecanismos somados aos observados nas células T $CD4^+$ parecem contribuir para essa maior sobrevida observada.

5.3 A LEPTINA MODIFICA FENOTIPICAMENTE E FUNCIONALMENTE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como as DC são as grandes responsáveis por ditar como a imunidade adaptativa será montada e orquestrada, decidimos primeiramente avaliar como a leptina modularia essa população celular. Consideramos como DC células $CD11c^+$. Embora sem diferença estatística, encontramos que animais $Lep^{ob/ob}$ parecem possuir diferenças visíveis na frequência de células $CD11c^+$, no linfonodo tanto de animais transplantados como não transplantados (Figura 4B e 4D), sugerindo que um defeito na função de DC também pode ter importância na resposta aloimune. Assim, derivamos DC de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT. No sétimo dia de cultura, DC imaturas (iDC) foram obtidas. Para obtenção de DC maduras (mDC), as iDCs foram ativadas, no sétimo dia de cultura, com LPS por 48 horas, conforme esquematizado na Figura 18.

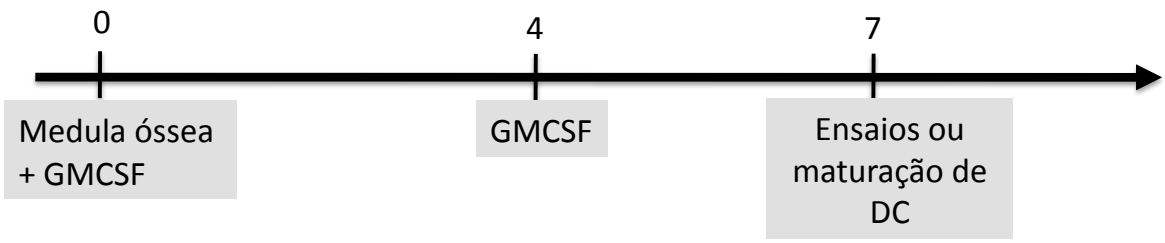

Figura 18. Protocolo de geração de células dendríticas derivadas de medula óssea. As células de medula óssea foram cultivadas por um período de 4 dias na presença de GM-CSF. No quarto dia, trocou-se o meio e adicionou-se mais GMCSF. Ao fim de 7 dias de cultura células dendríticas imaturas foram obtidas. No sétimo dia uma parte das células foi avaliada fenotipicamente, por citometria de fluxo, e usadas em ensaios de proliferação e diferenciação de células T reguladoras e Th17. No sétimo dia, as células dendríticas imaturas foram maturadas com LPS (lipopolissacarídeo) e posteriormente utilizadas para ensaios de proliferação.

Foram consideradas como DC as células $CD11c^{+}MHCII^{+}$ e a eficiência na geração das iDC e das mDC analisada por citometria de fluxo. Em todas as condições foi possível observar a geração de DC. Entretanto, na ausência de leptina, uma menor eficiência nessa geração, tanto para iDC como para mDC, foi observada (Figura 19). Confirmada a geração de BMDC, iDCs foram purificadas e analisadas quanto ao seu perfil transcricional por PCR em tempo real *array*. Utilizamos uma placa contendo genes relacionados com a apresentação de antígenos e com importantes funções nas DC. Observamos que a ausência de leptina alterou o perfil de genes relacionados com apresentação de antígenos e com a função de DC comparativamente a DC de animais WT (Figura 20A). Esse perfil de genes pode ser revertido pela adição de leptina recombinante durante o processo de geração das DC (Figura 20B). Alguns dos genes regulados positivamente ou regulados negativamente foram analisados individualmente e observou-se que DC de animais $Lep^{ob/ob}$ apresentaram uma menor expressão de genes relacionados ao MHC-II (H2-Dma), à co-estimulação (CD40, CD80, CD86), à sinalização via NF-κB (NF-κB2 e RelB) e de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-12) (Figura 20C) .

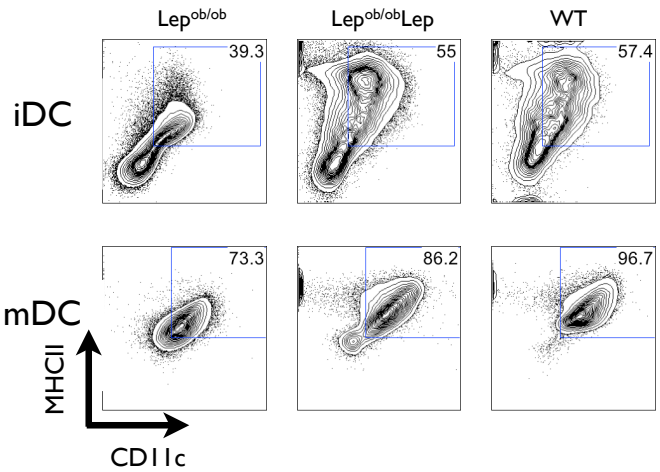

Figura 19. Avaliação da eficiência de geração de células dendríticas derivadas de medula óssea. iDC e mDC foram obtidas nos dias 7 e 9, respectivamente, de animais Lep$^{ob/ob}$, derivadas com (Lep$^{ob/ob}$Lep) ou sem (Lep$^{ob/ob}$) a adição de leptina recombinante, e de animais normais (WT). Foram consideradas células dendríticas as células duplo positivas CD11c^{+} e MHC-II^{+}. Dado representativo de 1 dos 5 experimentos independentes realizados.

Confirmamos os resultados obtidos no *array* com a análise de algumas proteínas. Tanto as iDC como as mDC foram analisadas quanto à expressão de MHC-II e das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 (Figura 21). Observamos que a ausência de leptina alterou o fenótipo tanto de iDC como de mDC derivadas de medula óssea. As iDC e as mDC derivadas de animais Lep$^{ob/ob}$ apresentaram uma menor expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CD40 (Figura 21A). Observamos que enquanto as mDC de animais selvagens aumentaram a expressão de MHC-II e de moléculas co-estimuladoras comparativamente as iDCs, as mDC derivadas de animais Lep$^{ob/ob}$ não foram capazes de modular a expressão dessas moléculas (Figura 21A). Esse resultado indica que a ausência da leptina altera o perfil de BMDC. Contudo, para assegurarmos que o efeito da leptina era no processo de diferenciação e não uma alteração pré-estabelecida nas células progenitoras da medula óssea, realizamos o mesmo experimento de geração de DC, provenientes de progenitores da medula óssea, de animais deficientes em leptina, com e sem a adição de leptina recombinante ao ensaio. Observamos que a adição de leptina recombinante reverteu o fenótipo observado sem leptina, com aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC-II tanto nas iDC como nas mDC (Figura 21B).

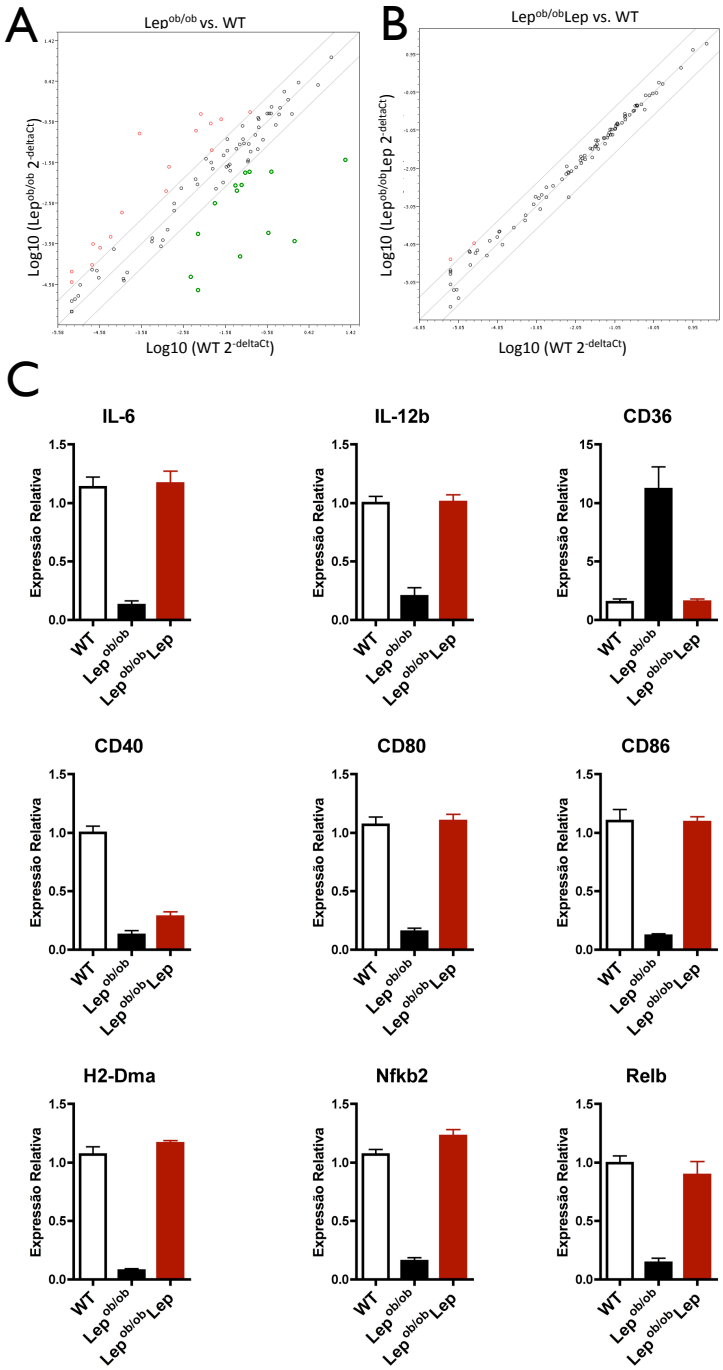

Figura 20. Avaliação da expressão genes relacionados com apresentação de antígeno e com a função de células dendríticas. No sétimo dia de cultura, mRNA foi extraído de iDCs derivadas de medula óssea e o cDNA obtido. O cDNA foi utilizado em um PCR em tempo real *array*. (A) *Scatter plot* dos genes expressos por iDC de animais Lep$^{ob/ob}$ relativamente a iDC de animais WT. (B) *Scatter plot* dos genes expressos por iDC de animais Lep$^{ob/ob}$ derivadas com leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$Lep) relativamente a iDC de animais WT. Vermelho - genes regulados positivamente. Verde – genes regulados negativamente. Preto – genes não modulados. (C) Gráfico em barra das moléculas reguladas positivamente e negativamente avaliadas individualmente. A expressão relativa foi realizada com 5 diferentes controles endógenos do kit de *array* e analisados pelo *software* da empresa fabricante disponibilizado eletronicamente, conforme descrito nos materiais e métodos. Dado representado como media ± erro padrão.

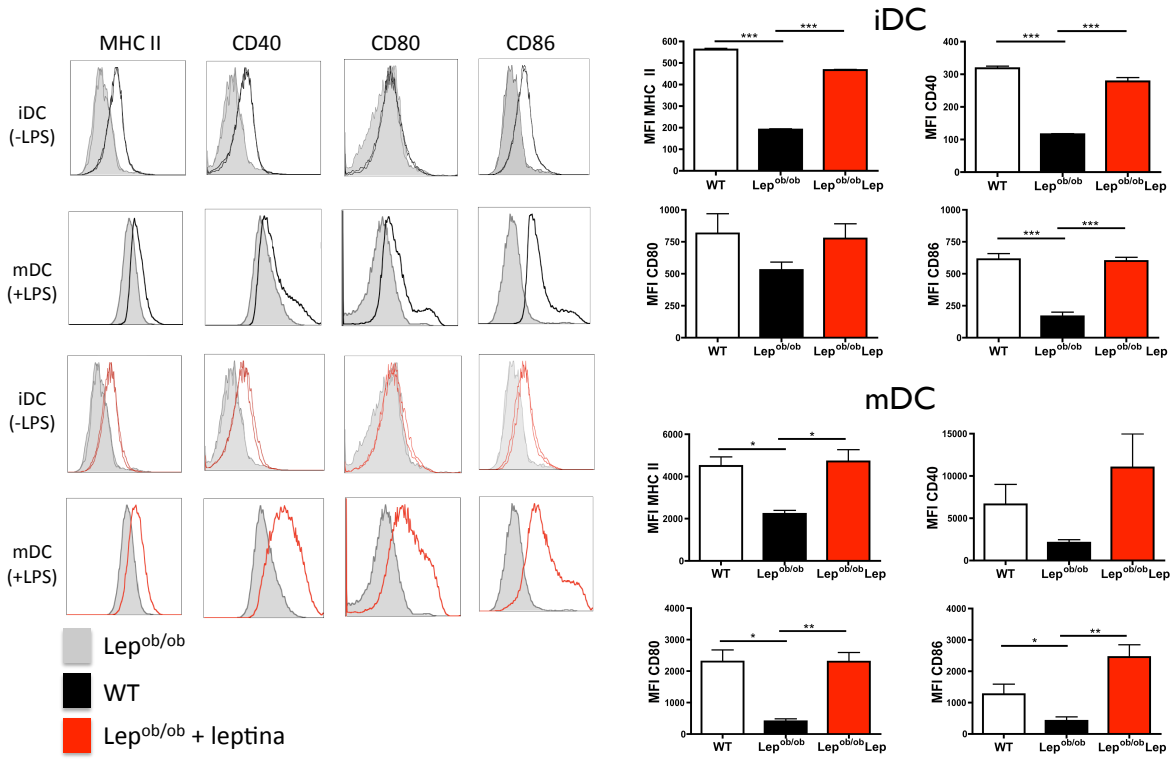

Figura 21. Avaliação da expressão de moléculas de coestimulação e de MHC II em células dendríticas derivadas de medula óssea. (A) iDC e mDC derivadas de medula óssea nos dias 7 e 9, respectivamente, de animais Lep$^{ob/ob}$ (cinza) e selvagens (WT) (preto). Foram avaliadas as expressões das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 e MHC de classe II, por citometria de fluxo. A população de DC foi selecionada na região de células CD11c positivas. (B) iDC e mDC derivadas de medula óssea, na presença ou na ausência de leptina recombinante, nos dias 7 e 9, respectivamente, de animais Lep$^{ob/ob}$ foram avaliadas quanto as expressões de CD40, CD80, CD86 e de MHC de classe II. (C-D) Gráficos em barra das expressões das moléculas coestimuladoras e MHC de classe II, de iDC e mDC, são mostrados como MFI (mediana de intensidade de fluorescência, do inglês, *median fluorescence intensity*). Dado apresentados como media ± erro padrão. Dado representativo de 1 dos 5 experimentos independentes realizados. * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), ***($p<0.001$).

A produção de citocinas pelas BMDC também foi analisada. Observamos que células dendríticas derivadas de animais Lep$^{ob/ob}$ produziram menores níveis de IL-12(p40), de IL-6 e de TNF comparativamente a BMDC Lep$^{ob/ob}$Lep e WT (Figura 22A). Em conjunto, esses dados sugerem que na ausência de sinais desencadeados pela leptina, a célula dendrítica apresenta um perfil mais tolerogênico, com menor expressão de MHC-II e de moléculas co-estimuladoras, assim como menor produção de citocinas pró-inflamatórias.

Um fator importante nas DC tolerogênicas é a produção/expressão de moléculas imunorreguladoras/supressoras. Dessa forma, analisamos a expressão gênica de IDO, PDL-1 e IL-10. Observamos que BMDC Lep$^{ob/ob}$ expressaram baixos níveis de IDO e PDL1 e não houve diferença na expresão de IL-10, comparativamente a DC de Lep$^{ob/ob}$Lep e de WT (Figura 22B), excluindo essas moléculas como possíveis mecanismos imunorreguladores das DC. Entretanto, ao analisarmos a produção de TGF-β bioativo, tanto nas iDC como nas mDC, observamos que DCs derivadas na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) produzem maiores quantidades de TGF-β bioativo, comparativamente às condições com leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$Lep) e WT (Figura 22C). Esse dado indica que um possível mecanismo tolerogênico dessas células dendríticas poderia ser a secreção de TGF-β e sua potencial ação na indução de células T reguladoras.

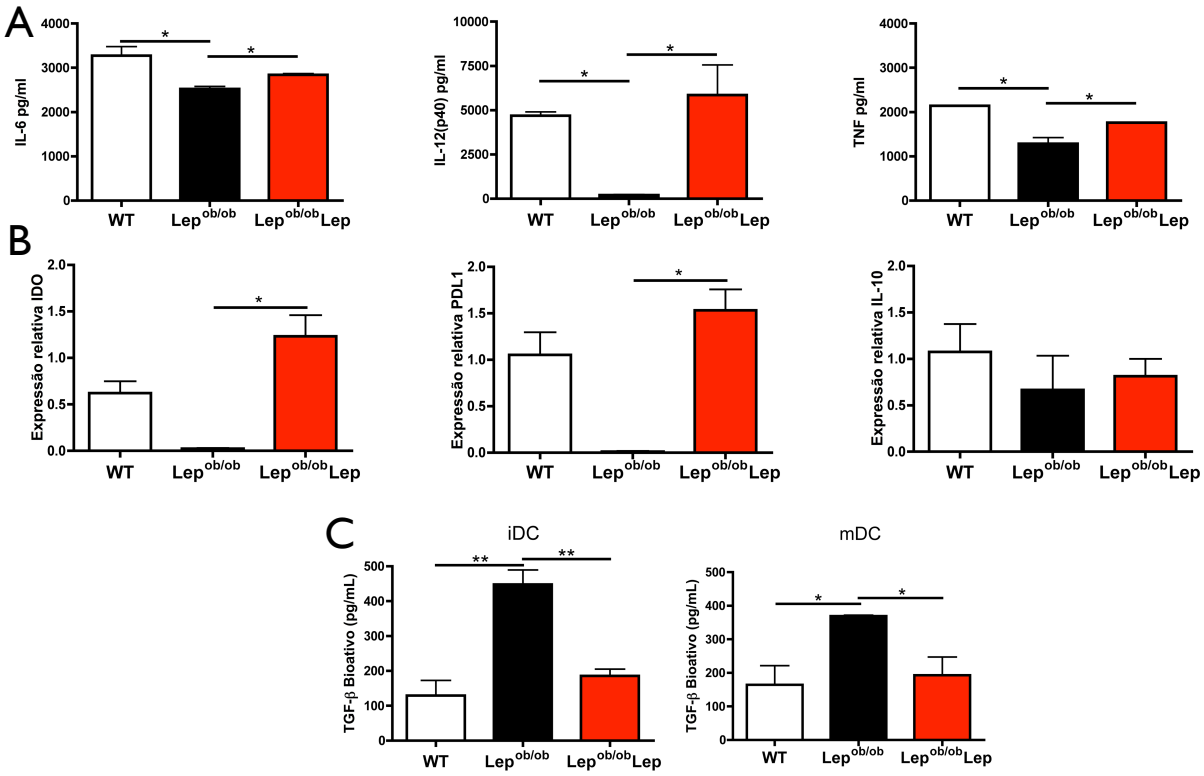

Figura 22. Produção de citocinas, moléculas imunorreguladoras e TGF-β por BMDC. (A) A produção das citocinas IL-6, IL-12(p40) e TNF foram avaliadas, no sobrenadante de cultura, por *multiplex*. (B) iDC tiveram seu mRNA extraído e a expressão de IDO, PDL1 e IL-10 mensurados relativamente ao gene endógeno GAPDH. (C) Os sobrenadantes das culturas de iDC e mDC foram obtidos no 7º e no 9º dia, respectivamente, e a concentração de TGF-β bioativo mensurado por ELISA. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. * ($p<0.05$), **($p<0.005$),***($p<0.001$).

Após a avaliação fenotípica das células dendríticas, estudamos se as alterações observadas modulariam aspectos funcionais dessas células. Dessa forma, as mDC foram avaliadas quanto a sua capacidade de induzir proliferação em células T CD4+ provenientes de animais WT. Neste ensaio, observamos que as mDC derivadas de animais Lep$^{ob/ob}$ induziram uma menor proliferação de células T CD4+ quando comparadas a mDC WT e Lep$^{ob/ob}$Lep (Figura 23A).

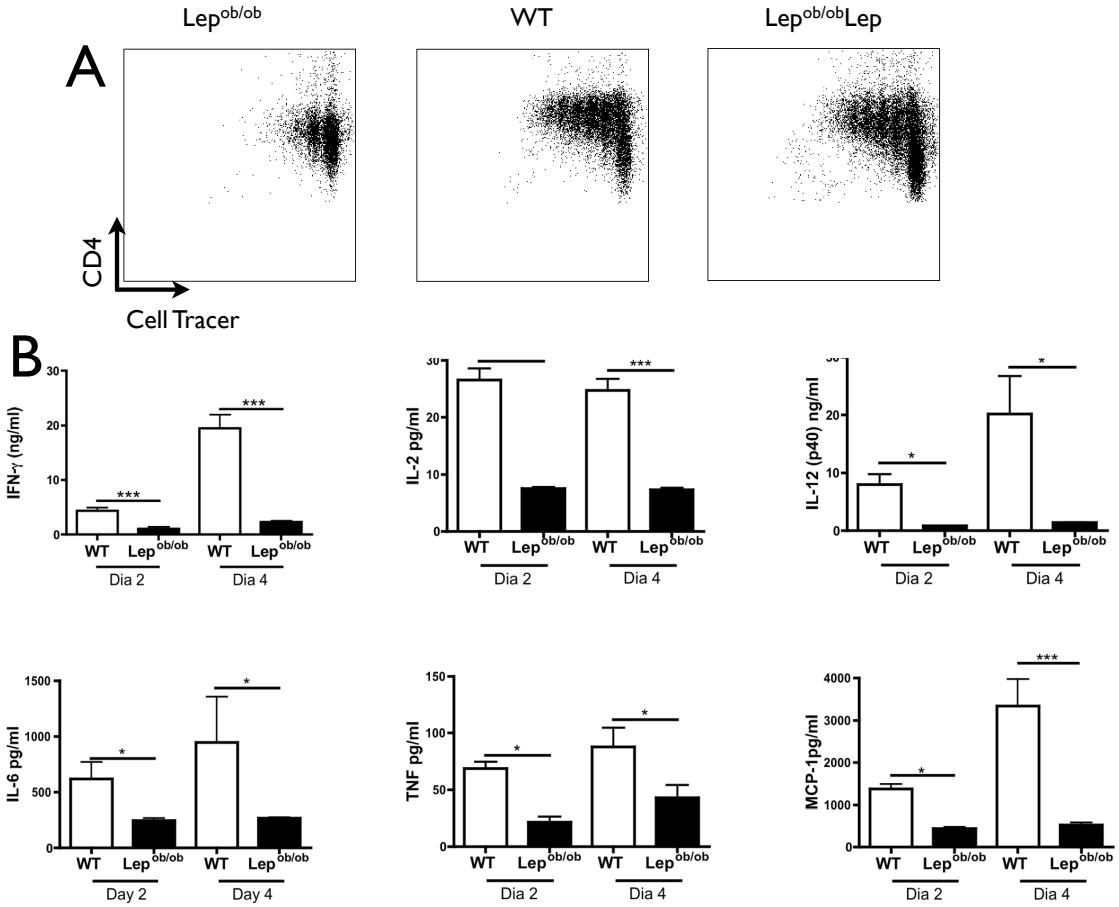

Figura 23. Ensaio de proliferação com mDC derivadas da medula óssea de animais Lep$^{ob/ob}$ e selvagens (WT). As células T CD4+ de animais C57BL/6 normais foram cultivadas com mDC derivadas de medula óssea de animais Lep$^{ob/ob}$ sem leptina e com a adição de leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$Lep) e selvagens (WT), por um período de 4 dias, e a proliferação avaliada com *Cell tracer Violet*, por citometria de fluxo. (A) *Dot plot* representativo de 1 animal de cada grupo demonstrando a proliferação de células T CD4+. (B) Produção de citocinas do padrão durante o ensaio de proliferação de células T CD4+ de animais C57BL/6 normais com mDCs derivadas de medula óssea de animais Lep$^{ob/ob}$ e selvagens (WT). A produção de citocinas foi avaliada por *multiplex* e os dados representados como média ± erro padrão. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. * ($p<0.05$), ***($p<0.001$).

A produção de citocinas e da quimiocina MCP-1 no ensaio de proliferação foram analisadas nos tempos de 48 e 96 horas e, além da menor proliferação, uma menor produção de citocinas do padrão Th1— IFN-γ, IL-2, IL-12 (p40), IL-6 e TNF — e MCP-1 foram observadas nas condições com mDC de animais $Lep^{ob/ob}$ (Figura 23B).

Após esses achados, buscamos confirmar os resultados obtidos realizando ensaios com BMDC de animais C57BL/6 deficientes no receptor de leptina ($Lep^{db/db}$). Assim, derivamos células dendríticas da medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ e WT, ativamos essas DC com LPS e analisamos tanto a expressão de MHC-II e moléculas co-estimuladoras por essas mDC como a sua capacidade em induzir proliferação em linfócitos T $CD4^+$ de animais WT C57BL/6. Primeiramente, observamos que as DC de animais $Lep^{db/db}$ expressaram menores quantidades de MHC-II e de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86), comparativamente a DC WT (Figura 24A). Além disso, as mDC derivadas de animais $Lep^{db/db}$ induziram uma menor proliferação de células T $CD4^+$ quando comparadas a mDC de animais WT (Figura 24B). Em conjunto, esses resultados mostram que as células dendríticas são diretamente afetadas pela leptina, sendo que a deficiência de leptina confere uma característica tolerogênica a essas células.

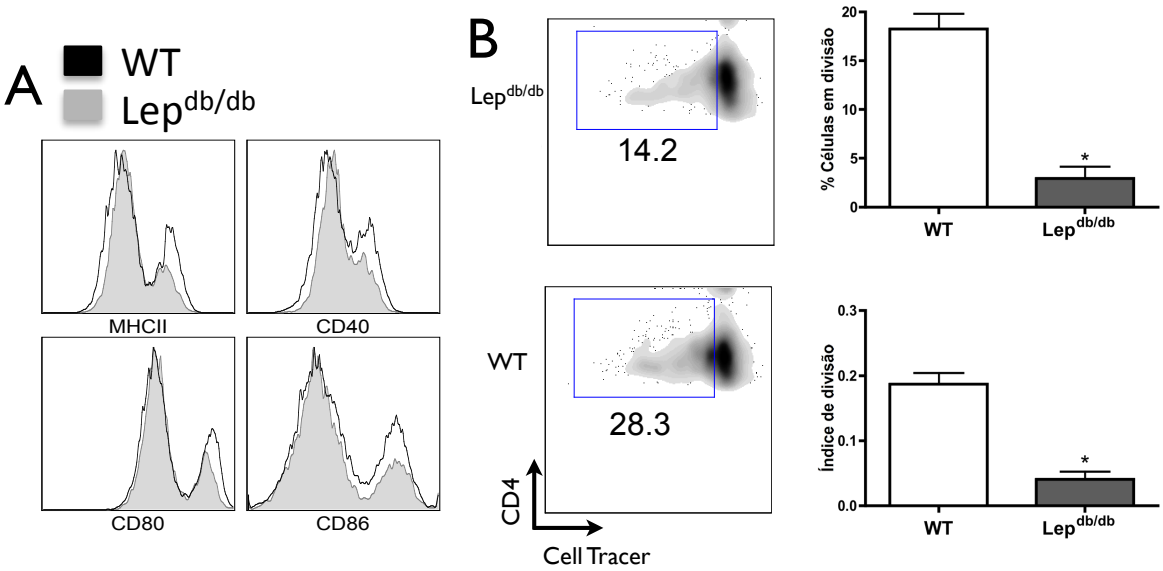

Figura 24. Avaliação da expressão de moléculas de coestimulação e de MHC II em células dendríticas derivadas de medula óssea. mDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ (cinza) e normais (WT) (preto). (A) Gráfico em histograma representando as expressões das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 e MHC classe II, por citometria de fluxo. A população de DC foi selecionada na região de células CD11c positivas. (B) Ensaio de proliferação com mDC derivadas da medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ e normais (WT). As células T $CD4^+$ purificadas de animais C57BL/6 WT foram cultivadas com mDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ e WT, por um período de 4 dias, e a proliferação avaliada com *Cell tracer Violet*, por citometria de fluxo. *Dot plot* representativo de 1 animal de cada grupo demonstrando a proliferação de células T $CD4^+$. A porcentagem de esplenócitos em divisão e o índice de divisão foram calculados pelo *software* FlowJo. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 3 animais/grupo. * ($p<0.05$).

5.4 BMDC DE ANIMAIS $LEP^{OB/OB}$ MODULAM DIFERENCIALMENTE A GERAÇÃO E A EXPANSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS

Após a caracterização das DC derivadas de medula óssea, investigamos a sua ação na geração e expansão de células T reguladoras. As iDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT foram incubadas com linfócitos T $CD4^+CD62L^+CD44^-$ $Foxp3^{gfp-}$, provenientes do camundongo $Foxp3^{gfp}$, purificados por citometria de fluxo, com pureza superior a 99%. Encontramos uma maior porcentagem de células T $CD4^+Foxp3^{gfp+}$ na condição em que se usou as iDC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$ (Figura 25A). Como as iDC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$ induziram uma maior

geração de células T reguladoras, investigamos se as iDC de animais $Lep^{ob/ob}$, geradas na presença de leptina recombinante, teriam essa atividade revertida para níveis semelhantes aos observados com iDC WT. Observamos que as iDC de animais $Lep^{ob/ob}$, geradas na presença de leptina recombinante ($Lep^{ob/ob}$Lep), induziram níveis semelhantes de células T reguladoras àqueles observados nos animais normais (WT) (Figuras 25A). Ademais, observamos anteriormente que iDC derivadas na ausência de leptina ($Lep^{ob/ob}$) secretaram maiores quantidades de TGF-β bioativo. Dessa forma, investigamos se o co-cultivo de células T $CD4^+$ *naive* com essas DC, sem a adição exógena de TGF-β, seria capaz de promover a indução de células T reguladoras. Observamos que iDC $Lep^{ob/ob}$ induziram uma maior frequência de células T reguladoras comparativamente a iDC WT e $Lep^{ob/ob}$ Lep (Figura 25B).

Encontramos que DC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$ na ausência de leptina produzem maiores concentrações de TGF-β e induzem mais eficientemente a geração de células T reguladoras. É descrito que a leptina pode atuar diretamente nas células T reguladoras e que a sua neutralização induz proliferação nas Tregs. Dessa forma, avaliamos se as DC $Lep^{ob/ob}$ seriam capazes de induzir a proliferação de células T reguladoras de forma antígeno específica. Pulsamos BMDC de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT com o antígeno MOG_{35-55} e incubamos essas células com células T $CD4^+CD62L^+$ de animais $Foxp3^{gfp}$, com TCR específico para o antígeno MOG_{35-55} (C57BL/6 2D2 $Foxp3^{gfp}$). Nesse experimento, as DC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$ induziram uma maior proliferação em células T $CD4^+Foxp3^{gfp+}$, resultado não observado com DC de animais WT (Figura 26). Esses dados indicam que, além da maior capacidade em induzir células T reguladoras, as BMDC de animais $Lep^{ob/ob}$ também induzem a expansão dessas células de forma antígeno específica. Entretanto, dois pontos ainda podem ser questionados, o primeiro é se esse processo seria realmente dependente de TGF-β e o segundo se DC teciduais, como as esplênicas, também teriam essa capacidade.

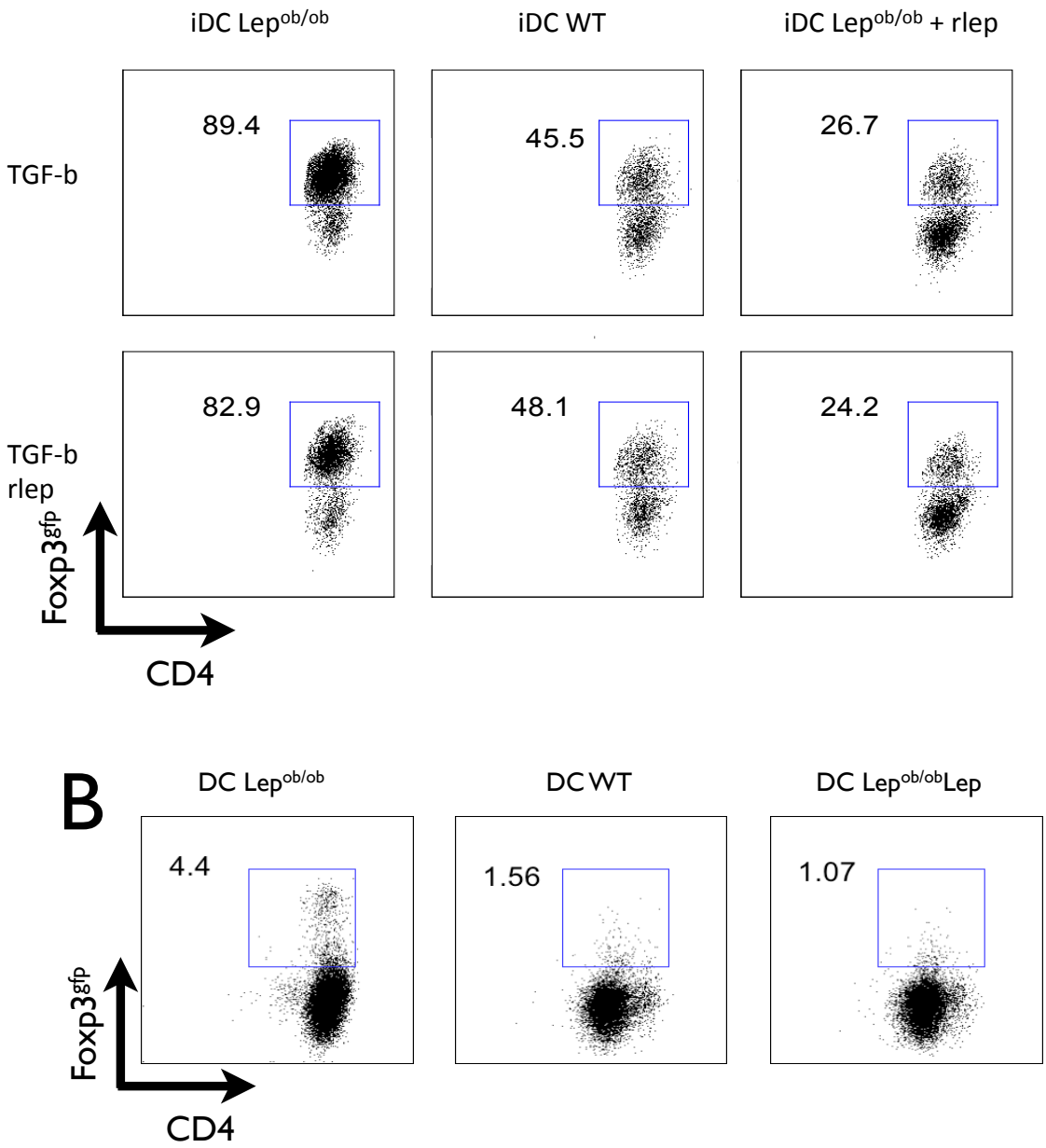

Figura 25. Geração de células T reguladoras por iDC derivadas de medula óssea. iDC de animais Lep$^{ob/ob}$ derivadas na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) ou na presença de leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$Lep) e normais (WT), ambos C57BL/6, foram cultivadas com células T *naive* CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-} purificadas, por citometria de fluxo, de camundongos Foxp3^{gfp}, também C56BL/6, por 5 dias. (A) As células foram cultivadas na presença de TGF-β ou de TGF-β e leptina recombinante (rlep). (B) Co-cultivo das iDC com células T *naive* sem a adição de TGF-β. Dado representativo de 1 dos 3 experimentos independentes realizados.

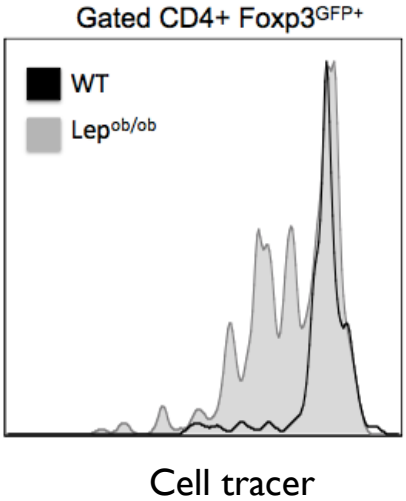

Figura 26. Avaliação da expansão de células T reguladoras pelas BMDC. As células T $CD4^+CD62L^+$ foram purificadas de animais C57BL/6 $Foxp3^{gfp}$ e co-cultivadas com iDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT, por um período de 5 dias, e a expansão de células T $CD4^+Foxp3^{gfp+}$ avaliadas com *Cell tracer Violet*, por citometria de fluxo. Histograma representativo de 1 animal de cada grupo demonstrando a proliferação de células T $CD4^+Foxp3^{gfp+}$. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 3 animais/grupo.

Buscando responder essas questões, purificamos células T $CD4^+CD62L^+$, por *beads* magnéticas, co-cultivamos essas células com BMDC e adicionamos anticorpo neutralizante anti-TGF-β. Nesse experimento, devido a separação das células T $CD4^+CD62L^+$ serem por *beads* magnéticas, obtivemos células T *naive* contendo 7% de células T reguladoras ($CD4^+Foxp3^{gfp+}$). Essa proporção de células T reguladoras torna-se importante para que possamos avaliar a expansão dessas células. A neutralização de TGF-β limitou a expansão de células T reguladoras nas condições em que foram co-cultivadas com BMDC $Lep^{ob/ob}$, comparativamente à condição com BMDC WT. Esse resultado indica que o TGF-β é o mecanismo pelo qual as BMDC $Lep^{ob/ob}$ modulam a população de células T reguladoras (Figura 27).

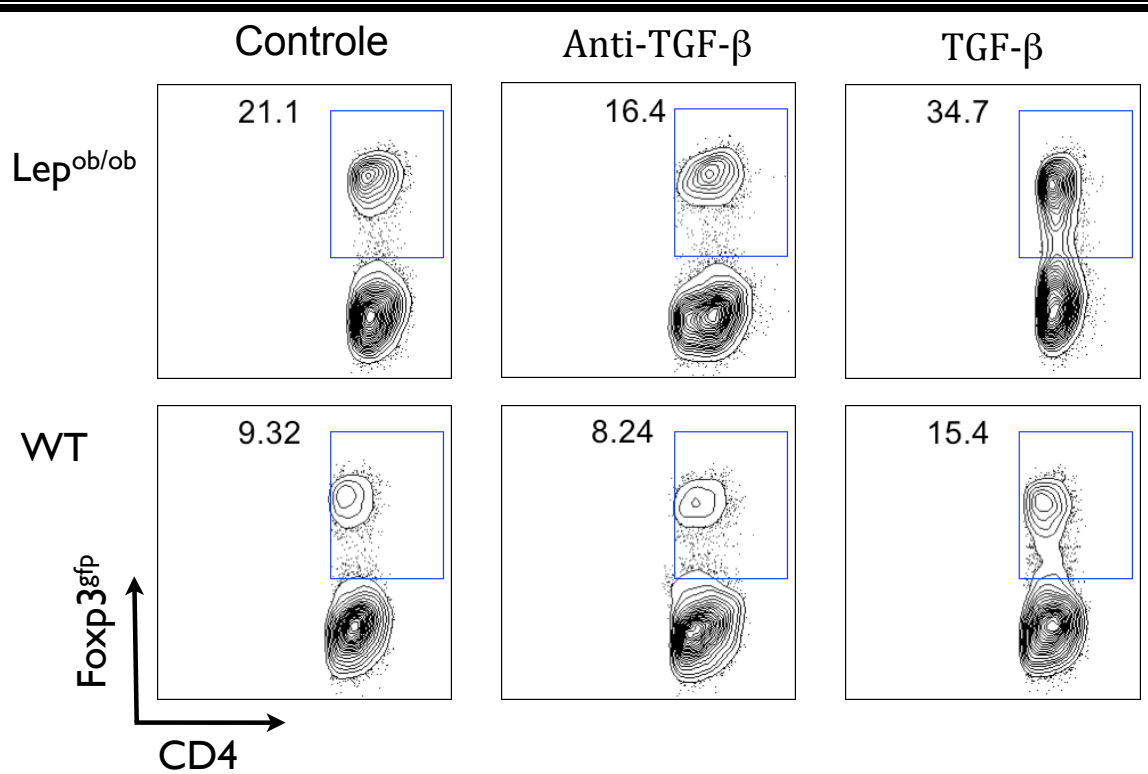

Figura 27. Avaliação da ação do TGF-β na expansão de células T reguladoras pelas BMDC. As células T $CD4^+CD62L^+$ foram purificadas de animais C57BL/6 $Foxp3^{gfp}$ e co-cultivadas com iDC derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT, por um período de 5 dias, em três condições diferentes: (i) apenas o co-cultivo de células T $CD4^+CD62L^+$ com BMDC, (ii) co-cultivo com anticorpo neutralizante anti-TGF-β e (iii) co–cultivo com TGF-β. *Dot plot* representativo de 1 animal de cada grupo. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

Outro ponto importante a ser estudado era o comportamento das células dendríticas esplênicas na indução de células T reguladoras. Nesse experimento, purificamos células $CD11c^+$ do baço de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT e co-cultivamos essas células com células T $CD4^+CD62L^+$ de animais $Foxp3^{gfp}$ *naive*, sem a adição de TGF-β. Observamos que DC de animais $Lep^{ob/ob}$ induziram uma maior geração/expansão de células T reguladoras comparativamente a DC WT de animais WT (Figura 28), indicando que as DC já diferenciadas, *in vivo*, se comportam de forma semelhante ao observado *in vitro*.

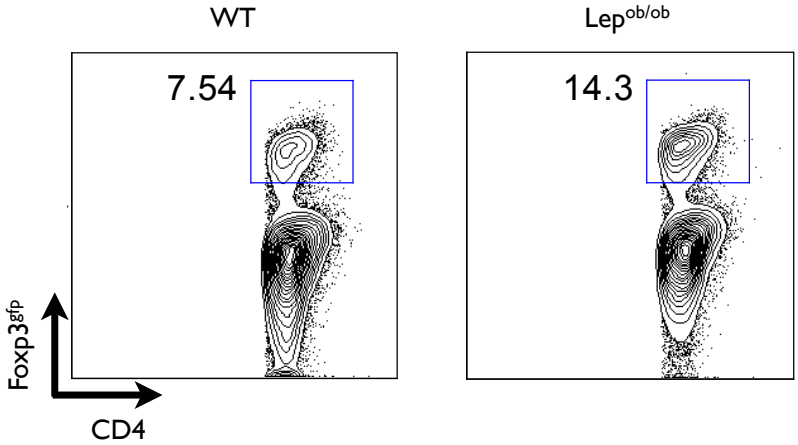

Figura 28. Avaliação da capacidade de células CD11c^{+} esplênicas na geração de células T reguladoras. Células CD11c do baço de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT foram purificadas por *beads* e co-cultivadas com células T CD4^{+}CD62L^{+} purificadas de animais C57BL/6 Foxp3^{gfp}, por um período de 5 dias, sem a adição de TGF-β. *Dot plot* representativo de 1 animal de cada grupo. Dado representativo dos 1 de 2 experimentos independentes realizados.

5.5 BMDC DE ANIMAIS LEP$^{OB/OB}$ MODULAM A PLASTICIDADE DE CELULAS T CD4^{+}

O TGF-β, além da sua importância na diferenciação de células T reguladoras, juntamente com a IL-6, induz a diferenciação de células Th17. Além disso, encontramos uma maior frequência de células T CD4^{+} produtoras de IL-17 nos animais Lep$^{ob/ob}$ transplantados. Com base na dicotomia existente entre a geração de células T reguladoras e Th17 e em nossos resultados, avaliamos a indução de células Th17 por iDC derivadas da medula óssea de animais deficientes em leptina, com (Lep$^{ob/ob}$Lep) ou sem (Lep$^{ob/ob}$) a adição de leptina recombinante, e de animais WT.

Observamos que iDC de medula óssea, geradas na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$), induzem uma maior frequência de células T CD4^{+} produtoras de IL-17 comparativamente a iDC Lep$^{ob/ob}$Lep e WT (Figura 29A). É importante destacar que, nessas condições, a adição de leptina recombinante ao ensaio de diferenciação Th17, na condição com iDC Lep$^{ob/ob}$, reduziu a indução de células T CD4^{+} produtoras de IL-17, indicando que a leptina atua tanto nas células T CD4^{+} como diretamente na capacidade das DC em gerarem células com um perfil Th17 (Figura 29A). Outro fator

importante observado foi que as DC Lep$^{ob/ob}$ induziram uma maior proliferação nas células T CD4^{+} produtoras de IL-17, sendo que a produção de IL-17 aumentou conforme a célula T proliferava (Figura 29B).

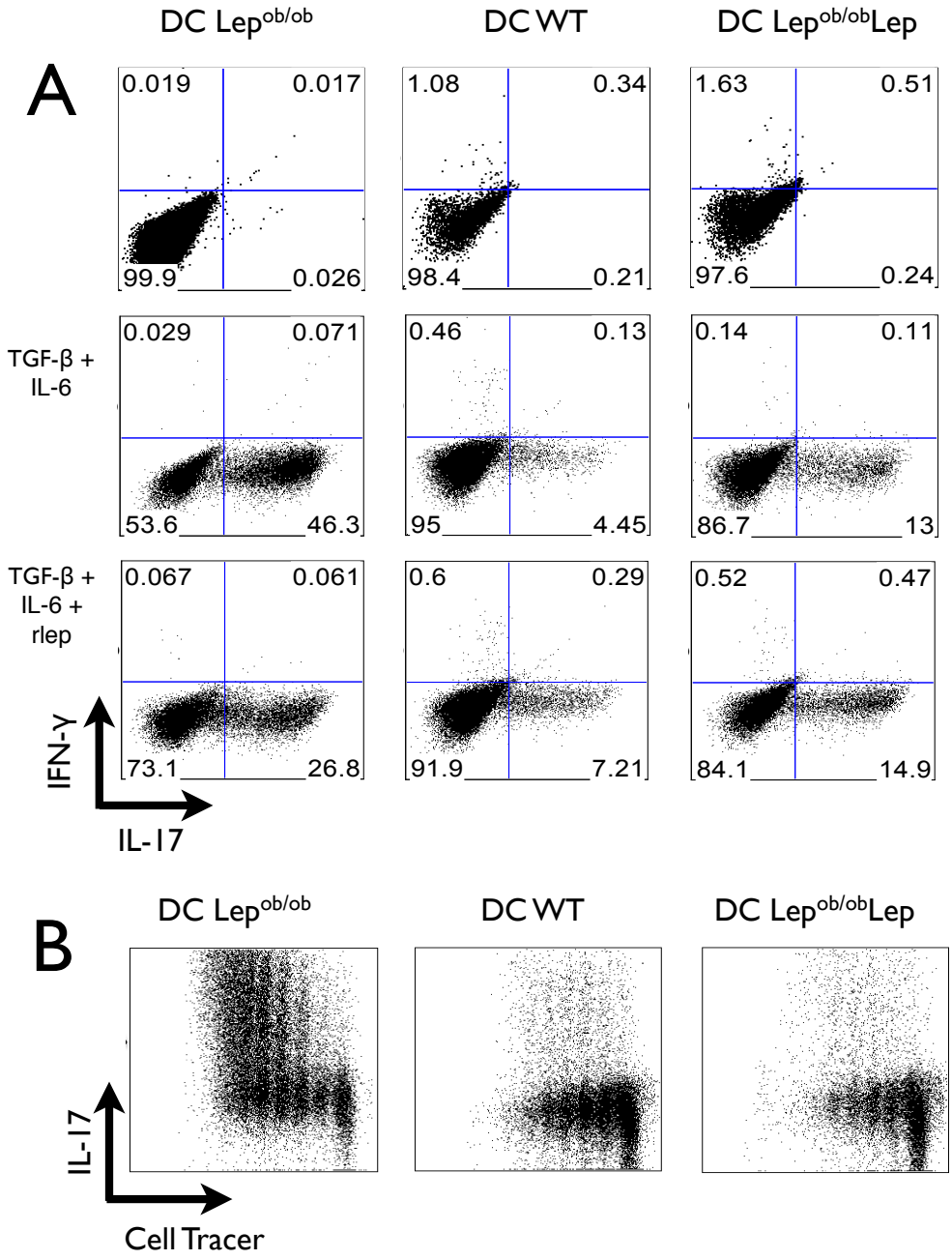

Figura 29. Geração de células Th17 por iDC de animais Lep$^{ob/ob}$ derivadas de medula óssea. iDC Lep$^{ob/ob}$ derivadas na presença (Lep$^{ob/ob}$Lep) ou na ausência (Lep$^{ob/ob}$) de leptina recombinante foram cultivadas com células T *naive* CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-}, provenientes de animais Foxp3^{gfp}, em 3 diferentes condições (i) apenas co-cultivo, (ii) IL-6 + TGF-β; (iii) IL-6 + TGF-β + leptina recombinante. (A) Células T *naive* cultivadas com iDC. (B) Células T *naive* marcadas com *Cell tracer Violet*, cultivadas com iDC na presença de IL-6 e TGF-β. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

Para nos assegurar de que estávamos induzindo células Th17 e não um outro perfil de célula T, realizamos PCR em tempo real para os fatores de transcrição RORC (RORγT), Tbx21 (T-bet), GATA-3 e Foxp3. Observamos que houve uma alta expressão de RORC e baixa expressão dos outros fatores de transcrição nas condições com DC Lep$^{ob/ob}$, indicando que estamos induzindo células com perfil Th17 (Figura 30A). É importante destacar que nas condições com maiores níveis de IL-17, também encontramos maiores expressões de RORC. A indução de células Th17 também foi confirmada por ELISA. Avaliamos a concentração de IFN-γ e IL17 e observamos que nas condições com DC Lep$^{ob/ob}$ houve uma elevada produção de IL-17 e baixos níveis de IFN-γ (Figura 30B). Em contrapartida, nas condições com DC Lep$^{ob/ob}$Lep e WT, apesar da indução de células Th17, observou-se uma menor produção de IL-17, maior expressão de RORC e maior concentração de IFN-γ.

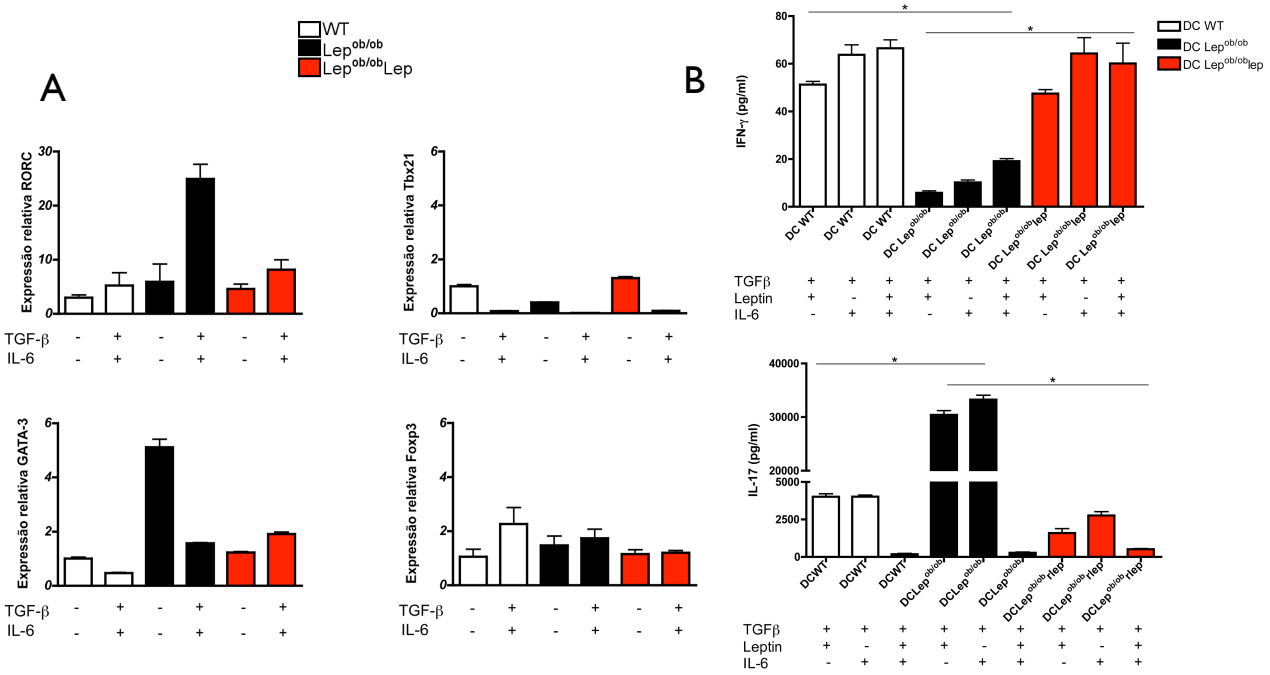

Figura 30. Expressão gênica de fatores de transcrição e da produção das citocinas IFN-γ e IL-17 por células Th17 polarizadas. Células T *naive*, purificadas por citometria de fluxo, provenientes de animais C57BL/6 Foxp3^{gfp} *knock in* WT foram co-cultivados com iDC derivadas de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT, ambos C57BL/6, e incubadas por 5 dias, com a adição de: TGF-β e IL-6; TGF-β, IL-6 e leptina ou IL-6 e leptina. (A) No quinto dia de polarização, as células T foram isoladas e a expressão gênica de RORC, Tbx21, GATA-3 e Foxp3 avaliada por PCR em tempo real. O mRNA foi normalizado com GAPDH e a expressão relativa realizada comparativamente à expressão nas células *naive* não polarizadas. (B) A produção das citocinas IL-17 e IFN-γ no sobrenadante dos ensaios de diferenciação Th17 foram avaliadas por *multiplex*. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. N = 3 animais/grupo. * ($p<0.05$).

Observamos que DC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$, na ausência de leptina, resultaram em uma maior geração tanto de células T reguladoras como Th17. Devido ao desenvolvimento recíproco entre essas duas populações, poderíamos gerar uma subpopulação de células T reguladoras produtoras de IL-17, embora os dados do PCR em tempo real não apontem para essa possibilidade. Assim, realizamos um ensaio de diferenciação Th17 cultivando BMDC $Lep^{ob/ob}$ com células T $CD4^{+}CD62L^{+}$ de animais $Foxp3^{gfp}$. Observamos que quando induzimos uma polarização para Th17 (IL-6 + TGF-β), não se observa a indução de células T reguladoras, contrariamente a condição apenas com IL-6, onde não há polarização Th17. Observamos, nessa condição, uma população de células T $CD4^{+}Foxp3^{gfp+}$, indicando que o desenvolvimento de ambos os tipos celulares não ocorre de forma conjunta (Figura 31). Também observamos que mDC de WT e de $Lep^{ob/ob}$ também foram capazes de induzir células Th17, em níveis semelhantes aos observados com iDC (Figura 32).

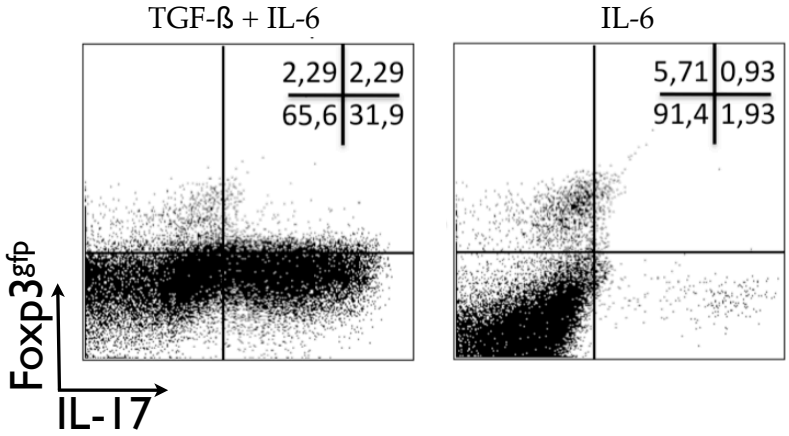

Figura 31. Geração de células Th17 por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas de medula óssea. iDCs $Lep^{ob/ob}$ derivadas na ausência de leptina recombinante foram cultivadas com células $TCD4^{+}CD62L^{+}$ provenientes de animais $Foxp3^{gfp}$ em 2 diferentes condições: IL-6 + TGF-β e apenas IL-6. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

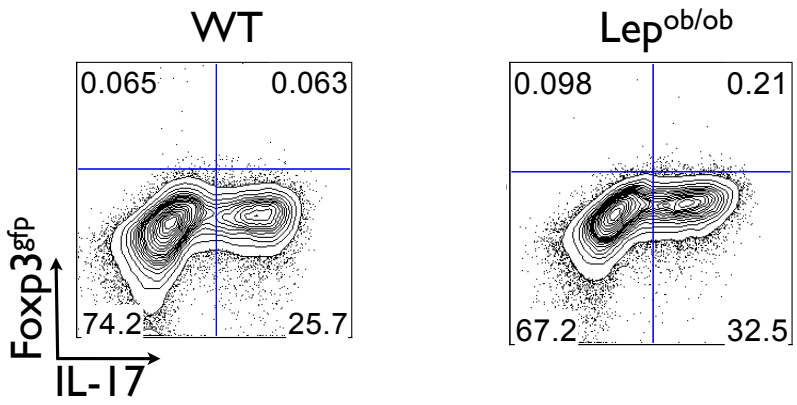

Figura 32. Geração de células Th17 por mDC derivadas de medula óssea de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT. iDCs Lep$^{ob/ob}$ e WT foram cultivadas com células T *naive*, purificadas por citometria de fluxo a partir de animais Foxp3^{gfp}. A essa co-cultura foram adicionados IL-6 e TGF. A indução de células T CD4^{+} produtoras de IL-17 foram analisadas por citometria de fluxo apos 5 dias de cultivo. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

Curiosamente, ao analisarmos a expressão dos fatores de transcrição de celulas T CD4^{+} (RORC, Foxp3, Tbx-21 e GATA-3) por células dendríticas e *naive* co-cultivadas, mas não polarizadas pela adição de citocinas, observamos que nas condições com DC Lep$^{ob/ob}$ houve uma maior expressão do fator de transcrição da GATA-3, e uma reduzida expressão de Tbx21 (Figura 30A). Esse resultado, em conjunto com a mudança para um perfil Th2 nos animais Lep$^{ob/ob}$ transplantados e pela menor produção de IL-12 pelas BMDC Lep$^{ob/ob}$ sugerem que BMDC derivadas na ausência de leptina são mais propensas a induzir uma polarização Th2 ao invés de Th1. Assim, co-cultivamos BMDC com células T CD4^{+} *naive* de animais Foxp3^{gfp}, purificadas por citometria de fluxo, em conjunto com as citocinas IL-12 e IL-2 para uma polarização Th1 ou com IL-4 para uma polarização Th2. Observamos que as iDC Lep$^{ob/ob}$ não foram capazes de induzir células T CD4^{+} produtoras de IFN-γ enquanto que as BMDC Lep$^{ob/ob}$Lep (derivadas na presença de leptina recombinante) ou BMDC WT induziram células T CD4^{+} produtoras de IFN-γ (Figura 33A). Entretanto, ao adicionarmos leptina recombinante ao ensaio de diferenciação com iDC Lep$^{ob/ob}$, observamos que, nesse contexto, houve uma elevada indução de células T CD4^{+} produtoras de IFN-γ, sugerindo que a leptina atua diretamente nas células T

CD4⁺, modulando sua polarização para um perfil Th1 (Figura 33B). Além disso, ao induzirmos uma polarização para um perfil Th2, observamos que as BMDC Lep$^{ob/ob}$ foram mais eficientes em induzir células T produtoras de IL-4 em comparação às BMDC Lep$^{ob/ob}$Lep (Figura 33C).

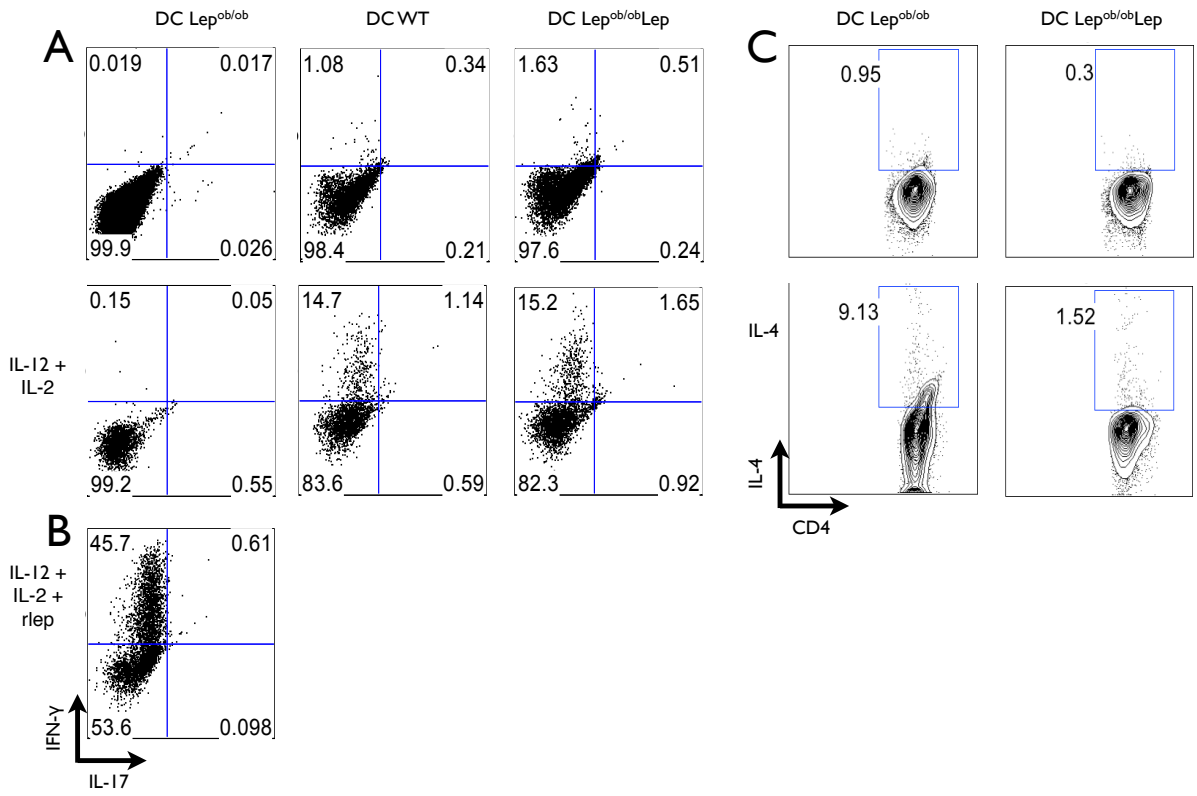

Figura 33. Geração de células Th1 e Th2 por iDCs de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT derivadas de medula óssea. (A) iDC Lep$^{ob/ob}$ derivadas na presença (Lep$^{ob/ob}$Lep) ou na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) recombinante e WT foram cultivadas com células T *naive* CD4⁺CD62L⁺CD44⁻Foxp3^{gfp-}, provenientes de animais Foxp3^{gfp}, em 3 diferentes condições para polarização Th1 (1) apenas co-cultivo; (2) IL-2 + IL-12; (3) (B) IL-2 + IL-12 + leptina recombinante (rlep). Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados. (C) iDC Lep$^{ob/ob}$ derivadas na presença (Lep$^{ob/ob}$Lep) ou na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) recombinante foram cultivadas com células T *naive* CD4⁺CD62L⁺CD44⁻Foxp3^{gfp-}, provenientes de animais Foxp3^{gfp}, em 2 diferentes condições para polarização Th2 (1) apenas co-cultivo, (2) IL-4. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

5.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DEFICIENES EM LEPTINA MODULAM A GERAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS E TH17

Nossos resultados indicam que a leptina interfere no desenvolvimento de células T reguladoras e Th17. Para confirmarmos, de fato, esses achados, realizamos experimentos de diferenciação para células T reguladoras e Th17 com células dendríticas derivadas da medula óssea de animais da linhagem BALBc deficientes para o receptor de leptina ($Lep^{db/db}$) comparativamente aos animais WT, também BALBc. BMDC $Lep^{db/db}$ e WT foram co-cultivadas com células T $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}$ $Foxp3^{gfp-}$ *naive* provenientes de animais BALBc $Foxp3^{gfp}$, na presença de citocinas polarizadoras para células T reguladoras (TGF-β) ou para células Th17 (IL-6 e TGF-β). Observamos que DC $Lep^{db/db}$ induziram tanto uma maior diferenciação de células T reguladoras (Figura 34A) quanto de células T $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ (Figura 34B). Ademais, é importante destacar que nesse ensaio, uma maior freqüência de células T $CD4^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ foram observadas na condição com DC WT, corroborando nossos dados anteriores em que a leptina é importante na indução de IFN-γ por células T $CD4^{+}$.

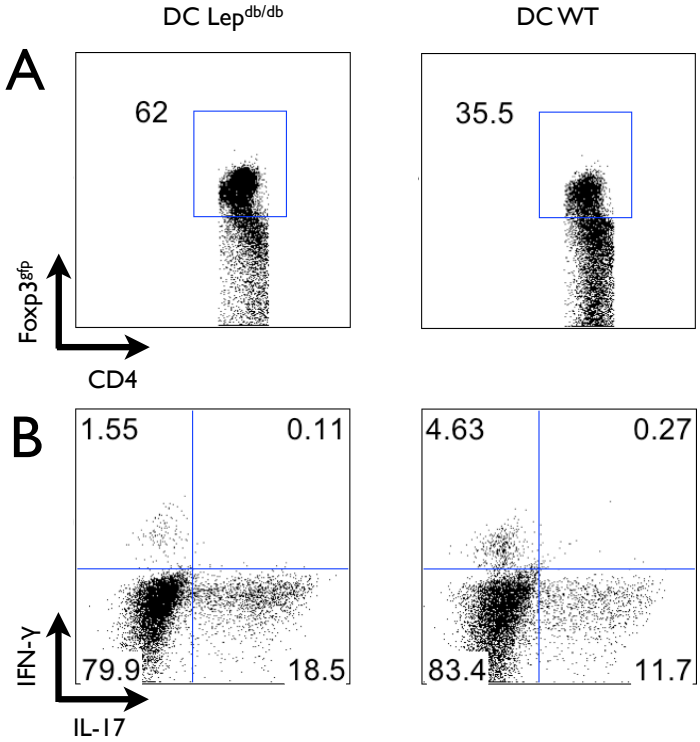

Figura 34. Geração de células T reguladoras e Th17 por iDC derivadas de medula óssea. iDC de animais $Lep^{db/db}$ e WT, ambos BALBc, foram cultivadas com células T *naive* $CD4^{+}CD62L^{+}CD44^{-}Foxp3^{gfp-}$ purificadas, por citometria de fluxo, de camundongos $Foxp3^{gfp}$, também BALBc, por 5 dias. (A) As células foram cultivadas na presença de TGF-β para indução de células T reguladoras. (B) As células foram cultivadas na presença de IL-6 e TGF-β para indução de células Th17. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

5.7 A LEPTINA, *IN VIVO*, MODULA CÉLULAS T CD4 PRODUTORAS DE IL-17, CÉLULAS T REGULADORAS E AUMENTA A DTH

Após os resultados *in vitro*, investigamos se essas diferenças poderiam resultar em alterações *in vivo*. Analisamos a população de células T reguladoras e de células T $CD4^+CD44^+$ produtoras de IL-17 presentes, *ex vivo*, nos linfonodos de animais $Lep^{ob/ob}$ comparativamente a animais WT. Analisamos a expressão intracelular do fator de transcrição Foxp3 em células T $CD4^+$ expressando a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e o receptor de folato 4 (FR4) (Figuras 35A e 35C). Observamos que os animais deficientes em leptina possuem uma maior frequência, nos linfonodos, de células T $CD4^+FR4^+CD25^+Foxp3^+$ quando comparados aos animais WT (Figura 33A), corroborando nossos dados anteriores em que observamos uma maior indução de células T reguladoras por iDC derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$. Ademais, a análise de células T $CD4^+CD44^+$ produtoras de IL-17, no linfonodo mesentérico, mostrou que animais $Lep^{ob/ob}$ possuem uma maior frequência dessas células em comparação aos animais WT (Figura 35B e 35C).

Nossos resultados, *in vitro*, mostram que na ausência de leptina, as células dendríticas de animais $Lep^{ob/ob}$ promovem uma maior geração de células Th17 e uma maior geração e expansão de células T reguladoras. Além disso, encontramos, *ex vivo*, que animais $Lep^{ob/ob}$ apresentam frequências aumentadas de células T reguladoras e de células T $CD4^+$ de memória produtoras de IL-17. Dessa forma, buscamos avaliar se, *in vivo*, a leptina poderia inibir ambas as populações celulares em um animal WT. Com essa finalidade, imunizamos animais $Foxp3^{gfp}$ com o antígeno MOG_{35-55} e CFA. Em um dos grupos adicionamos a essa emulsão 100 μg de leptina recombinante e analisamos o linfonodo drenante 7 dias após a imunização. Investigamos a produção das citocinas IL-17 e IFN-γ por células T $CD4^+$ assim como a frequência de células T reguladoras e de células $CD11c^+$ (Figura 36). Observamos que os animais imunizados com MOG_{35-55} juntamente com leptina tiveram uma menor frequência de células T

CD4⁺ produtoras de IL-17 e de células T CD4⁺ que expressavam Foxp3 (Figura 36A-B e 36D). Nesses animais, uma maior frequência de células CD11c⁺ também foi encontrada no linfonodo drenante (Figura 36C e 36D). Não encontramos diferenças na produção de IFN-γ, embora a relação entre células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ e de IL-17 tenha sido modificada.

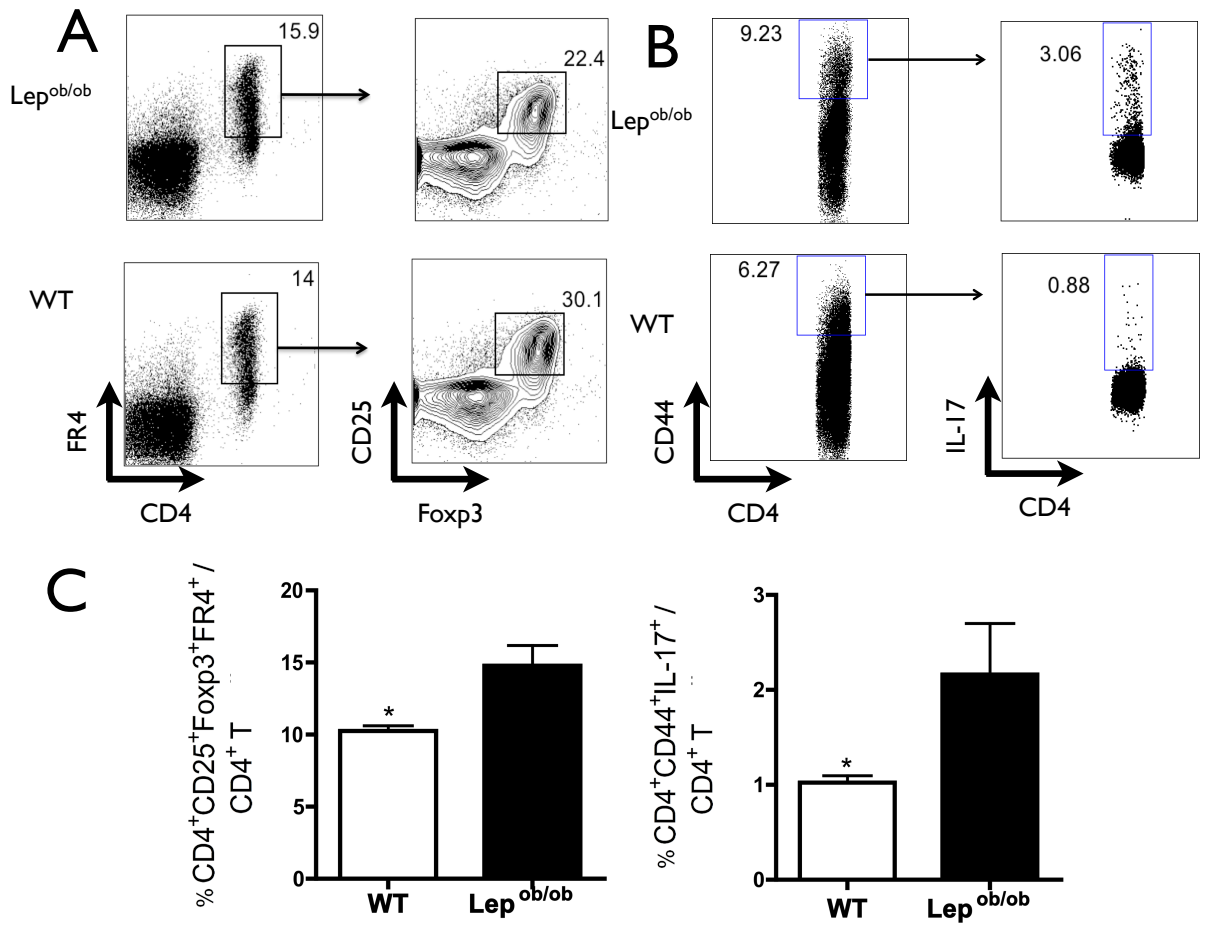

Figura 35. Análise da expressão de Foxp3 em células T CD4⁺FR-4⁺CD25⁺ e da frequência de células T CD4⁺ de memória produtoras de IL-17. (A) *Dot plot* representativo de células obtidas de linfonodos de animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e animais WT. Delimitou-se uma região de células T CD4⁺FR-4⁺ e, dentro dessa região, analisou-se a porcentagem de células T CD25⁺Foxp3⁺. (B) *Dot plot* representativo de células obtidas de linfonodos mesentéricos de animais deficientes em leptina (Lep$^{ob/ob}$) e animais WT. Delimitou-se uma região de células T CD4⁺CD44⁺ e, dentro dessa região, analisou-se a porcentagem de células T CD4⁺IL-17⁺. (C) Gráfico em barra da porcentagem de células T CD4⁺FR4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD44⁺IL-17⁺. Resultado representativo de 1 dos 2 experimentos realizados com um número de 3 animais por grupo. Resultado demonstrado como média ± erro padrão. * ($p<0.05$).

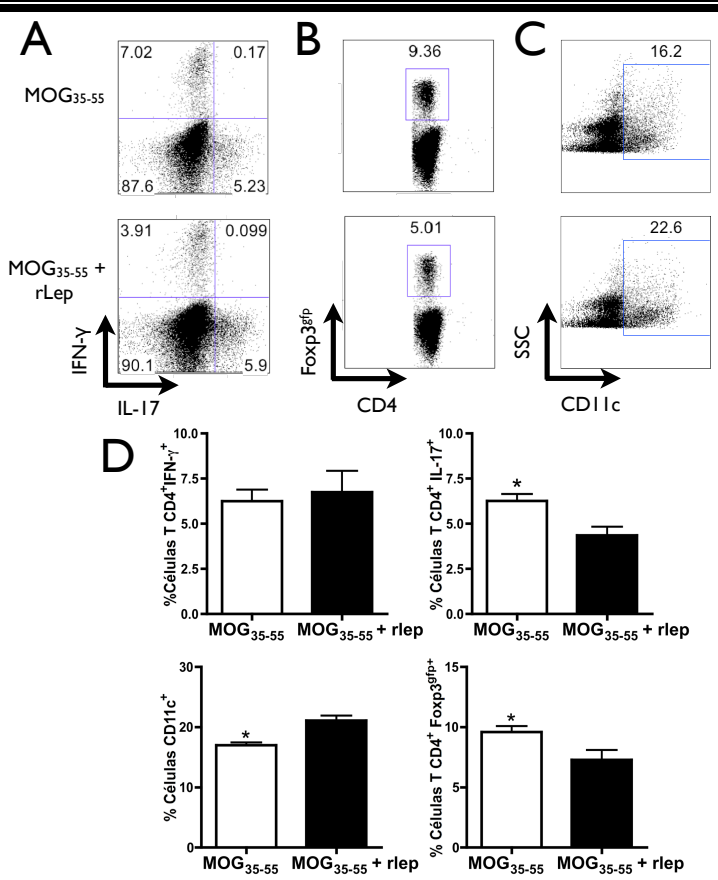

Figura 36. A leptina modula, *in vivo*, a frequência de células CD4+IL-17+, CD11c+ e T reguladoras. Animais C57BL/6 Foxp3gfp foram imunizados com MOG35-55 e CFA. Um grupo de 5 animais foi imunizado com MOG, CFA e 100 μg de leptina e outro grupo apenas com MOG e CFA. O linfonodo drenante dos animais foi analisado 7 dias após a imunização. (A) *Dot plot* representativo de 1 animal mostrando a frequência de células T CD4+ IL-17+ e CD4+ IFN-γ+. (B) *Dot plot* representativo de 1 animal mostrando a freqüência de células TCD4+ Foxp3gfp+. (C) *Dot plot* representativo de 1 animal mostrando a freqüência de células CD11c+. (D) Gráfico em barra da frequência de células T CD4+ IL-17+, CD4+Foxp3gfp+, CD4+ IFN-γ+ e CD11c+, no linfonodo drenante, 7 dias após a imunização. Dados representados como media ± erro padrão. N=5 animais/grupo. * ($p<0.05$).

Para assegurarmos que esses resultados são devido a uma resposta antígeno específica, realizamos o mesmo protocolo de imunização em animais transgênicos Foxp3gfp com o TCR especifico para o antígeno MOG35-55. No 7º dia após a imunização retiramos os linfonodos drenantes, isolamos as células mononucleares e as cultivamos por um período de 3 dias na presença do antígeno MOG35-55, para avaliação de uma resposta antígeno específica. No terceiro dia, adicionamos brefeldina e incubamos a cultura celular por um período de 5 horas e, posteriormente, analisamos a produção intracelular das citocinas IL-17 e IFN-γ pelas células T CD4+, assim como a frequência de células T reguladoras. Observamos,

agora de forma antígeno específica, que os animais que foram imunizados com MOG_{35-55} e leptina recombinante apresentaram uma menor frequência tanto de células T reguladoras como de células T $CD4^+IL\text{-}17^+$ (Figura 37A e 37B).

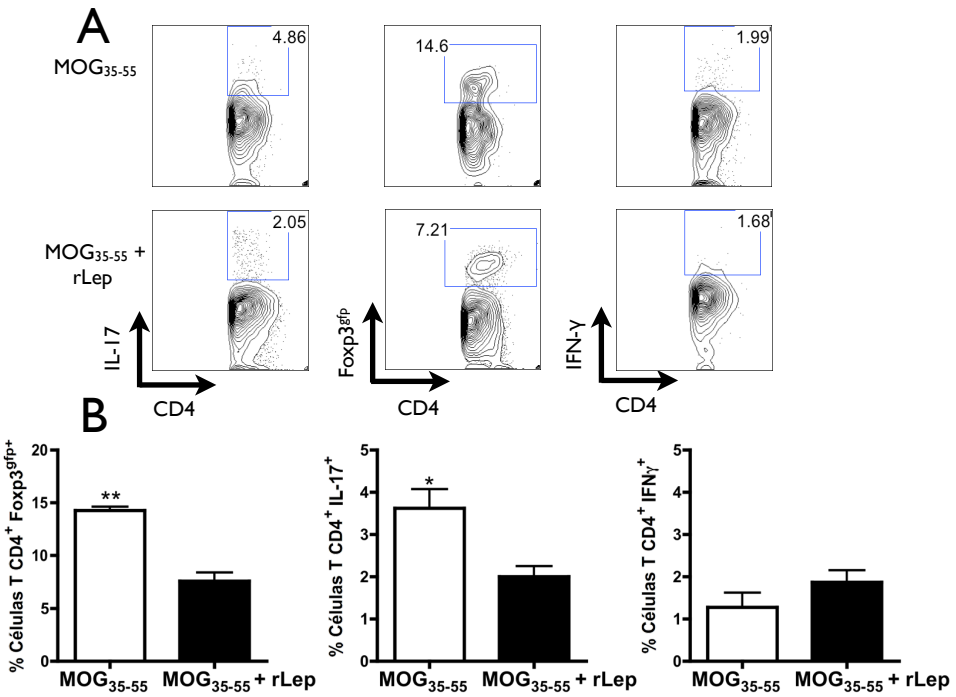

Figura 37. A leptina modula, *in vivo*, a frequência de células $CD4^+IL\text{-}17^+$ e T reguladoras de forma antígeno específica. Animais C57BL/6 $Foxp3^{gfp}$ 2D2 foram imunizados com MOG_{35-55} e CFA. Um grupo de 5 animais foi imunizado com MOG, CFA e 100 μg de leptina e outro grupo apenas com MOG e CFA. O linfonodo drenante dos animais retirado 7 dias após a imunização e as células mononucleares foram cultivadas *in vitro* por um período de 3 dias na presença de MOG. No terceiro dia, adicionou-se brefeldina aos poços e após um período de incubação de 5 horas avaliou-se a freqüência de células T CD4 produtoras de IL-17 e IFN-γ, assim como a freqüência de células T reguladoras. (A) *Dot plot* representativo de 1 animal/grupo mostrando a frequência de células T $CD4^+$ $IL\text{-}17^+$, $CD4^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ e $CD4^+Foxp3^{gfp+}$ (B) Gráfico em barra da frequência de células T $CD4^+$ $IL\text{-}17^+$, $CD4^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ e $CD4^+Foxp3^{gfp+}$, no linfonodo drenante, 7 dias após a imunização. Dados apresentados como média ± erro padrão. N=5 animais/grupo. * ($p<0.05$).

Somando-se a esses achados, imunizamos da mesma forma um novo grupo de animais e, 7 dias após a imunização, desafiamos esses animais, na pata posterior, com o antígeno MOG_{35-55} e avaliamos o seu inchaço relativamente a pata contralateral controle, em diferentes tempos (Figura 38). Observamos que os animais que foram imunizados conjuntamente com leptina tiveram um maior inchaço da pata em comparação ao grupo que recebeu apenas MOG_{35-55} (Figura 38).

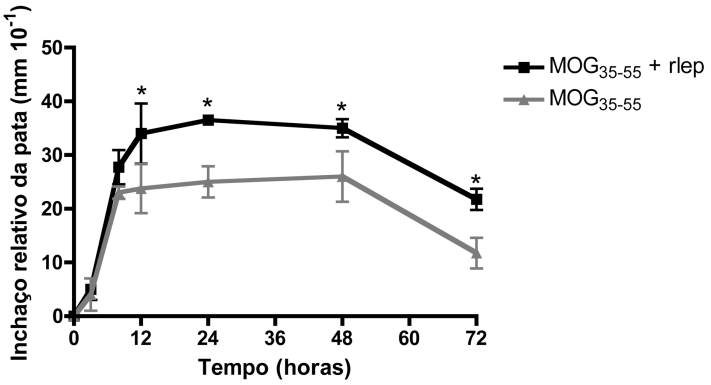

Figura 38. Reação de hipersensibilidade do tipo tardio, DTH. Animais C57BL/6 foram imunizados com CFA e MOG_{35-55} e separados em dois grupos. Um recebeu juntamente com a emulsão 100 μg de leptina e o outro grupo apenas CFA e o antígeno MOG_{35-55}. Os animais foram desafiados 7 dias após a imunização, em uma das patas posteriores, com o antígeno MOG_{35-55} e o inchaço avaliado relativamente a pata contralateral controle, em diferentes tempos. Resultado representativo de 1 experimento com 5 animais por grupo. Dado mostrado como média ± erro padrão. * ($p<0,05$).

Os animais foram imunizados usando-se o antígeno MOG_{35-55} com o objetivo de, posteriormente, induzirmos EAE. Dessa forma, imunizamos animais com MOG_{35-55} e CFA para indução de EAE e avaliamos a gravidade da doença nos animais $Lep^{ob/ob}$ comparativamente aos animais WT. Os animais deficientes em leptina mostraram-se resistentes a indução de EAE, enquanto que todos os animais WT desenvolveram a doença com maior severidade (Figura 39).

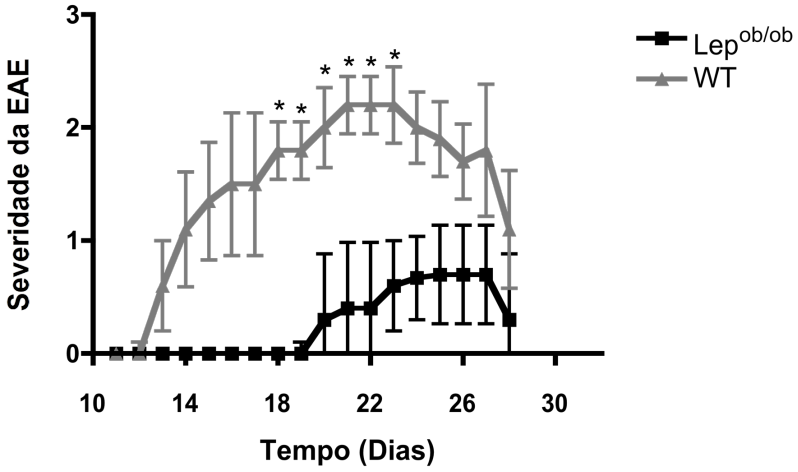

Figura 39. Indução de EAE em animais WT e deficientes em leptina. Os animais foram imunizados com MOG e CFA, juntamente com a toxina *pertusis* e os sinais do desenvolvimento da EAE acompanhados por um período de 28 dias. Dado representativo de 1 experimento com 5 animais por grupo. *($p<0,05$).

5.8 CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA NA AUSÊNCIA DE LEPTINA APRESENTAM UMA ATIVAÇÃO DIFERENCIADA DE mTOR E SÃO RESISTENTES AO TRATAMENTO COM RAPAMICINA

Devido às alterações observadas nas células dendríticas derivadas na ausência de leptina, iniciamos a investigação dos mecanismos moleculares possivelmente envolvidos nessas modificações. Dentre as vias de sinalização desencadeadas pela leptina, primeiramente investigamos se as vias de sinalização STAT-3 e a Akt estariam envolvidas nas diferenças fenotípicas e funcionais observadas.

Derivamos células dendríticas de medula óssea de animais WT e tratamos essas células com inibidores para as moléculas STAT3 e Akt. Observamos que a inibição dessas vias modulou a expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC-II (Figura 40). Entretanto, quando utilizamos essas DCs para indução de células T reguladoras a partir de células T $CD4^{+}CD62L^{+}$, purificadas por *beads* magnéticas, não houve mudança na geração/expansão de células T $CD4^{+}Foxp3^{gfp+}$, comparativamente às BMDC de animais WT não tratadas e que também apresentaram uma menor capacidade de gerar células T $CD4^{+}Foxp3^{gfp+}$ quando comparadas às BMDC $Lep^{ob/ob}$ (Figura 41).

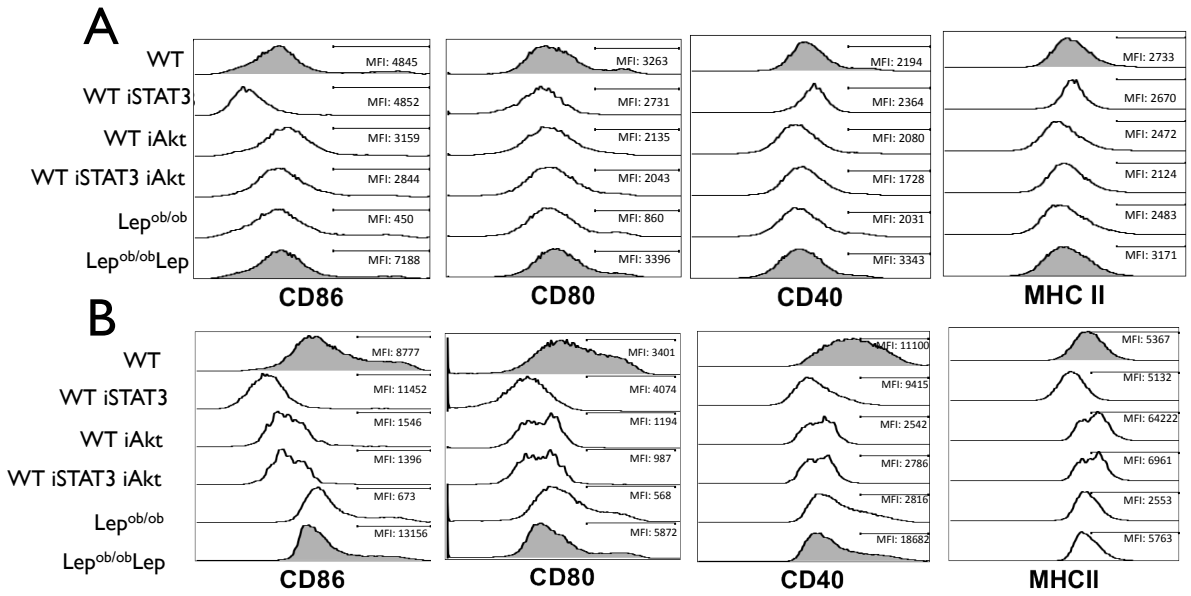

Figura 40. Avaliação das vias de sinalização STAT3 e Akt na modulação do fenótipo de células dendríticas derivadas da medula óssea de animais WT. (A) iDC derivadas de medula óssea no dia 7 foram tratadas com inibidores de STAT3 e Akt e avaliadas quanto às expressões de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 e de MHC-II, por citometria de fluxo, dentro da região de células $CD11c^{+}$. Como controle usou-se BMDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas com ($Lep^{ob/ob}Lep$) e sem ($Lep^{ob/ob}$) ~~a presença de~~ leptina recombinante. (B) mDC derivadas de medula óssea do dia 9, tratadas com inibidores de STAT3 e Akt foram avaliadas quanto às expressões de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 e de MHC-II, por citometria de fluxo, dentro da região de células $CD11c^{+}$. Como controle usou-se BMDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas com ($Lep^{ob/ob}Lep$) e sem ($Lep^{ob/ob}$) leptina recombinante. MFI (mediana de intensidade de fluorescência, do inglês *median fluorescence intensity*). Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

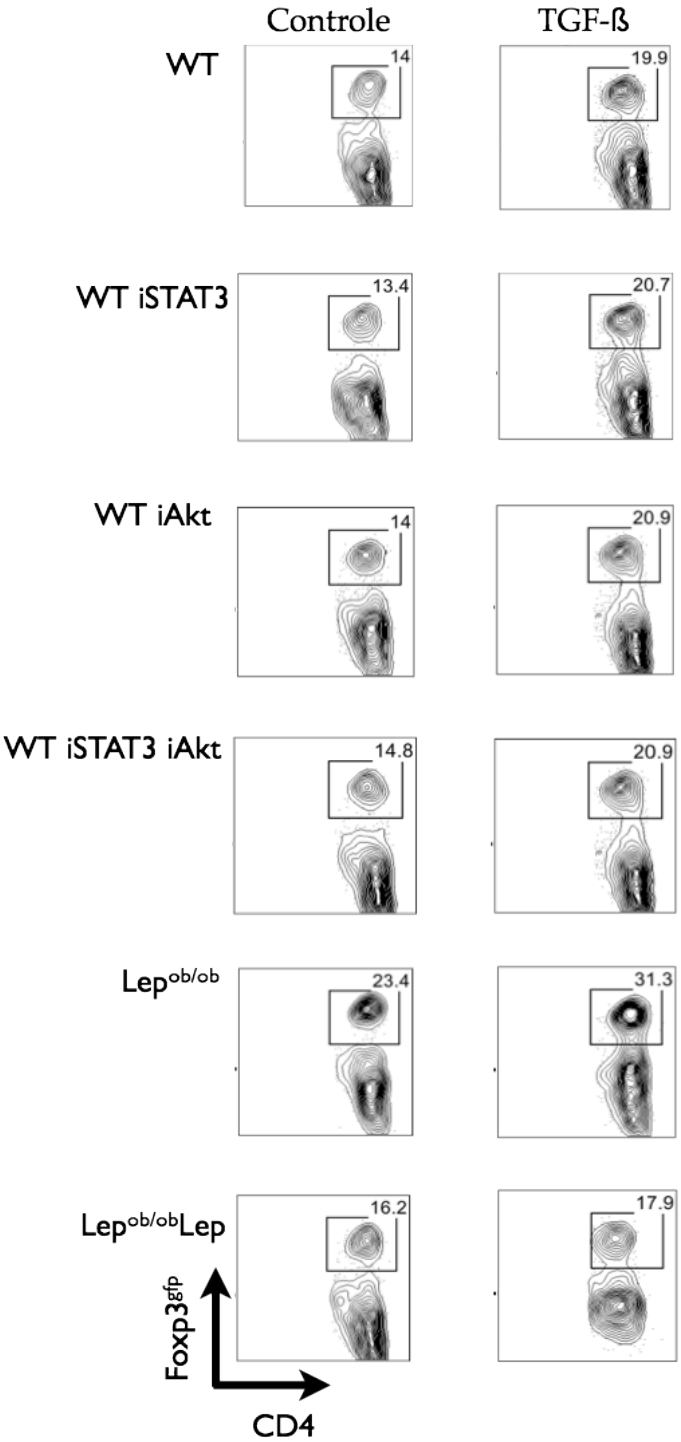

Figura 41. Geração de células T reguladoras por iDC derivadas de medula óssea tratadas com inibidores de STAT3 e Akt. iDC de animais WT foram tratadas com inibidores de STAT3 e Akt. Como controle usou-se BMDC de animais Lep$^{ob/ob}$ derivadas na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) ou na presença de leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$ Lep). Essas iDC foram co-cultivadas com células T CD4^{+}CD62L^{+} purificadas por b*eads* magnéticas de camundongos Foxp3^{gfp} e cultivadas por 5 dias. As células foram co-cultivadas sem o acréscimo de TGF-β (controle) e com TGF-β. Dado representativo de 1 dos 2 experimentos independentes realizados.

É descrito que a leptina pode ativar a via do mTOR modulando a resposta proliferativa em células T $CD4^+$ e de outros leucócitos (Maya-Monteiro et al., 2008; Maya-Monteiro e Bozza, 2008; Procaccini et al., 2010). Ademais, o mTOR é descrito nas células T como um fator essencial na polarização de células T (Delgoffe et al., 2011). Dessa forma, avaliamos se há uma diferença na sinalização da via mTOR nas células dendríticas derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT. Extraímos mRNA de iDCs derivadas da medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ na presença e ausência de leptina recombinante assim como de animais WT e realizamos um PCR em tempo real *array* com genes relacionados com a via mTOR. Observamos que iDC $Lep^{ob/ob}$ apresentaram um perfil gênico diferente do observado por iDC WT (Figura 42A). Além disso, esse perfil diferenciado pode ser parcialmente revertido quando essas células dendríticas foram derivadas na presença de leptina recombinante (Figura 42B). Ao analisarmos essas diferenças, observamos que as alterações abrangeram genes regulados tanto positivamente como negativamente de ambos os complexos de mTOR, mTOR1 e mTOR2 (Figura 43). Em conjunto, esses dados indicam que na população de iDC derivadas de medula óssea há uma modulação na via do mTOR na ausência de leptina.

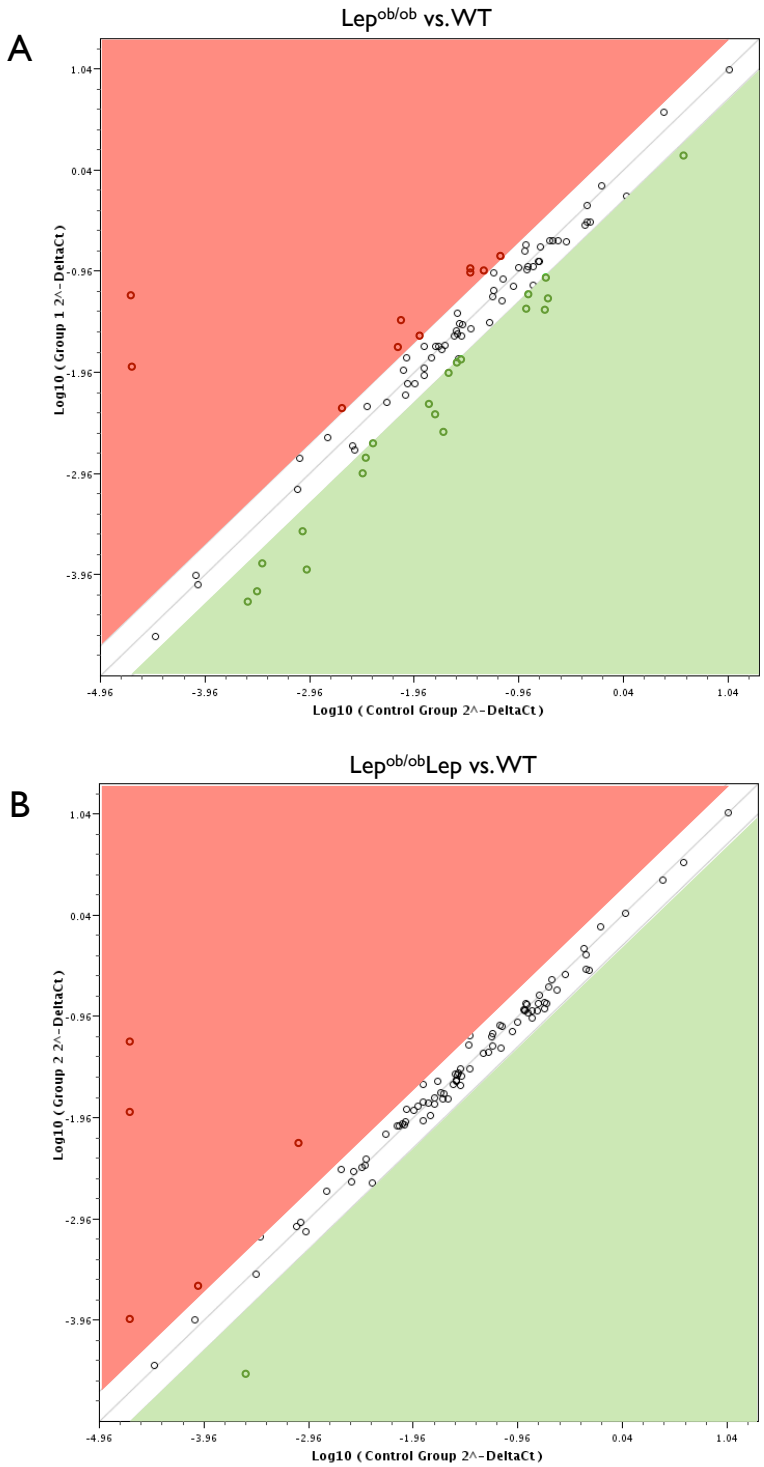

Figura 42. Avaliação da expressão genes relacionados com a via de sinalização mTOR em células dendríticas imaturas derivadas de medula óssea. No sétimo dia de cultura, o mRNA foi extraído de iDC derivadas de medula óssea e o cDNA obtido. O cDNA foi utilizado em um PCR em tempo real *array*. (A) *Scatter plot* dos genes expressos por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ relativamente a iDC de animais WT. (B) *Scatter plot* dos genes expressos por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas com leptina recombinante ($Lep^{ob/ob}$Lep) relativamente a iDC de animais WT. Vermelho - genes regulados positivamente. Verde – genes regulados negativamente. Pontos pretos – genes não modulados.

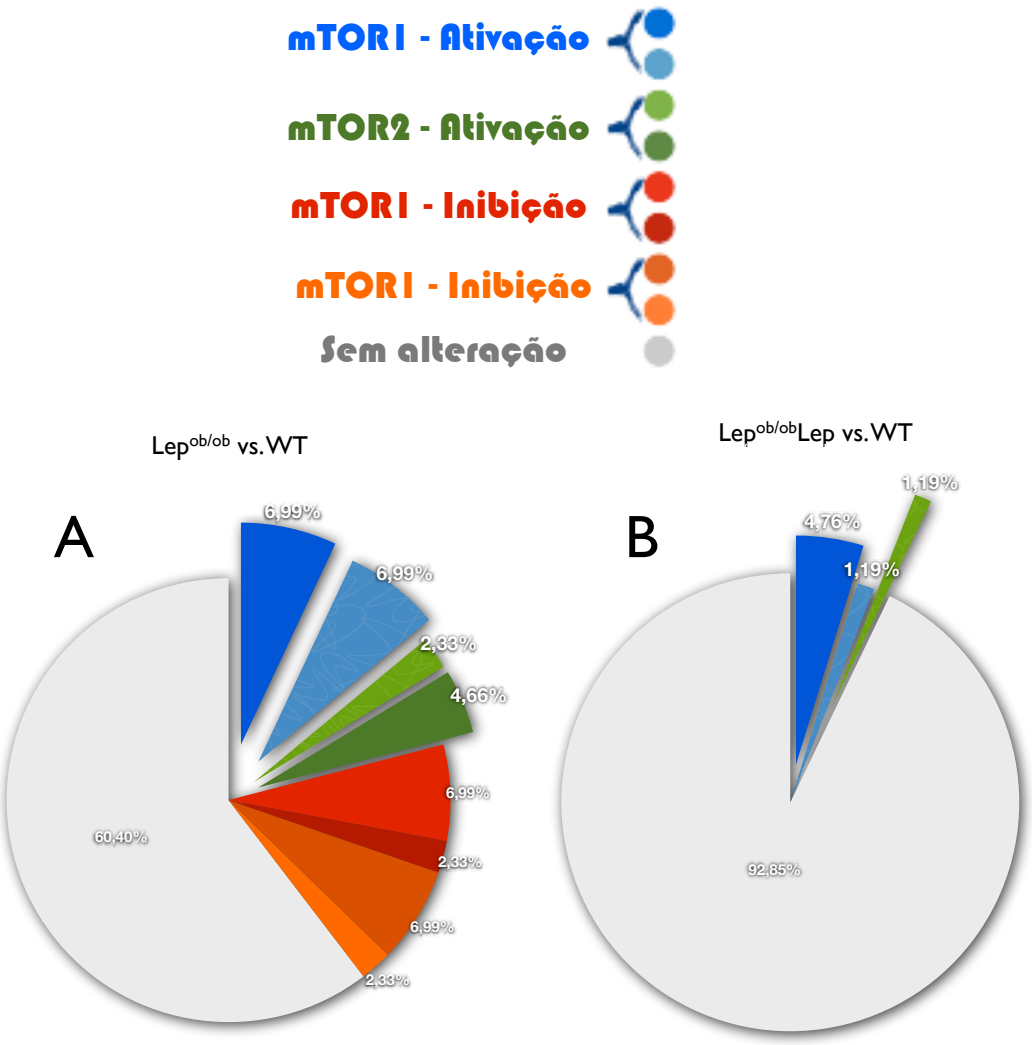

Figura 43. Avaliação, por agrupamento, da expressão genes relacionados com a via de sinalização mTOR em células dendríticas imaturas derivadas de medula óssea. No 7º dia de cultura, o mRNA foi extraído de iDC derivadas de medula óssea e o cDNA obtido. O cDNA foi utilizado em um PCR em tempo real *array*. Os genes foram agrupados de acordo com seu papel na via de mTOR. Genes regulados positivamente ou ativados pelo complexo mTOR1 foram agrupados como: mTOR1 – Ativação (Azul); genes regulados positivamente ou ativados pelo complexo mTOR2 foram agrupados como: mTOR2 – Ativação (verde); genes regulados negativamente ou inibidos pelo complexo mTOR1 foram agrupados como: mTOR1 – Inibição (vermelho); genes regulados negativamente ou inibidos pelo complexo mTOR2 foram agrupados como: mTOR2 – Inibição (laranja); genes não modulados são mostrados em cinza. (A) Agrupamento dos genes expressos por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ relativamente a iDC de animais WT. (B) Agrupamento dos genes expressos por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas com leptina recombinante ($Lep^{ob/ob}$Lep) relativamente a iDC de animais WT.

Para aprofundarmos esses achados, avaliamos a ativação de mTOR nas células dendríticas derivadas de medula óssea por *western blot*. Utilizamos duas proteínas, a pS6 e a 4EB-P1, para mensurar a ativação de mTOR. A pS6 é fosforilada pela ativação de mTOR e a proteína 4EB-P1, quando fosforilada pela ativação de mTOR, é direcionada para a degradação (Delgoffe et al., 2009). Observamos que BMDC derivadas na ausência de leptina possuem uma maior ativação de mTOR, visualizada por uma maior fosforilação de pS6 e uma redução nos níveis totais de 4EB-P1, comparativamente à BMDC WT (Figura 44). A adição de leptina recombinante durante o processo de geração de DC aumentou os níveis de 4EB-P1 e reduziu a fosforilação de pS6. Assim, células derivadas na ausência de leptina possuem uma maior atividade da via mTOR.

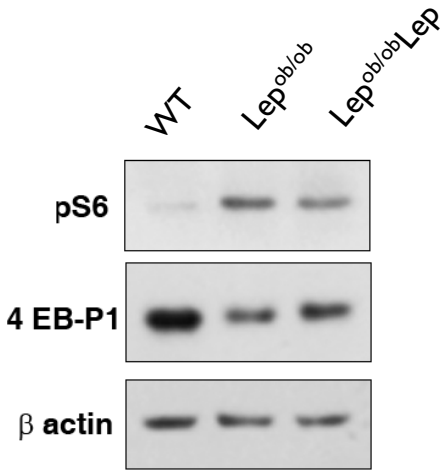

Figura 44. Avaliação da via de sinalização mTOR em iDC, derivadas de medula óssea. No 7º dia de cultura, proteínas totais foram extraídas de iDC derivadas de medula óssea de animais deficientes em leptina sem (Lep$^{ob/ob}$) e com leptina recombinante (Lep$^{ob/ob}$Lep), assim como de animais WT. Foram avaliadas as proteínas pS6 e 4EB-P1, usando-se como controle endógeno a β-actina.

A produção de IL-12 em células dendríticas é regulada pelo grau de ativação da via mTOR. A ativação da via mTOR em células dendríticas inibe a produção de IL-12, sendo que o tratamento com rapamicina aumenta a produção de IL-12 por DC (Ohtani et al., 2008). Portanto, derivamos células dendríticas da medula óssea de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT. No 7º dia, as DC foram maturadas com LPS e tratadas com rapamicina. Ao fim de 48 horas, a produção intracelular de IL-12 por células CD11c^{+}

foi avaliada. Observamos que nas BMDC WT o tratamento com rapamicina foi capaz de aumentar a frequência de células CD11c produtoras de IL-12, entretanto, o tratamento de BMDC Lep$^{ob/ob}$ com rapamicina não foi capaz de aumentar a frequência de células CD11c produtoras de IL-12 (Figura 45). Esse dado sugere que essas células são resistentes a modulação positiva da IL-12 mediado pelo tratamento com a rapamicina.

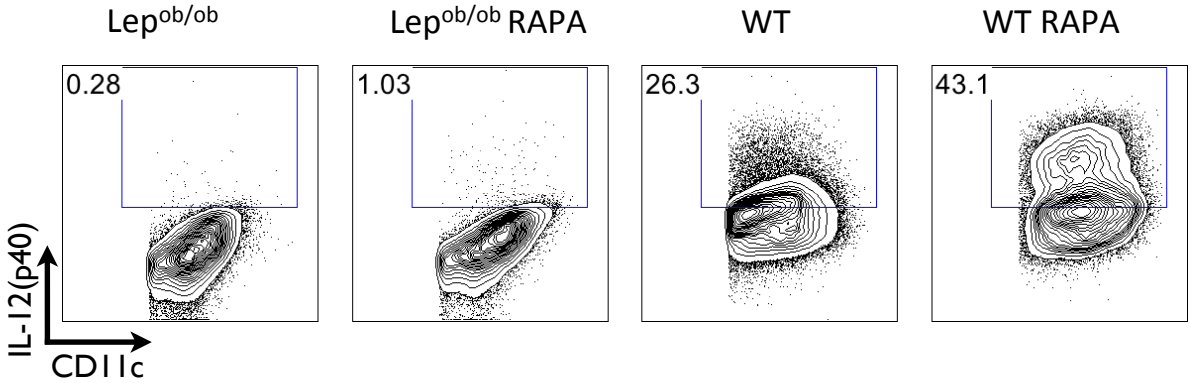

Figura 45. Produção intracelular de IL-12 por células dendríticas derivadas de medula óssea tratadas com Rapamicina. Derivou-se DC de animais Lep$^{ob/ob}$ e WT. No dia 7 de cultura, as iDC foram ativadas com LPS com ou sem a adição de rapamicina e cultivadas por 48 horas. No dia 9, as células foram tratadas com ionomicina, PMA e brefeldina e a produção intrecelular de IL-12(p40) avaliada em células CD11c^{+}MHC-II^{+}.

Finalmente, devido à ação da leptina em células T CD4^{+} e em dendríticas decidimos tratar animais Lep$^{ob/ob}$ e WT transplantados com rapamicina diariamente, para analisar como a sobrevida do enxerto de pele se comporta com o uso desse imunossupressor. Observamos que a leptina pouco aumentou a sobrevida do transplante de pele em animais WT. Contudo, ao tratarmos animais enxertados Lep$^{ob/ob}$ com rapamicina observamos que eles apresentaram uma maior sobrevida da pele enxertada (Figura 46). Desse modo, destacamos que, na ausência de leptina, o tratamento com rapamicina acarreta em uma longa sobrevida do enxerto de pele.

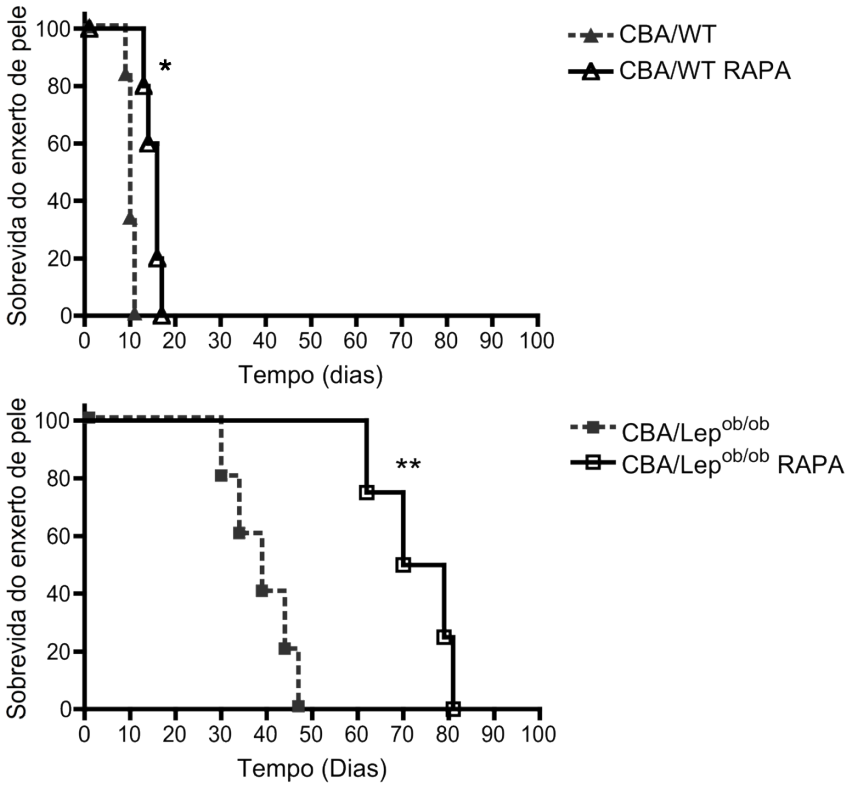

Figura 46. Sobrevida do enxerto de pele em animais tratados com rapamicina. A pele de camundongos CBA foram transplantadas em ambos os camundongos WT e $Lep^{ob/ob}$, tratados ou não com rapamicina, diariamente, e os enxertos avaliados diariamente por sinais de rejeição. Foi considerado como perda do enxerto quando apenas 10% do enxerto permaneceu no animal. (A) Transplante de pele de animais CBA em animais WT tratados ou não tratados com rapamicina. (B) Transplante de pele de animais CBA em animais $Lep^{ob/ob}$ tratados ou não tratados com rapamicina. N = 5 animais/grupo. * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$). RAPA: grupo de animais tratados diariamente com rapamicina.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que a leptina modula de diferentes formas a resposta imune. No transplante de pele, a ausência de leptina resultou em um aumento na sobrevida do enxerto, com maior frequência de células T reguladoras, uma mudança no balanço entre células Th1 e Th2, uma maior frequência de células T $CD4^+$ $IL17^+$ e uma menor resposta proliferativa dos leucócitos alogênicos. Além disso, os experimentos com células T $CD4^+$ de animais deficientes na sinalização pelo receptor de leptina transferidas para animais $Rag^{-/-}$ e posteriormente submetidos ao transplante, mostraram que a ausência de sinalização via leptina contribui para uma maior sobrevida do enxerto de pele. Observamos ainda que não somente as células T $CD4^+$, mas também as DC, influenciam a sobrevida do enxerto de pele. A leptina modula a geração de DC e, consequentemente, a sua capacidade em apresentar antígenos e ativar células T $CD4^+$. A deficiência em leptina promove uma modificação funcional tanto nas iDC como nas mDC, resultando em uma maior geração de células T reguladoras e uma menor indução de proliferação de células T $CD4^+$. Porém, essa deficiência também se associou a uma maior geração de células Th17, em condições favoráveis para sua diferenciação e manutenção.

Diversos foram os avanços do conhecimento da imunobiologia da reposta ao alotransplante, tanto na rejeição quanto na tolerância. Contudo, ainda não é bem compreendido como fatores derivados do tecido adiposo e a obesidade podem influenciar a resposta aloimune. Observamos que os animais deficientes em leptina possuem uma maior sobrevida do enxerto de pele, caracterizada por um menor infiltrado inflamatório, manutenção da arquitetura da derme e epiderme e menor porcentagem de fibrose. É importante destacar que a obesidade é considerada um fator de risco para a rejeição crônica em indivíduos transplantados (Bumgardner et al., 1995; Chang, Coates e Mcdonald, 2007; Papalia et al., 2010). Observamos, também, que animais obesos, mas deficientes em leptina, apresentam uma maior

sobrevida do enxerto de pele, indicando que a obesidade *per se* não é um fator de risco para a rejeição, mas sim a hiperleptinemia que a acompanha. Nesse sentido, é descrito que a obesidade afeta a função de rins enxertados, mas não a sobrevida do órgão transplantado (Ditonno et al., 2011). Como não existem dados na literatura sobre como a resposta alogênica no modelo de transplante pode ser modulada pela leptina, buscamos caracterizar alguns aspectos imunológicos da resposta imune ao aloenxerto, no soro, na pele transplantada e no linfonodo drenante em animais transplantados.

Nossos dados mostram uma menor concentração, no soro, das citocinas proinflamatórias TNF, IL-17, IFN-γ e IL-12 nos animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados em comparação a animais WT, também transplantados. Essas citocinas, com exceção da citocina IL-17, têm sido, ao longo de vários anos de pesquisa, associadas a processos ativos de rejeição do enxerto (Chen, Gao e Field, 1996; Mattarollo et al., 2010; Rosenberg et al., 1990; Shen e Goldstein, 2009; Thai et al., 1995; Waaga et al., 2001), embora recentemente possíveis papéis da IL-17 em episódios de rejeição aguda terem sido descritos (Loverre et al., 2011; Yapici et al., 2011). Esses dados indicam que os animais $Lep^{ob/ob}$ são menos inflamados sistemicamente e que, consequentemente, a resposta imune ao enxerto de pele, em animais WT e deficientes em leptina, possui uma repercussão sistêmica.

Seguindo-se no estudo da resposta alogênica, realizamos transplantes de pele em animais $Lep^{ob/ob}$ e WT e, 7 dias após o transplante, avaliamos a frequência de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ totais, a frequência de células T $CD4^+$ expressando os marcadores CD25 e CTLA-4, a expressão dos fatores de transcrição Foxp3 e GATA-3 em células T $CD4^+$ e a expressão intracelular das citocinas IL-4, IFN-γ, IL-17 e IL10 em células T $CD4^+$.

Primeiramente, observamos que os animais $Lep^{ob/ob}$ possuem uma menor frequência tanto de células T $CD8^+$ como $CD4^+$ no linfonodo drenante 7 dias após o transplante de pele, indicando que essas células possivelmente proliferaram menos quando comparadas às células de animais WT transplantados. Para excluirmos uma

possível leucopenia prévia ao transplante, fator que pode ser encontrado em animais $Lep^{ob/ob}$ (Fantuzzi e Faggioni, 2000), investigamos a freqüência de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ em animais $Lep^{ob/ob}$ e WT não transplantados e observamos que ambos os animais possuem frequências similares de ambos os tipos de células. Conjuntamente a esses achados, nossos dados mostram, por MLR, que animais $Lep^{ob/ob}$ possuem uma menor resposta alogênica. Juntos, a menor freqüência de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e a reduzida proliferação observada por MLR sugerem que a ausência de leptina modifica a resposta alogênica e proliferativa de células T.

A leptina é tida como um fator de crescimento importante para a resposta proliferativa de linfócitos T $CD4^+$ (Lord et al., 1998) e, dessa forma, buscamos avaliar, *in vivo*, esse papel. Realizamos a transferência de células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ e WT em animais $Rag^{-/-}$ juntamente com o mesmo número de células T $CD4^+$ de animais WT^{gfp} e observamos a proliferação homeostática competitiva entre essas células. Na ausência de sinais desencadeados pela leptina, uma menor capacidade proliferativa foi observada, indicando que a leptina, *in vivo*, é necessária para que uma resposta proliferativa normal aconteça. Também observamos que células T $CD4^+$ de $Lep^{ob/ob}$ proliferaram mais eficientemente que células WT^{gfp}. Esse dado contribui ainda mais com a importância de leptina na resposta proliferativa, uma vez que células T $CD4^+$ provenientes de animais $Lep^{ob/ob}$ expressam maiores quantidades do receptor de leptina, devido a sua deficiência, sendo dessa forma hiperresponsivas a concentrações fisiológicas de leptina (Baskin et al., 1998; Kim et al.; Lord et al., 1998), observadas nos animais $Rag^{-/-}$.

A análise da expressão de CTLA-4 em células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+CTLA\text{-}4^+$) e em células T ativadas ($CD4^+CD25^+Foxp3^-CTLA\text{-}4^+$) mostrou que apenas as células T com perfil de ativadas apresentaram uma maior expressão de CTLA-4, nos animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados. O CTLA-4 é uma molécula de fundamental importância no processo de tolerância ao enxerto, por competir com o CD28 pela ligação com CD80 e CD86, inibindo uma resposta imune efetora (Najafian e Sayegh, 2000; Oderup et al., 2006). A presença de CTLA-4 em

células T ativadas foi relatada como importante por interagir com CD80/86 e induzir tolerância num modelo de transplante de medula óssea (Kurtz et al., 2009). Assim, embora o CTLA-4 seja importante para que a célula T reguladora exerça sua função supressora, uma maior expressão dessa molécula, em células T ativadas, poderia inibir respostas de células T efetoras, reduzindo o processo inflamatório.

As citocinas secretadas por células T $CD4^+$ ditam como a resposta imune ao enxerto será montada. Investigamos a produção de algumas citocinas por células T $CD4^+$, no linfonodo drenante, e observamos que os animais $Lep^{ob/ob}$ apresentaram uma maior frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IL-4 e uma menor frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ quando comparadas a animais WT. Também ressaltamos que uma maior frequência e expressão de GATA-3 em células T $CD4^+$ foram encontradas no linfonodo drenante, sendo GATA-3, o fator de transcrição presente em células do padrão Th2 (Zheng e Flavell, 1997). Esse dado em conjunto com a maior produção de IL-4 por células T $CD4^+$ indica que uma polarização para um perfil Th2, em detrimento do perfil Th1, poderia modular diferencialmente a resposta alogênica ao transplante. Nesse sentido, vale destacar que clones de células T gerados a partir de pacientes com rejeição crônica secretaram citocinas do padrão Th1 quando estimulados com alopeptídeos e que clones de células T provenientes de pacientes com função estável do enxerto secretaram citocinas do padrão Th2 (Waaga et al., 2001). Conjuntamente, ratos transplantados que receberam clones de células Th2 provenientes de animais transplantados tratados com a proteína de fusão CTLA4-Ig apresentaram um maior número de células T reguladoras, maior secreção de IL-10 por células mononucleares e baixos níveis de IFN-γ, IL-17 e IL-23 comparados a ratos tratados com clones Th1, derivados de animais transplantados com rejeição aguda ou não tratados com a proteína de fusão (Waaga-Gasser et al., 2009). Esses autores também relataram que a transferência de ambos os clones, Th1 e Th2, para animais recipientes resultaram em uma limitação/redução da ativação de clones Th1, mediada pelos clones Th2. Desse modo, uma mudança no equilíbrio entre as células Th1/Th2, com predomínio de respostas Th2, conforme observado em

nossos resultados, poderia ocasionar em um melhor desfecho para o órgão transplantado. Com base nesses dados da literatura, nossos resultados mostram que células dendríticas derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ produzem baixas quantidades de IL-12 e, quando co-cultivadas com células T $CD4^+$ *naive* WT, em condições polarizantes Th1 e Th2, induzem mais eficientemente células T $CD4^+IL\text{-}4^+$, sendo incapazes de, na ausência de leptina, gerarem células Th1. Ademais, no co-cultivo de células T *naive* com BMDC $Lep^{ob/ob}$ sem a adição de citocinas, uma maior expressão gênica de GATA-3 pode ser observada. Quando imunizamos animais WT adicionando leptina à emulsão antigênica, observamos que ao ser desafiado na pata, o animal imunizado com leptina apresenta uma maior reação de hipersensibilidade, mostrando que mesmo em um animal WT, a leptina pode, localmente, aumentar uma resposta do padrão Th1. Em conjunto, esses dados indicam que na ausência de leptina, células dendríticas são mais eficientes em gerar células com perfil Th2, em detrimento de uma resposta Th1. Na literatura é descrito que a leptina é uma citocina importante na indução de respostas do perfil Th1 (De Rosa et al., 2006; Lord et al., 1998) e, *in vitro*, a adição de leptina auxilia na polarização Th1 (Batra et al., 2010).

Outro ponto importante na imunorregulação do enxerto são as células T reguladoras. Dada a ausência de dados sobre influência das células T reguladoras na resposta imune ao enxerto na ausência de leptina, o estudo de células T reguladoras em animais $Lep^{ob/ob}$ transplantados pode fornecer importantes indícios e mecanismos de como o sistema neuroendócrino atua na modulação da resposta imune reguladora ao enxerto. Nesse sentido, em adição aos nossos resultados, obtidos *in vitro* e *in vivo*, observamos que animais deficientes em leptina, receptores de aloenxertos de pele, possuem uma maior frequência de células T reguladoras no linfonodo drenante do enxerto e uma maior expressão de Foxp3 na pele enxertada, indicando que essas células parecem desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune ao enxerto. A tolerância ao aloenxerto mediada por células T reguladoras tem sido caracterizada em vários modelos de transplante (Peters et al., 2009) e células T

reguladoras específicas para aloantígenos mostraram-se fundamentais para o processo de tolerância ao enxerto (Albert et al., 2005; Taylor, Noelle e Blazar, 2001). Há relatos de que a supressão mediada por essas células pode ser alcançada através de diversos mecanismos: 1. ação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Kingsley et al., 2002), 2. por contato célula-célula, 3. por bloqueio da co-estimulação via CTLA-4 (Kurtz et al., 2009) e 4. tolerância infecciosa caracterizada pela capacidade que determinados linfócitos tolerizados têm de "infectar", de tornar tolerante outros linfócitos de animais *naive* (Cobbold e Waldmann, 1998; Waldmann et al., 2006). Além disso, conforme mencionado, encontramos uma maior expressão de Foxp3 na pele dos animais deficientes em leptina. Nesse contexto, foi descrito que células T reguladoras foram encontradas em enxertos tolerizados (Graca, Cobbold e Waldmann, 2002). Dessa forma, uma maior quantidade de células T reguladoras pode contribuir para uma maior sobrevida do enxerto e prevenir processos de rejeição aguda e crônica, conforme descrito por Joffre e colaboradores (Joffre et al., 2008).

Essa maior freqüência de células T reguladoras pode ser explicada pela ação da leptina nessas células. É descrito que a neutralização da leptina promove a proliferação de células T reguladoras, *in vivo* e *in vitro* (De Rosa et al., 2007). Posteriormente, foi relatado que essa capacidade proliferativa na ausência de leptina era devido a uma oscilação na ativação do complexo de mTOR, que quando inibido, em momentos específicos, leva à proliferação de células T reguladoras, com manutenção de sua função supressora (Procaccini et al., 2010). Com base nesses dados e em nossos resultados no modelo de transplante, realizamos ensaios de diferenciação com células T *naive* de animais $Lep^{ob/ob}$ e WT. Para nos certificar da ausência de contaminação por leptina, já que essa adipocina é encontrada em grandes quantidades no soro fetal bovino, utilizamos soro autólogo de animais $Lep^{ob/ob}$. Os resultados demonstram que na ausência de leptina, houve uma maior geração de células T reguladoras, indicando que a ausência de leptina afeta a geração

de células T reguladoras a partir de precursores *naive*, tornando animais $Lep^{ob/ob}$ mais susceptíveis a tolerância ao aloenxerto que animais WT.

Finalmente, para tentarmos comprovar que a leptina realmente atua em células T $CD4^+$, modulando a resposta aloimune, transferimos células T $CD4^+$ esplênicas de animais $Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$ ou de animais normais para camundongos $Rag^{-/-}$ transplantados. Os animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos com células T $CD4^+$ esplênicas de animais $Lep^{db/db}$ apresentaram uma maior sobrevida do enxerto de pele, comparativamente aos animais reconstituídos com células T $CD4^+$ provenientes de animais WT e $Lep^{ob/ob}$. Camundongos $Rag^{-/-}$, apesar de não terem linfócitos, possuem níveis de leptina circulantes normais e, dessa forma, as células T $CD4^+$ de animais $Lep^{ob/ob}$ seriam responsivas a leptina nesse contexto. Entretanto, células T $CD4^+$ de animais $Lep^{db/db}$ não sinalizam via receptor de leptina, devido a uma mutação na cadeia intracitoplasmática do gene do receptor de leptina (*lepr*) (Chua et al., 1996) e, mesmo com níveis circulantes normais de leptina, essa adipocina não seria capaz de modular essas células T $CD4^+$. Com base nesse resultado, podemos concluir que a ausência de sinais desencadeados pela leptina em células T $CD4^+$ tem uma grande importância na resposta aloimune.

Entretanto, ao compararmos a curva de sobrevida dos animais $Rag^{-/-}$ transplantados reconstituídos com células T $CD4^+$ de animais $Lep^{db/db}$ com a curva de sobrevida de animais $Lep^{ob/ob}$ enxertados, observamos que a sobrevida do transplante de pele nos animais $Lep^{ob/ob}$ foi superior. Acreditamos que essa diferença se deve provavelmente a outros tipos celulares que no animal $Lep^{ob/ob}$, diferentemente do animal $Rag^{-/-}$ reconstituído com células T $CD4^+$ de animais $Lep^{db/db}$, não seriam responsivos a leptina e, assim, poderiam modular a resposta aloimune. Isso resultaria em uma maior sobrevida do enxerto de pele à observada nos animais $Rag^{-/-}$ reconstituídos com células T $CD4^+$ de animais $Lep^{db/db}$

Demonstramos que a leptina é importante na modulação de células dendríticas e, sua ausência, altera tanto o fenótipo como a função dessas células. Dois trabalhos, um descrevendo células dendríticas de animais $Lep^{ob/ob}$ e outro de animais

$Lep^{db/dB}$, relataram diferentes resultados em relação à ação da leptina na modulação de células dendríticas obtidas de medula óssea. Macia e colaboradores, usando medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ mostraram que não havia diferenças na celularidade, na morfologia, na eficiência da geração de DCs e na expressão de moléculas coestimuladoras comparativamente aos animais selvagens. Em contrapartida, Lam e colaboradores mostraram que células dendríticas derivadas de medula óssea de animais $Lep^{db/db}$ apresentavam menor expressão de moléculas co-estimuladoras, comparativamente aos animais selvagens (Lam et al., 2006; Macia et al., 2006). Nosso trabalho corrobora o trabalho de Lam e colaboradores. As diferenças observadas entre nossos dados e os de Macia e colaboradores pode residir no fato desses autores terem utilizado soro fetal bovino em suas culturas que, por conter leptina (De Rosa et al., 2007), tenha alterado alguns dos resultados obtidos por esses pesquisadores. Em nosso ensaio, utilizamos soro do próprio animal deficiente em leptina.

Adicionando-se às características fenotípicas das células dendríticas de animais $Lep^{ob/ob}$ derivadas, *in vitro*, de medula óssea, também observamos que essas células possuem importantes alterações funcionais. Células dendríticas derivadas de animais $Lep^{ob/ob}$, na ausência de leptina, induziram uma menor proliferação de células T $CD4^+$ obtidas de animais WT. Essa menor proliferação foi acompanhada de uma menor produção de citocinas do padrão Th1. Conforme descrito anteriormente (Macia et al., 2006), apesar de células dendríticas de animais $Lep^{ob/ob}$ apresentarem características fenotípicas e funcionais normais, essas células apresentaram-se menos potentes na indução de proliferação alogênica de células T, indicando que em conjunto com nossos dados, a leptina modifica funcionalmente as células dendríticas. *In vivo*, a imunização de animais $Foxp3^{gfp}$ *knock in* com o antígeno MOG_{35-55}, CFA e leptina resultou em uma maior frequência de células dendríticas no linfonodo drenante, sugerindo uma possível maior migração de células dendríticas do foco inflamatório para o linfonodo drenante. Macia e colaboradores descreveram achados semelhantes em que células dendríticas da epiderme, as células de Langerhans,

tinham seu número diminuído no linfonodo de animais $Lep^{ob/ob}$, sendo que a administração de leptina exógena restaurava os números dessas células para níveis semelhantes aos de animais WT. Esses resultados, em conjunto com os nossos, indicam que além das alterações fenotípicas e da indução de proliferação em células T $CD4^+$, a migração de células dendríticas também pode ser modulada pela adipocina leptina. Frente a esses resultados, analisamos as quimiocinas presentes no tecido e no linfonodo drenante, assim como a modulação dos receptores de quimiocinas em células dendríticas, para concluirmos esse bloco experimental.

Além da menor capacidade de induzir a proliferação em células T $CD4^+$, por parte das mDCs de animais $Lep^{ob/ob}$, a modulação de citocinas produzidas também foi modificada. No ensaio de proliferação com mDCs WT uma maior produção de citocinas do padrão Th1 foi observada, quando comparada com mDCs $Lep^{ob/ob}$. É importante ressaltar que, somando-se aos efeitos da leptina nas células dendríticas, Mattioli e colaboradores demonstraram que a leptina recombinante promove a diferenciação e a sobrevivência de células dendríticas, em humanos, ditando a polarização de linfócitos T na direção de um perfil Th1 (Mattioli et al., 2005). É provável que, conforme demonstrado por Mattioli e colaboradores, o favorecimento da polarização em direção a um perfil Th1 possa ter sido obtida. Nossos dados de diferenciação para Th17 e Treg reforçam essa interpretação, uma vez que nas condições em que as células dendríticas foram derivadas, na presença de leptina, recombinante, uma maior produção de IFN-γ e IL-12 foram observadas, com consequente menor indução de células Th17 e Tregs. Além disso, observamos que DC $Lep^{ob/ob}$ são incapazes de induzir células do padrão Th1 na ausência de leptina.

Conjuntamente a esses resultados, no linfonodo drenante de animais transplantados deficientes em leptina, obtivemos uma menor frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ. Em conjunto, esses dados sugerem que a leptina modula diretamente as células dendríticas e aparentemente as licencia a induzir respostas do padrão Th1.

Outro fator importante foi a maior indução de células T reguladoras por iDC na ausência de leptina. Nosso trabalho indica que a maior frequência de células T reguladoras, em animais deficientes em leptina, provavelmente deve-se a uma alteração funcional nas DC desses animais, conforme mencionado anteriormente. Recentemente, dois estudos descreveram a ação da leptina nas células T reguladoras. Taleb e colaboradores mostraram que a deficiência em leptina resultou em um aumento da expressão de Foxp3 em células T $CD4^{+}CD25^{+}$, aumento da quantidade dessas células no baço de animais $Lep^{db/db}$ e maior capacidade supressora. Esses autores também descreveram que a transferência de células T reguladoras de um animal $Lep^{db/db}$ para um animal $Rag^{-/-}$, juntamente com células de esplenócitos de animais deficientes em células T reguladoras, levou a uma redução da lesão vascular, em um modelo de aterosclerose, e a uma inibição da produção de IFN-γ quando comparado à transferência de células T reguladoras provenientes de um animal selvagem (Taleb et al., 2007). Não observamos uma alteração na expressão de Foxp3 em células T $CD4^{+}CD25^{+}$, mas observamos que animais $Lep^{ob/ob}$ possuem uma maior frequência de células T reguladoras e propomos que um possível mecanismo para essa observação seja mediado pelas células dendríticas.

De Rosa e colaboradores descreveram que células T reguladoras humanas expressam maiores quantidades de ObRb do que células T $CD4^{+}CD25^{-}$ e que sinais intracelulares desencadeados pela ligação da leptina ao seu receptor podem agir inibindo a proliferação de células T reguladoras. Esses autores também descreveram que a neutralização de leptina aumenta a proliferação de células T reguladoras estimuladas, *in vitro,* com anti-CD3 e anti-CD28, dependentemente de IL-2. Ademais, *in vivo,* a deficiência de leptina promoveu a proliferação de células T reguladoras com manutenção de sua função supressora (De Rosa et al., 2007). Observamos que iDC $Lep^{ob/ob}$ induzem uma maior frequência de células T reguladoras. De Rosa e colaboradores descreveram uma maior capacidade proliferativa de células T reguladoras na ausência de leptina e, nós observamos que iDC $Lep^{ob/ob}$ induzem tanto uma maior geração de células T reguladoras quanto uma maior proliferação dessas

células. Somando-se a esses resultados *in vitro*, obtivemos, *in vivo*, que a imunização de animais Foxp3 *knock in* com CFA e MOG_{35-55}, conjuntamente com leptina recombinante diminuiu a frequência de células T reguladoras no linfonodo drenante. Os dados presentes na literatura, em conjunto com nossos dados, indicam que a leptina modula a população de células T reguladoras tanto *in vitro* como *in vivo*.

Um achado interessante na resposta aloimune nos animais $Lep^{ob/ob}$ foi a frequência de células T $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$. Apesar desses animais terem uma maior sobrevida do enxerto, uma maior freqüência de células potencialmente Th17 foi encontrada. O papel dessas células em processos de rejeição ainda não está claro, mas parece desempenhar um papel na rejeição aguda (Afzali et al., 2007; Atalar et al., 2009; Loverre et al., 2011). Assim, investigamos como a leptina poderia modular a geração dessa população celular. Observamos que células T $CD4^{+}$ *naive* de animais $Lep^{ob/ob}$ se diferenciam, quando estimuladas com TGF-β e IL-6, mais eficientemente em células Th17 do que células T $CD4^{+}$ *naive* WT. Nesse contexto, a leptina age diretamente nas células T $CD4^{+}$ *naive*, inibindo sua diferenciação. Além disso, as iDC $Lep^{ob/ob}$ também se mostraram mais eficientes na geração de células Th17. Os dados mostraram uma maior geração e proliferação de células Th17 a partir de precursores *naive* WT. *In vivo*, observamos que a leptina inibe a geração de células T $CD4^{+}$ produtoras de IL-17 em animais $Foxp3^{gfp}$ imunizados com MOG_{35-55}, CFA e leptina, assim como em animais 2D2 $Foxp3^{gfp}$ de forma antígeno especifíca, confirmando os resultados obtidos *in vitro*.

Observamos que iDC $Lep^{ob/ob}$ induzem tanto uma maior frequência de células T reguladoras como de células Th17. Não existem dados na literatura de como a leptina poderia modular a população de células Th17. Em um único trabalho descrito a respeito da relação entre a leptina e a IL-17, os pesquisadores Pini e Fantuzzi descreveram que animais $Lep^{ob/ob}$, em um modelo de peritonite induzida por zimozan, produzem uma maior quantidade de IL-17 e apresentam um maior infiltrado neutrofílico no peritônio (Pini e Fantuzzi, 2010). Embora ainda não seja possível afirmar qual o papel da leptina na homeostasia de células Th17, nosso

trabalho e o de Pini e Fantuzzi sugerem que animais deficientes em leptina podem ter um eixo Th17 mais proeminente. Contudo, não se sabe até que ponto a maior quantidade de células T reguladoras, nesses animais, poderia limitar essa resposta Th17.

A fim de aprofundarmos o estudo de como a leptina poderia modular a população de células Th17 *in vivo*, escolhemos o modelo de EAE por ter sido descrito como um modelo autoimune dependente das células Th17 (Kreymborg et al., 2007; Lock et al., 2002; Matusevicius et al., 1999; Segal, 2009; Sutton et al., 2009; Zhang et al., 2003). Nossos resultados indicam que os animais deficientes em leptina são protegidos da EAE quando comparados aos controles WT. Uma possível explicação para essa proteção poderia ser o desenvolvimento recíproco entre células T reguladoras e Th17 (Bettelli et al., 2006; Mucida et al., 2007), em que apesar de na ausência de leptina termos uma maior geração de células Th17, elas seriam monitoradas por células T reguladoras geradas em conjunto, limitando as respostas de células Th17 efetoras. Nesse contexto, observamos que o desenvolvimento de células T reguladoras e Th17 não é mútuo, pois quando polarizamos para um perfil Th17, a freqüência de células T $CD4^{+}Foxp3^{gfp+}$ diminui. Com base nessa hipótese é importante ressaltar que células T reguladoras específicas para o MOG_{35-55} promovem uma proteção ao desenvolvimento de EAE (Reddy et al., 2004) e que níveis aumentados de leptina em pacientes com esclerose múltipla correlacionam-se negativamente com células T reguladoras (Matarese et al., 2005).

Nossos resultados, em que observamos uma maior indução de células Th17 por iDC de animais $Lep^{ob/ob}$, e os de Pini e Fantuzzi, em que observaram uma maior produção de IL-17 no peritônio de animais $Lep^{ob/ob}$, paracem contraditórios ao fato de animais deficientes em leptina serem protegidos da EAE (De Rosa et al., 2006; Matarese, Procaccini e De Rosa, 2008; Matarese et al., 2001b). Contudo, nesses trabalhos não foi investigado o papel das células Th17 no desenvolvimento da EAE, sendo avaliadas apenas as células Th1 autorreativas. Acreditamos que a leptina possa afetar a homeostase das células T reguladoras no modelo animal de EAE, não

permitindo que essas células atuem regulando e inibindo a progressão da doença, conforme descrito por Matarese e colaboradores, em humanos (Matarese et al., 2005). Em contrapartida, os animais Lep$^{ob/ob}$ a leptina não inibiria a população de células T reguladoras, permitindo uma melhor regulação da resposta autoimune na EAE.

Após essa etapa, buscamos estudar quais os mecanismos envolvidos nas alterações observadas nas BMDC Lep$^{ob/ob}$. Primeiramente, analisamos como as vias de sinalização Akt e STAT-3 poderiam modular o fenótipo e a função de BMDC. Mostramos que a inibição da via de sinalização STAT-3 pouco alterou a expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II. Além disso, as BMDC geradas na presença desse inibidor induziram polarização de células T reguladoras semelhantes a BMDC WT. Entretanto, a inibição da via Akt resultou em uma maior diminuição de moléculas co-estimuladoras e MHC-II, indicando que essa via pode ter uma importância no fenótipo observado na ausência de leptina. Contudo, as BMDC geradas na presença do inibidor de Akt induziram polarização de células T reguladoras de forma similar a BMDC WT. Na literatura é descrito que a leptina induz a expressão de CD40 em DC, dependentemente de Akt (Lam et al., 2007) e que essa via (Akt/PI3K), ativada pela leptina, possui um efeito antiapoptótico (Mattioli et al., 2009). Destacamos que observamos o mesmo efeito, pois a inibição de Akt resultou em uma diminuição na expressão de CD40 por BMDC, e a inibição de ambas as vias STAT-3 e Akt ter resultado em uma menor viabilidade dessas BMDC.

Embora tenhamos observado a importância de Akt na expressão de moléculas co-estimuladoras e MHCII, não observamos diferenças na indução de células T reguladoras e, portanto, outra via deve atuar na modulação funcional dessas BMDC. Realizamos um *array* de genes envolvidos com a via de sinalização mTOR e observamos que na ausência de leptina (Lep$^{ob/ob}$) houve uma alta modulação de genes envolvidos tanto com o mTORC1 como mTORC2. Por não observarmos uma mudança no padrão de ativação ou inibição entre os complexos de mTOR, analisamos qual o perfil de ativação de mTOR nas BMDC. A leptina induz a ativação de mTOR em diferentes tipos celulares, incluindo células do sistema imune (Maya-

Monteiro et al., 2008; Maya-Monteiro e Bozza, 2008) e espera-se que na ausência dessa adipocina ocorra uma menor ativação dessa via de sinalização. Entretanto, diferentemente do esperado, observamos que BMDC $Lep^{ob/ob}$ possuem uma maior ativação de mTOR comparativamente a BMDC WT. Destacamos que na condição em que BMDC $Lep^{ob/ob}$ foram geradas na presença de leptina recombinante, uma inibição de mTOR foi observada. Embora contraditório, ao analisarmos a produção de IL-12, por essas DC, observamos uma baixa produção de IL-12. A inibição de mTOR induz um aumento na produção de IL-12 por DC (Ohtani et al., 2008; Turnquist et al., 2010) e, portanto, esses dados em conjunto indicam que a baixa produção de IL-12 por BMDC $Lep^{ob/ob}$ pode ser devido a maior atividade de mTOR. O aumento da atividade de mTOR nas DC induz inibição de NF-κB, resultando na inibição da produção de IL-12 por essas células (Turnquist et al., 2010). Turquist e colaboradores mostraram que DC tratadas com rapamicina induzem níveis semelhantes de IFN-γ, mas que essas DC tratadas com rapamicina induzem menores quantidades de IL-17 (Turnquist et al., 2010), fator que em conjunto com nossos resultados sugerem que mTOR nas DC tem uma importância na indução de células Th17. Destacamos, nesse sentido, que BMDC $Lep^{ob/ob}$, que possuem uma maior atividade de mTOR, induzem mais eficientemente a diferenciação de células Th17. Em conjunto, esses dados sugerem que a via de sinalização mTOR nas DC pode modular o destino celular e explicar por que na ausência de leptina uma maior geração de células T reguladoras e Th17 foi observada.

Devido ao efeito da rapamicina tanto nas DC como em linfócitos e, com base em nossos resultados, realizamos o transplante de pele de animais CBA em animais $Lep^{ob/ob}$ e WT, tratamos esses animais com rapamicina e analisamos a sobrevida do enxerto de pele. Encontramos que o tratamento com a rapamicina pouco aumentou a sobrevida do enxerto de pele nos animais WT. Entretanto, a sobrevida do enxerto de pele em animais $Lep^{ob/ob}$ aumentou drasticamente quando tratados com rapamicina, comparativamente aos animais $Lep^{ob/ob}$ não transplantados. Esse dado mostra que a neutralização de leptina em conjunto com o tratamento com rapamicina poderiam

ser importantes como ferramenta para a indução de uma maior sobrevida do transplante de pele.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados preliminares mostram que a leptina modula de diferentes formas a homeostase das células dendríticas, das células T reguladoras, das células Th17, Th1, Th2 e a resposta aloimune. Observamos que a leptina interfere tanto no fenótipo quanto na função das células dendríticas derivadas da medula óssea desempenhando um papel central na regulação de células Th17 e de células T reguladoras, uma vez que a ausência desse hormônio modulou positivamente essas populações celulares, devido a maior produção de TGF-β. Verificamos ainda, que a leptina é um importante potencializador de respostas Th1 e que também parece ter uma participação direta na evolução da EAE.

No modelo de transplante de pele alogênico, a ausência de leptina promove uma maior sobrevida do enxerto de pele o que, provavelmente, está relacionado a uma maior proporção de células T reguladoras e a uma mudança no padrão de resposta de Th1 para Th2. Além disso, tanto as células T CD4+ como as DC, na ausência de sinais desencadeados pela leptina, alteram a resposta aloimune ao enxerto contribuindo, assim, para uma maior sobrevida da pele transplantada.

Deste modo, demonstramos por meio de diferentes modelos experimentais que a leptina modula múltiplas facetas das respostas imunológicas sendo, em todos os modelos estudados, um forte indutor de respostas inflamatórias, aparentemente voltada para um perfil Th1.

Dessa forma, propomos, no modelo aloimune que a ausência de leptina diminua a resposta proliferativa de células T CD4+ e induza uma maior quantidade de células T reguladoras. Ainda, na ausência de leptina, as células dendríticas expressam menores quantidades de MHC-II e moléculas co-estimuladoras, produzindo uma maior quantidade de TGF-β e induzindo uma maior freqüência e a proliferação de células T reguladoras. Essas células T reguladoras limitariam no linfonodo a migração de células efetoras (Th1, Th2 e Th17) para o foco inflamatório,

assim como, em conjunto com células Th2, inibiriam a geração de células Th1. Ademais, essas células T reguladoras também migram para o foco inflamatório, inibindo a resposta imune no local (Figura 47).

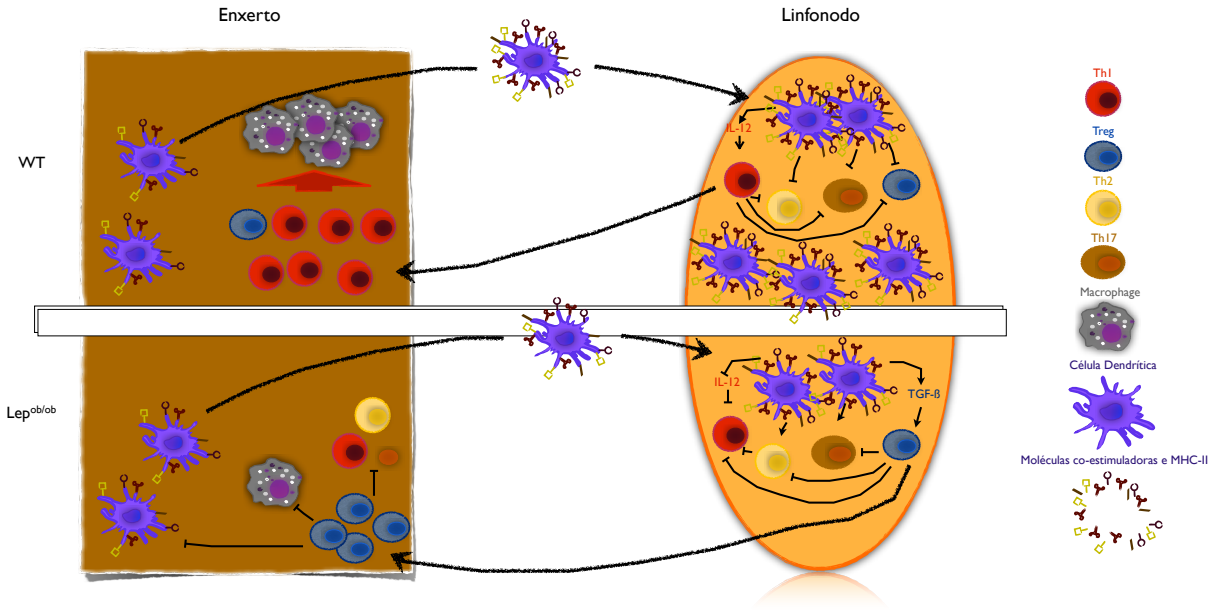

Figura 47. Modelo da regulação da resposta aloimune em animais Lep$^{ob/ob}$ e WT. As DC do receptor infiltram a pele enxertada, são ativadas e migram para o linfonodo drenante, onde irão fazer a apresentação antigênica e a indução da resposta imune. No linfonodo, as DC de animais WT produzem grandes quantidades de IL-12, induzindo uma potente resposta do padrão Th1. Essas células Th1 inibiriam a geração de células Th2, Th17 e T reguladoras (Treg). Essas células Th1 migram para o foco inflamatório, onde irão promover a rejeição do enxerto de pele. Nos animais Lep$^{ob/ob}$, as DC infiltrantes não conseguem aumentar eficientemente a expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II. Uma menor migração das DC para o linfonodo drenante, na ausência de leptina, também é observada. No linfonodo, as DC produzem grandes quantidades de TGF-β e são incapazes de secretar IL-12. Essas DC induzem maiores quantidades de células Th2, Th17 via TGF-β de células T reguladoras que agora, podem regular a resposta de células Th2, Th17 e Th1. As próprias células Th2 inibem a diferenciação de células Th1. Essas células T reguladoras geradas no linfonodo podem migrar para o foco inflamatório, inibindo a resposta inflamatória local.

8 CONCLUSÕES

- A hiperleptinemia associada à obesidade, mas não a obesidade *per se*, é um fator de risco para a perda do enxerto.
- Ambos os linfócitos T $CD4^+$ e as células dendríticas contribuem para a maior sobrevida do enxerto de pele na ausência de sinalização via leptina.
- Na ausência de leptina, as células dendríticas possuem um perfil tolerogênico, produzindo grandes quantidades de TGF-β, menor expressão de MHC-II e moléculas co-estimuladoras, induzindo uma menor proliferação em células T CD4.
- Células dendríticas derivadas da medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ são potentes indutores de células T reguladoras e Th17, sendo incapazes de na ausência de leptina, induzir células do padrão Th1.
- Células dendríticas derivadas da medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$ possuem uma ativação diferenciada de mTOR, com maior atividade dessa via de sinalização, resultando na inibição da produção de IL-12.
- Células dendríticas derivadas de medula óssea de animais $Lep^{ob/ob}$, ativadas por LPS e tratadas com rapamicina não são capazes de produzir IL-12, indicando que na ausência de leptina há um defeito na DC de induzir uma resposta do padrão Th1.
- A leptina modula a resposta aloimune, atuando como um importante fator na indução de respostas Th1 e inibindo as células Th17, Th2 e T reguladoras.

REFERÊNCIA

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2007; 148(1):32-46.

Albert MH, Liu Y, Anasetti C, Yu XZ. Antigen-dependent suppression of alloresponses by Foxp3-induced regulatory T cells in transplantation. Eur J Immunol. 2005; 35(9):2598-607.

Anand BK, Brobeck JR. Food intake and spontaneous activity of rats with lesions in the amygdaloid nuclei. J Neurophysiol. 1952; 15(5):521-30.

Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1951; 77(2):323-4.

Atalar K, Afzali B, Lord G, Lombardi G. Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. Curr Opin Organ Transplant. 2009; 14(1):23-9.

Barros CC, Almeida SS, Mori MA, Valero VB, Haro AS, Batista EC et al. Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. Int J Obes (Lond). 2009; 33(8):938-44.

Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, Lok S, Weigle DS, Erickson JC et al. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. Diabetes. 1998; 47(4):538-43.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw. 2006; 17(1):4-12.

Batra A, Okur B, Glauben R, Erben U, Ihbe J, Stroh T et al. Leptin: a critical regulator of CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo. Endocrinology. 2010; 151(1):56-62.

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(16):8374-8.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006; 441(7090):235-8.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. Eur J Immunol. 2007a; 37(4):884-95.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. J Leukoc Biol. 2007b; 81(1):161-7.

Bodor J, Feigenbaum L, Bodorova J, Bare C, Reitz MS, Jr., Gress RE. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). J Leukoc Biol. 2001; 69(6):1053-9.

Boguszewski CL, Paz-Filho G, Velloso LA. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. Endokrynol Pol. 2010; 61(2):194-206.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. J Exp Med. 2007; 204(6):1303-10.

Brobeck JR. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. Physiol Rev. 1946; 26(4):541-59.

Brooks CM. The history of thought concerning the hypothalamus and its functions. Brain Res Bull. 1988; 20(6):657-67.

Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. Eur J Immunol. 2004; 34(3):623-30.

Bumgardner GL, Henry ML, Elkhammas E, Wilson GA, Tso P, Davies E et al. Obesity as a risk factor after combined pancreas/kidney transplantation. Transplantation. 1995; 60(12):1426-30.

Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D et al. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. J Immunol. 2002; 168(2):875-82.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, Sion B, Vasson MP. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? J Leukoc Biol. 2001; 69(3):414-8.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, Vasson MP. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. Free Radic Res. 2003; 37(8):809-14.

Cao X, Zhang W, He L, Xie Z, Ma S, Tao Q et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. J Immunol. 1998; 161(11):6238-44.

Chang SH, Coates PT, McDonald SP. Effects of body mass index at transplant on outcomes of kidney transplantation. Transplantation. 2007; 84(8):981-7.

Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. Science. 2009; 326(5955):986-91.

Chen N, Gao Q, Field EH. Prevention of Th1 response is critical for tolerance. Transplantation. 1996; 61(7):1076-83.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science. 1994; 265(5176):1237-40.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162(1):156-9.

Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ et al. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. Genomics. 1997; 45(2):264-70.

Chua SC, Jr., White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE et al. Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). Diabetes. 1996; 45(8):1141-3.

Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Leibel RL. Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. Genome Res. 1996; 6(5):431-8.

Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. Curr Opin Immunol. 1998; 10(5):518-24.

Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. Diabetologia. 1973; 9(4):294-8.

Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. Am J Physiol. 1969; 217(5):1298-304.

Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. Cell. 2007; 129(2):251-62.

Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nat Neurosci. 2005; 8(5):571-8.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996; 334(5):292-5.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003; 421(6924):744-8.

Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. J Exp Med. 2009; 206(11):2407-16.

Davidson C, Verma ND, Robinson CM, Plain KM, Tran GT, Hodgkinson SJ et al. IL-13 prolongs allograft survival: association with inhibition of macrophage cytokine activation. Transpl Immunol. 2007; 17(3):178-86.

de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. Eur J Immunol. 2004; 34(9):2480-8.

De Rosa V, Procaccini C, Cali G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. Immunity. 2007; 26(2):241-55.

De Rosa V, Procaccini C, La Cava A, Chieffi P, Nicoletti GF, Fontana S et al. Leptin neutralization interferes with pathogenic T cell autoreactivity in autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 2006; 116(2):447-55.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med. 2007; 204(6):1257-65.

Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. Immunity. 2009; 30(6):832-44.

Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. Nat Immunol. 2011; 12(4):295-303.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med. 2001; 193(11):1303-10.

Ditonno P, Lucarelli G, Impedovo SV, Spilotros M, Grandaliano G, Selvaggi FP et al. Obesity in kidney transplantation affects renal function but not graft and patient survival. Transplant Proc. 2011; 43(1):367-72.

Djiane J, Attig L. Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. J Physiol Pharmacol. 2008; 59 Suppl 1:55-63.

Dovio A, Caramello V, Masera RG, Sartori ML, Saba L, Tinivella M et al. Natural killer cell activity and sensitivity to positive and negative modulation in uncomplicated obese subjects: relationships to leptin and diet composition. Int J Obes Relat Metab Disord. 2004; 28(7):894-901.

Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(5):2367-72.

Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol. 2000; 68(4):437-46.

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med. 2009; 15(8):930-9.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell. 2004; 116(2):337-50.

Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? Cell. 1995; 80(1):15-8.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395(6704):763-70.

Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S et al. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. Clin Exp Immunol. 2002; 128(1):21-6.

Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T et al. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. Nat Immunol. 2002; 3(9):875-81.

Galgani M, Procaccini C, De Rosa V, Carbone F, Chieffi P, La Cava A et al. Leptin Modulates the Survival of Autoreactive CD4+ T Cells through the Nutrient/Energy-Sensing Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. J Immunol. 2010.

Geffroy S, De Vos P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B. Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. Genomics. 1995; 28(3):603-4.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology. 1970; 18(5):723-37.

Ghahramani N, Reeves WB, Hollenbeak C. Association between increased body mass index, calcineurin inhibitor use, and renal graft survival. Exp Clin Transplant. 2008; 6(3):199-202.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. Nature. 2010; 467(7318):967-71.

Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J Exp Med. 2002; 195(12):1641-6.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature. 1997; 389(6652):737-42.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. Dev Cell. 2006; 11(6):859-71.

Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. J Biol Chem. 2002; 277(35):32124-32.

Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost MA, Matray T, Coffman RL, Liu YJ et al. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. J Exp Med. 2008; 205(2):315-22.

Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbut R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. J Physiol Pharmacol. 2007; 58(4):591-610.

Gyulveszi G, Haak S, Becher B. IL-23-driven encephalo-tropism and Th17 polarization during CNS-inflammation in vivo. Eur J Immunol. 2009; 39(7):1864-9.

Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A et al. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. Blood. 2003; 101(11):4457-63.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science. 1995; 269(5223):543-6.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005; 6(11):1123-32.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 2004; 18(16):1926-45.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003; 299(5609):1057-61.

Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. J Clin Invest. 1999; 104(8):1051-9.

Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. Immunity. 2004; 21(4):503-13.

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med. 2001; 194(6):847-53.

Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. J Biol Chem. 1995; 270(46):27728-33.

Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006; 126(6):1121-33.

Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. Semin Immunol. 2007; 19(6):409-17.

Janes MR, Fruman DA. Immune regulation by rapamycin: moving beyond T cells. Sci Signal. 2009; 2(67):25-35.

Jiang S, Golshayan D, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance. Int Immunopharmacol. 2006; 6(13-14):1879-82.

Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. Nat Med. 2008; 14(1):88-92.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1953; 140(901):578-96.

Kim SY, Lim JH, Choi SW, Kim M, Kim ST, Kim MS et al. Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. Biochem Biophys Res Commun. 394(3):562-8.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. J Immunol. 2002; 168(3):1080-6.

Klebanov S, Astle CM, DeSimone O, Ablamunits V, Harrison DE. Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. J Endocrinol. 2005; 186(1):203-11.

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. Nat Immunol. 2009; 10(6):595-602.

Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T et al. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2007; 179(12):8098-104.

Kurtz J, Raval F, Vallot C, Der J, Sykes M. CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. Blood. 2009; 113(15):3475-84.

Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007; 3(12):716-24.

Lam QL, Liu S, Cao X, Lu L. Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. Eur J Immunol. 2006; 36(12):3118-30.

Lam QL, Zheng BJ, Jin DY, Cao X, Lu L. Leptin induces CD40 expression through the activation of Akt in murine dendritic cells. J Biol Chem. 2007; 282(38):27587-97.

Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(3):1285-91.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 2009; 122(Pt 20):3589-94.

Lechler R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. Immunology. 2001; 103(3):262-9.

Lechler RI, Ng WF, Camara NO. Infectious tolerance? Mechanisms and implications. Transplantation. 2001; 72(8 Suppl):S29-31.

Lee WC, Jeng LB, Chiang YJ, Wang HC, Huang CC. Dendritic cell progenitors prolong allograft survival through T-helper 2 deviation of the Th1/Th2 paradigm. Transplant Proc. 2000; 32(7):2076-7.

Li R, Perez N, Karumuthil-Melethil S, Prabhakar BS, Holterman MJ, Vasu C. Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25-TGF-beta 1+ adaptive regulatory T cells. J Immunol. 2007; 179(8):5191-203.

Li S, Weidenfeld J, Morrisey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. Mol Cell Biol. 2004; 24(2):809-22.

Li XC. The Significance of Non-T-Cell Pathways in Graft Rejection: Implications for Transplant Tolerance. Transplantation. 2010; 90(10):1043-7.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402-8.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med. 2002; 8(5):500-8.

Lopez M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. Bioessays. 2007; 29(3):248-61.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature. 1998; 394(6696):897-901.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Lechler RI. The bioenergetics of the immune system. Science. 2001; 292(5518):855-6.

Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditonno P et al. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2011; 11(6):1248-59.

Macia L, Delacre M, Abboud G, Ouk TS, Delanoye A, Verwaerde C et al. Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. J Immunol. 2006; 177(9):5997-6006.

MacLaren R, Cui W, Cianflone K. Adipokines and the immune system: an adipocentric view. Adv Exp Med Biol. 2008; 632:1-21.

Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. J Immunol. 2002; 168(8):4018-24.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 2006; 441(7090):231-4.

Mansour E, Pereira FG, Araujo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR et al. Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. Endocrinology. 2006; 147(11):5470-9.

Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL et al. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. Transplantation. 1997; 64(2):329-35.

Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(14):5150-5.

Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK, Di Tuoro A et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2001a; 166(10):5909-16.

Matarese G, Procaccini C, De Rosa V. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? J Leukoc Biol. 2008; 84(4):893-9.

Matarese G, Sanna V, Di Giacomo A, Lord GM, Howard JK, Bloom SR et al. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. Eur J Immunol. 2001b; 31(5):1324-32.

Mattarollo SR, Yong M, Tan L, Frazer IH, Leggatt GR. Secretion of IFN-gamma but not IL-17 by CD1d-restricted NKT cells enhances rejection of skin grafts expressing epithelial cell-derived antigen. J Immunol. 2010; 184(10):5663-9.

Mattioli B, Giordani L, Quaranta MG, Viora M. Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway. FEBS Lett. 2009; 583(7):1102-6.

Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. J Immunol. 2005; 174(11):6820-8.

Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. Mult Scler. 1999; 5(2):101-4.

Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H et al. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase-

and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. J Biol Chem. 2008; 283(4):2203-10.

Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation. Cell Cycle. 2008; 7(12):1713-7.

Mayer J, Thomas DW. Regulation of food intake and obesity. Science. 1967; 156(773):328-37.

McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. Immunity. 2008; 28(4):445-53.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Immunity. 2002; 16(2):311-23.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ et al. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol. 1996a; 8(10):733-5.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett. 1996b; 387(2-3):113-6.

Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. Hum Immunol. 2010.

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science. 2007; 317(5835):256-60.

Najafian N, Sayegh MH. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent. Expert Opin Investig Drugs. 2000; 9(9):2147-57.

Oderup C, Malm H, Ekberg H, Qi Z, Veress B, Ivars F et al. Costimulation blockade-induced cardiac allograft tolerance: inhibition of T cell expansion and accumulation of intragraft cD4(+)Foxp3(+) T cells. Transplantation. 2006; 82(11):1493-500.

Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. Semin Immunopathol. 2010; 32(2):95-106.

Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. Blood. 2008; 112(3):635-43.

Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(10):3686-95.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat Immunol. 2007; 8(12):1353-62.

Papalia T, Greco R, Lofaro D, Maestripieri S, Mancuso D, Bonofiglio R. Impact of body mass index on graft loss in normal and overweight patients: retrospective analysis of 206 renal transplants. Clin Transplant. 2010; 24(6):E241-6.

Papatriantafyllou M. T cells: mTOR lullabies for naive T cells. Nat Rev Immunol. 2011.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol. 2005; 6(11):1133-41.

Peters JH, Koenen HJ, Hilbrands LB, Joosten I. Immunotherapy with regulatory T cells in transplantation. Immunotherapy. 2009; 1(5):855-71.

Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. J Immunol. 2001; 167(3):1137-40.

Pini M, Fantuzzi G. Enhanced production of IL-17A during zymosan-induced peritonitis in obese mice. J Leukoc Biol. 2010; 87(1):51-8.

Pini M, Gove ME, Sennello JA, van Baal JW, Chan L, Fantuzzi G. Role and regulation of adipokines during zymosan-induced peritoneal inflammation in mice. Endocrinology. 2008; 149(8):4080-5.

Posey K, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008.

Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. Immunity. 2010; 33(3):301-11.

Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Abanni L, Cali G, Porcellini A et al. An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. Immunity. 2010; 33(6):929-41.

Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. J Immunol. 2006; 177(7):4376-83.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med. 2000; 192(2):295-302.

Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L et al. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(43):15434-9.

Rosenberg AS, Finbloom DS, Maniero TG, Van der Meide PH, Singer A. Specific prolongation of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN-gamma monoclonal antibody. J Immunol. 1990; 144(12):4648-50.

Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. Induction of immunologic tolerance for transplantation. Physiol Rev. 1999; 79(1):99-141.

Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 24(5):518-26.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995; 155(3):1151-64.

Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, 3rd et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. J Exp Med. 1997; 185(1):171-5.

Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenacher K, Mages J, Haas T et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. Eur J Immunol. 2008; 38(11):2981-92.

Segal BM. Getting to the crux of the matter: IL-23 and Th17 cell accumulation in the CNS. Eur J Immunol. 2009; 39(7):1713-5.

Sennello JA, Fayad R, Pini M, Gove ME, Fantuzzi G. Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice. Cytokine. 2006; 36(5-6):261-6.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. J Exp Med. 2005; 201(5):723-35.

Shen H, Goldstein DR. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. J Am Soc Nephrol. 2009; 20(5):1032-40.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. 2009; 30(5):636-45.

Siegmund B, Lear-Kaul KC, Faggioni R, Fantuzzi G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. Eur J Immunol. 2002; 32(2):552-60.

Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. J Immunol. 2008; 181(9):5948-55.

Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity. 2009; 31(2):331-41.

Taleb S, Herbin O, Ait-Oufella H, Verreth W, Gourdy P, Barateau V et al. Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27(12):2691-8.

Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. Am J Transplant. 2005; 5(2):228-36.

Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem. 1997; 272(10):6093-6.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995; 83(7):1263-71.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. J Exp Med. 2001; 193(11):1311-8.

Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, Lucas PJ, Gress RE, Levine BL et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. Blood. 2004; 104(12):3804-12.

Thai NL, Fu F, Qian S, Sun H, Gao L, Wang SC et al. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. Graft rejection is associated with augmented TH1 function. Transplantation. 1995; 59(2):274-81.

Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 298(3):297-302.

Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. Nat Immunol. 2008; 9(2):194-202.

Turnquist HR, Cardinal J, Macedo C, Rosborough BR, Sumpter TL, Geller DA et al. mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. Blood. 2010; 115(23):4758-69.

Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. J Immunol. 2007; 178(11):7018-31.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity. 2006; 24(2):179-89.

Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Neuroimmunomodulation. 2008; 15(3):189-93.

Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. J Antibiot (Tokyo). 1975; 28(10):721-6.

Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Muller A, Vella JP et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. J Clin Invest. 2001; 107(7):909-16.

Waaga-Gasser AM, Grimm MR, Lutz J, Lange V, Lenhard SM, Aviles B et al. Regulatory allospecific T cell clones abrogate chronic allograft rejection. J Am Soc Nephrol. 2009; 20(4):820-30.

Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. Immunol Rev. 2006; 212:301-13.

Wang MY, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR et al. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(11):4813-9.

Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. Immunity. 2008; 29(4):565-77.

Williams KW, Elmquist JK. Lighting up the hypothalamus: coordinated control of feeding behavior. Nat Neurosci. 2011; 14(3):277-8.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. Immunity. 2007; 27(1):145-59.

Yapici U, Kers J, Bemelman FJ, Roelofs JJ, Groothoff JW, van der Loos CM et al. Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome. Transpl Int. 2011.

You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(15):6335-40.

Zarkesh-Esfahani H, Pockley AG, Wu Z, Hellewell PG, Weetman AP, Ross RJ. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. J Immunol. 2004; 172(3):1809-14.

Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. J Immunol. 2001; 167(8):4593-9.

Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. J Immunol. 2003; 170(4):2153-60.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994; 372(6505):425-32.

Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 300(2):247-52.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell. 1997; 89(4):587-96.

Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. Nature. 2009; 458(7236):351-6.

Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. Curr Opin Immunol. 2009; 21(2):146-52.

ANEXO

Anexo A – Artigo aceito para publicação

Exploring the Role of Soluble Factors Associated with Immune Regulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells. Ênio José Bassi, Danilo Candido de Almeida, Pedro Manoel Mendes Moraes-Vieira &Niels Olsen Saraiva Câmara. *Stem Cell Reviews and Reports.*

Anexo B – Artigos submetidos para publicação

Leptin modulates dendritic cell function influencing the balance of regulatory and Th17 cells in alloimmunity. Moraes-Vieira, PM; Bassi, EJ; Larocca, RA; Lepique A; Quintana FJ, AP; Araujo, RC; Basso, AS; Strom, T.B.; Câmara, NOS. *Journal of Clinical Invetigation.*

Leptin, the link between the immune system and kidney diseases: leading actor or just a coadjuvant? Pedro M M Moraes-Vieira, Ênio José Bassi, Ronaldo C Araujo, Niels Olsen S Câmara. *Nature Nephrology Reviews*.

Immune regulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune type I diabetes. Ênio J. Bassi, Pedro M. M. Moraes-Vieira, Leonardo M. Vieira, Cláudia Silva Cunha, Meire Ioshie Hiyane, Alexandre S. Basso, Alvaro Pacheco-Silva, and Niels O. S. Câmara. *Diabetes.*

Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice. Andréa M. Caricilli, Paty K. Picardi, Lélia L. de Abreu, Mirian Ueno, Patrícia O. Prada, Eduardo R. Ropelle, Sandro Massao Hirabara, Ângela Castoldi, Pedro M. Moraes-Vieira, Niels O. S. Camara, Rui Curi, José B. Carvalheira, Mário J. A. Saad. *Plos Biology*.