

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

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- γ ⁺. 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 cocultivo 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-17⁺ e CD4⁺IL-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 immune responses**. 2011. 143 p. Thesis (Doctor in Immunologia). 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 generation 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.

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).

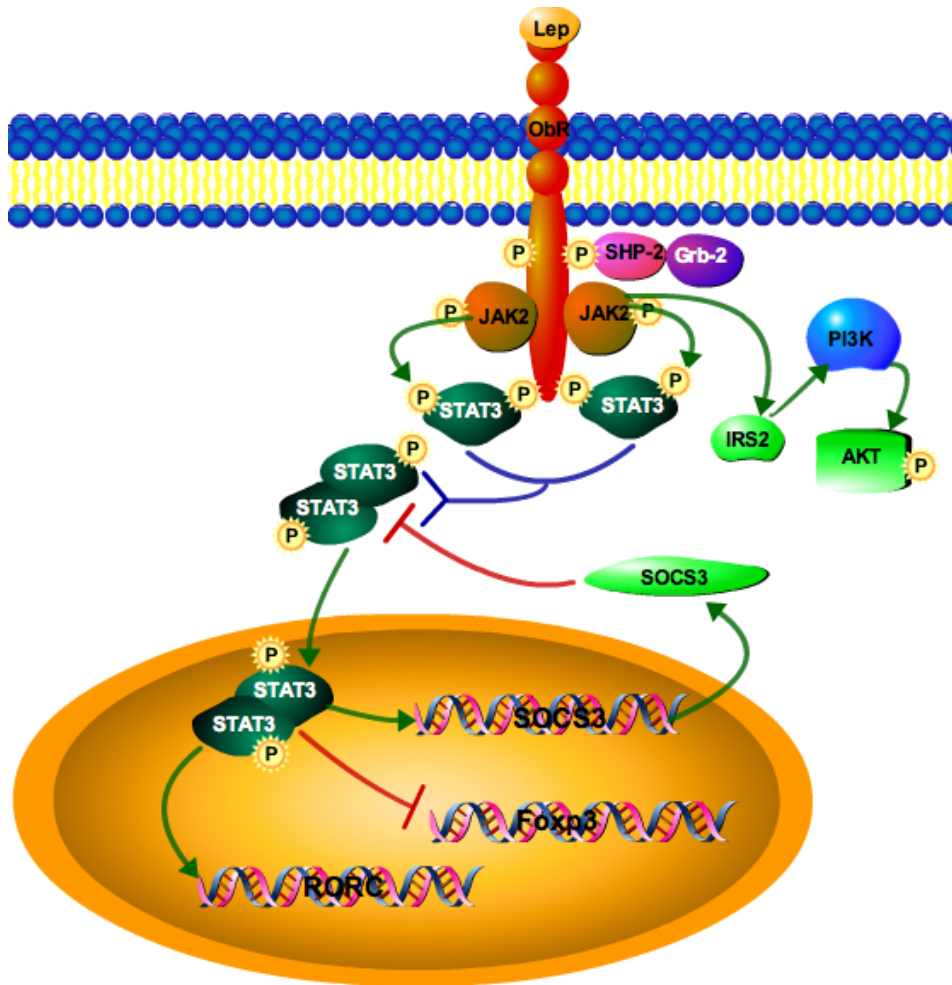


Figura 1. Via de sinalização desencadeada pela ligação da leptina ao seu receptor e possíveis alvos de STAT-3 ativada pela ligação da leptina ao seu receptor (ObRb) em linfócitos T. A ligação da leptina ao seu receptor induz o recrutamento de SHP-2 (do inglês, *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*) 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 kinases 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 proteína ROR γ T.

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, conseqüentemente, 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 (orexígeno), 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 significativamente 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 encephalomyelitis*) (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-1 β 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, ciclooxigenase, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 β (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 al., 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 adhesion molecules*) e VLA2 (do inglês, *very late antigen 2*) em resposta ao IFN γ (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, IFN γ , 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 ROR γ T (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 Morrissey, 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-Related 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 (Pandiyani 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 $IFN-\gamma$ 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, inexistem 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, *mammalian 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 rápida 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⁺ MOG₃₅₋₅₅ 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 hydropiscus*, 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 resposta 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).

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 sobrevivência 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, Palmethofer 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 dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med*. 2008; 205(2):315-22.

Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbust 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, Ghatel 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 ROR γ 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.

Laplane 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, Morrissey 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, Ditunno 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.

Pandiyani 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, Maestriperi 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, Panoskaltis-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.