

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

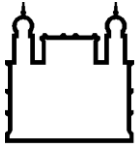
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação dos Efeitos da Administração Crônica de Leptina sobre a Migração
e Ativação de Células do Sistema Imune**

Jéssica Aparecida da Silva Pereira

RIO DE JANEIRO

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jéssica Aparecida da Silva Pereira

**Avaliação dos Efeitos da Administração Crônica de Leptina sobre a Migração
e Ativação de Células do Sistema Imune**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dra. Clarissa Maya Menezes Monteiro

RIO DE JANEIRO

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436 Pereira, Jéssica Aparecida da Silva

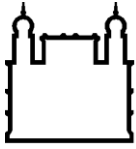
Avaliação dos efeitos da administração crônica de leptina sobre a migração e ativação de células do sistema imune / Jéssica Aparecida da Silva Pereira. – Rio de Janeiro, 2017.
xx, 138 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Bibliografia: f. 104-117

1. Leptina. 2. Tratamento crônico. 3. Migração celular. 4. Corpúsculos lipídicos. I. Título.

CDD 611.01827



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Jéssica Aparecida da Silva Pereira

**Avaliação dos Efeitos da Administração Crônica de Leptina sobre a Migração
e Ativação de Células do Sistema Imune**

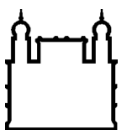
ORIENTADOR: Prof^ª Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro

Aprovado em: 14/03/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo - Presidente
Prof. Dr. Ingo Riederer - Titular
Prof. Dr. Bruno Diaz - Titular
Prof. Dra. Carmen Penido – Suplente/Revisora
Prof. Dra. Christianne Bandeira Melo - Suplente

Rio de Janeiro, 14 de março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

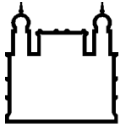
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE LEPTINA SOBRE A MIGRAÇÃO E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Aparecida da Silva Pereira

Leptina é uma adipocina secretada majoritariamente pelo tecido adiposo como produto do gene *ob* e envolvida na regulação do gasto energético e saciedade. A leptina desempenha um importante papel na ativação de diferentes tipos celulares. Sua sinalização ocorre a partir de sua ligação a receptores Ob-R, sendo sua associação à isoforma de cadeia longa do receptor (Ob-Rb) sugerida como a principal responsável por seus efeitos anorexigênicos no sistema nervoso central e sua participação na regulação de respostas imunes periféricas. Como a massa de tecido adiposo está aumentada na obesidade, ocorre uma maior produção de leptina pelos adipócitos maduros e isto acarreta níveis elevados de leptina circulante. No entanto, em condições de obesidade é observado o desenvolvimento de um quadro de resistência central à leptina. O impacto da hiperleptinemia sobre a ativação das respostas imunes ainda é um assunto pouco explorado e não se sabe se ocorre uma resistência periférica. Com o presente trabalho buscamos compreender os efeitos promovidos pela hiperleptinemia induzida pela administração crônica de leptina sobre a migração e ativação de leucócitos em camundongos da linhagem C57BL/6 na ausência de obesidade. Nós observamos que, apesar da realização de administrações recorrentes de leptina, os animais estimulados cronicamente continuam respondendo a algumas ações desencadeadas pela adipocina, apresentando sutil redução de peso a cada nova administração. Observamos que o estímulo crônico com leptina a 2 mg/kg é capaz de gerar uma redução significativa da glicemia dos animais, o que não foi observado com a administração de leptina a 1 mg/kg. A avaliação de seus efeitos sobre o sistema imune revelou que o estímulo crônico promoveu o aumento na migração de células mononucleares e eosinófilos para cavidade peritoneal, de forma independente da concentração de leptina administrada. Também foi verificada uma maior ativação de células mononucleares em animais estimulados com leptina, evidenciada pelo aumento de CLs nesta população celular. No entanto, não houve alteração na secreção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 β . Foi verificado também que o estímulo recorrente com leptina utilizando 1 mg/kg promoveu o aumento nos níveis de eotaxina tanto no sangue quanto na cavidade peritoneal, o que não ocorreu quando o dobro da dose foi administrado. Isto sugere que a liberação de fatores quimioatrativos para eosinófilos pode ser modulada por leptina de forma dose dependente. Nossos dados sugerem a participação de leptina sobre a migração e ativação de células imunes na cavidade peritoneal mesmo quando administrações recorrentes são realizadas. Desta forma, este trabalho contribui para o melhor entendimento das ações periféricas da leptina sobre a população de leucócitos na ausência de obesidade.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE EFFECTS OF CHRONIC LEPTIN ADMINISTRATION ON MIGRATION AND ACTIVATION OF IMMUNE CELLS

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Aparecida da Silva Pereira

Leptin is an adipokine secreted mostly by adipose tissue as a product of the *ob* gene and involved in the regulation of energy expenditure and satiety. Leptin plays an important role in the activation of different cell types. Its signaling occurs from its binding to Ob-R receptors, and its association with the long chain isoform of the receptor (Ob-Rb) is suggested as the main responsible for its anorexigenic effects on the central nervous system and its participation in the regulation of immune responses peripheral regions. As the mass of adipose tissue is increased in obesity, there is a greater production of leptin by mature adipocytes and this leads to elevated levels of circulating leptin. However, under conditions of obesity the development of a central resistance to leptin is observed. The impact of hyperleptinemia on the activation of immune responses is still an unexplored subject and it is not known whether peripheral resistance occurs. The present work aimed to understand the effects of hyperleptinemia induced by chronic leptin administration on the migration and activation of leukocytes in mice of the C57BL/6 lineage in the absence of obesity. We observed that, despite the occurrence of recurrent leptin administrations, chronically stimulated animals continue to respond to some actions triggered by adipokine, presenting subtle weight reduction at each new administration. We observed that the chronic stimulus with leptin at 2 mg/kg is able to generate a significant reduction of the glycemia of the animals, which was not observed with the administration of leptin at 1 mg/kg. The evaluation of its effects on the immune system revealed that the chronic stimulus promoted an increase in the migration of mononuclear cells and eosinophils to the peritoneal cavity independently of the leptin concentration administered. It was also verified a greater activation of mononuclear cells in animals stimulated with leptin, evidenced by the increase of CLs in this cellular population. However, there was no change in the secretion of inflammatory mediators such as TNF- α and IL-1 β . It was also found that recurrent leptin stimulation using 1 mg/kg promoted increased eotaxin levels in both the blood and peritoneal cavity, which did not occur when twice the dose was given. This suggests that the release of chemoattractant factors to eosinophils can be modulated by leptin in a dose-dependent manner. Our data suggest the participation of leptin on the migration and activation of immune cells in the peritoneal cavity even when recurrent administrations are performed. Thus, this work contributes to a better understanding of peripheral leptin actions on the leukocyte population in the absence of obesity.

Dedico este trabalho ao meu grande companheiro e..marido??? Gerson Profeta e a todos que contribuíram de algum modo para sua execução.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro, profissional que por muitas vezes tentou e quase conseguiu me enlouquecer, por toda sua certificação experimntal excessiva e momentos de provações que ao longo desses dois anos fizeram com que eu quisesse sempre estar um passo a frente para não deixar brechas que pudessem ser questionáveis. Isso sem sombra de dúvidas me impulsionou a ser uma pessoa e profissional melhor. E à minha amiga Clarissa Menezes Maya Monteiro que tem um coração que não cabe dentro do peito, sempre disposta a ajudar e ouvir, mesmo que no final ela ache que a solução mais fácil é a que ela está dizendo pra você seguir e não aquela que você acredita ser a melhor. Um beijo no seu coração!

À Dra. Patrícia Bozza por ter aberto as portas de seu laboratório e me dado a oportunidade de acompanhar discussões científicas que certamente contribuíram muito pra meu amadurecimento profissional.

Aos pesquisadores Adriana Vallochi, Cecília Jacques e Jens Rietdorf por toda ajuda na execução dos meus experimentos gigantes e por toda contribuição durante discussões científicas.

Às meninas do grupo leptina por toda sua ajuda nos experimentos e por terem contribuído para minha entrada nesse árduo mundo cheio de mistérios chamado Leptina.

À minha companheira de mesa, bancada, processos burocráticos, dramas experimentais e orientacionais, cálculos.. enfim, companheira de vida. Lohanna obrigada por ser essa pessoa incrível, amiga acima de qualquer coisa, sempre disposta a encarar junto qualquer desafio para não deixar o barco afundar. Cabrita, obrigada por todas as horas de conversa e companheirismo e por ter aprendido que o certo é BOLACHA.

À amiga Glaucia Almeida por toda preocupação, cuidado e excepcional capacidade de ouvir e apaziguar os momentos de angústia. Obrigada Glau, conte comigo sempre.

À toda equipe do laboratório de Imunofarmacologia, aos colegas Sally, Rose, Leonardo, Lívia, Ana Paula, Luciana, Natalia, Ester, Vinícius, Suelen, Vinícius Guerra, e a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço em especial aos amigos Edson, Surrage, Alan e Eugênio pelos conselhos e conversas amigáveis, discussões científicas, e momentos de descontração. Obrigada por terem acolhido a mim e meu monstinho e serem sempre pessoas tão queridas.

À toda equipe da secretaria acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Julimar, por todo seu esforço e profissionalismo que por diversas vezes me salvou ao longo desses dois anos pelos mais variados motivos.

À toda equipe do biotério de experimentação animal do HPP, sobretudo à Giuliana Schirato por todo amor pelo que faz e pela sua disponibilidade em esclarecer todas as dúvidas e sua disposição em solucionar todos os pequenos problemas de modo a garantir que tudo saísse da melhor forma possível.

À Dra. Christianne Bandeira Melo e sua aluna Natália Amorim pela ajuda nos experimentos.

À banca avaliadora por ter aceito meu convite, em especial à Dra. Carmen Penido por ter aceito a árdua tarefa de revisora.

Ao meu companheiro de todas horas, amigo para qualquer nova aventura e futuro oficialmente já marido e monstro em tempo integral, Gerson Profeta de Souza. Você é minha inspiração para buscar dar sempre o meu melhor. Obrigada por ter sido sempre aquele que me traz de volta ao meu caminho, que está ao meu lado independente da circunstância e por não concordar comigo quando eu estou errada só para me deixar achar que tenho razão por mais que isso doa em nós dois. Obrigada por ser esse profissional incrível, com uma dedicação inigualável, capaz de contribuir sempre com idéias de novos experimentos, por executar eles comigo mesmo que isso signifique passar noites em claro, e por sempre contribuir na interpretação e discussão de resultados. Você sempre me completa. Eu te amo muito!

Aos amigos Fernando Genta e Marisa Momoli por terem nos recebido de braços abertos e nos tornado parte de sua família. Obrigada por terem me dado a honra de conviver com sua integridade, caráter e companheirismo e por me tornar a Tia Jéssica de duas meninas lindas que parecem ser a cura para todo momento de estresse. Amo muito vocês, vocês me fizeram uma pessoa muito melhor.

Aos meus familiares, por compreenderem que as vezes é preciso sair de perto para que possamos expandir os horizontes, crescermos profissionalmente e amadurecermos como pessoa. Em especial à minha mãe Maria, minha irmã/mãe Michelle (Loló) e minha amiga (não cunhada) Joice. Obrigada por se importarem conosco e torcerem sempre pelo nosso sucesso.

Aos amigos Katia, Wagner e Ivarne, profissionais excepcionais que muito contribuíram para o início da minha jornada no mundo científico.

Às minhas queridas amigas de Aline Tirelli, Soraya, Irailde e Juliana por estarem sempre presentes mesmo a distância. Obrigada por sempre terem torcido por nós e vibrado com cada nova conquista.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste trabalho.

À todos que de algum modo participaram da realização deste trabalho, muito obrigada

*Mudar é complicado, mas se acomodar é perecer...
...é necessário ser capaz de ter medo de não renovar
a energia e de perder a oportunidade*

Mario Sergio Cortella

*“Eu devia sorrir mais, abraçar meus pais,
viajar o mundo e socializar
Nunca reclamar, só agradecer
Tudo o que vier eu fiz por merecer
Eu devia sorrir mais, abraçar meus pais,
viajar o mundo e socializar
Nunca reclamar, só agradecer
Fácil de falar, difícil fazer”*

(Supercombo – Piloto Automático)

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO - 5-Lipoxigenase

ADRP - *Adipose differentiation related protein* (proteína relacionada à diferenciação adiposa)

AgRP - *Agouti-related protein* (proteína relacionada ao agouti)

AMPK - *cAMP-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por AMPc)

APC – *Antigen presentation cell* (células apresentadoras de antígenos)

APS - *Ammonium persulfate* (persulfato de amônio)

ATM – *Adipose tissue macrophage* (macrófago residente do tecido adiposo)

BSA – *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CCL-11 - *C-C chemokine ligand 11* (ligante 11 de quimiocinas C-C - eotaxina)

CECAL – Centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz

CEUA – Comissão de ética de uso de animais

CLs - Corpúsculos lipídicos

COX-2 – Ciclooxygenase-2

cPLA₂ – *Cytosolic phospholipase A₂* (fosfolipase A₂)

DIO – *Diet induced obesity* (obesidade induzida por dieta)

EC - Ésteres de colesterol

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase* (quinase regulada por sinal extracelular)

fd - fator de diluição

FDA - *Food and drug association*

G-CSF – *Granulocyte-colony stimulating factor* (fator estimulador de colônias de granulócitos)

HIV - *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

i.p. - intraperitoneal

IFN- γ - Interferon - gama

IL-1 - Interleucina - 1

IL-2 - Interleucina - 2

IL-4 - Interleucina - 4

IL-6 - Interleucina - 6

IL-10 - Interleucina - 10

IL-12 - Interleucina - 12

IMC - Índice de massa corporal
IRS – *Insulin receptor substrate* (substrato do receptor de insulina)
JAK2 - *Janus kinase 2* (Janus quinase 2)
kDa - kilodalton
LIF - *Leukemia inhibitory factor* (fator inibitório de leucemia)
LPS - Lipopolissacarídeo
LTB₄ - Leucotrieno B₄
MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimiotática de monócitos-1)
mTOR - *Mammalian target of rapamycin* (alvo de rapamicina em mamíferos)
NF- κ B – *Nuclear factor – κ B* (fator nuclear – κ B)
NK - Células *natural killer*
NO - Óxido nítrico
NPY - Neuropeptídeo Y
OMS - Organização mundial da saúde
ORO - *Oil red O*
p/v - peso/volume
p38 MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógenos)
PBS – *Phosphate-buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidil inositol 3 quinase)
POMC - Proopiomelanocortina
PTP1B – *Protein tyrosine phosphatase 1B* (proteína fosfotirosina fosfatase 1B)
q.s.p. - quantidade suficiente para
RE - Retículo endoplasmático
rpm - rotações por minuto
SDS - *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de SDS
SEM – *Standard error of the median* (erro médio padrão)
SOCS3 – *Suppressor of cytokine signaling 3* (supressor da sinalização de citocinas 3)
STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription 3* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3)
TAG - Triacilgliceróis

TBS – *Tris-buffered saline* (solução salina tamponada com Tris)

TBS-T – *Tris-buffered saline and Tween* (solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween)

TEMED - N’N’N’N’-Tetrametiletlenodiamina

TIP47 - *Tail-interacting protein of 47 kDa* (proteína de interação de cauda de 47 kDa)

TLR2 – *Toll-like receptor 2* (receptores do tipo Toll 2)

TNF- α – *Tumor necrosis factor – alpha* (fator de necrose tumoral-alfa)

Treg - Células T reguladoras

v/v - volume/volume

WAT – *White adipose tissue* (tecido adiposo branco)

WB - *Western blotting*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Dados globais do percentual de indivíduos obesos.....	1
Figura 1.2. Distribuição de tecido adiposo branco subcutâneo e visceral no corpo humano e alterações no perfil de células do sistema imune em indivíduos obesos e saudáveis.....	3
Figura 1.3. Camundongos normais e camundongos apresentando mutação no gene <i>ob</i> mantidos sobre as mesmas dietas e condições ambientais.....	4
Figura 1.4. Modelo do experimento de parabiose desenvolvido por Coleman em 1973.....	5
Figura 1.5. Níveis da proteína OB em camundongos com obesidade induzida por dieta e animais <i>ob/ob</i>	7
Figura 1.6. Homologia entre a estrutura cristalográfica de citocinas.....	9
Figura 1.7. Representação esquemática das seis isoformas do receptor de leptina.....	10
Figura 1.8. Diagrama ilustrando o <i>locus</i> genômico do receptor de leptina e 5 possibilidades de <i>splicing</i> alternativo para formação de diferentes isoformas do receptor.....	11
Figura 1.9. Isoforma longa do receptor de leptina em seu estado livre (sem a ligação de leptina), sua forma ativa e sua forma inativada.....	13
Figura 1.10. Vias de sinalização ativadas pela ligação de leptina à receptores Ob-Rb.....	15
Figura 1.11. Representação esquemática mostrando o aumento da secreção de leptina durante a adipogênese.....	16
Figura 1.12. Correlação entre leptina e regulação do balanço energético.....	17
Figura 1.13. Leptina e mediadores inflamatórios interagindo de forma co-dependente.....	19
Figura 1.14. Leptina modulando a atividade e função de diferentes tipos celulares do sistema imunológico através de mecanismo direto ou indireto.....	22
Figura 1.15. Modelo de brotamento proposto para biogênese dos corpúsculos lipídios (CLs).....	24
Figura 1.16. Modelo de envolvimento proposto para biogênese dos corpúsculos lipídios (CLs).....	25
Figura 3.1. Representação esquemática da distribuição de grupos.....	33
Figura 3.2. Representação esquemática do estímulo I.....	35
Figura 3.3. Representação do esquema de estímulo II.....	35
Figura 3.4. Representação do esquema de estímulo III.....	36
Figura 3.5. Representação do esquema de estímulo IV.....	37
Figura 3.6. Representação do esquema de estímulo V.....	37

Figura 3.7. Representação esquemática do estímulo VI.....	38
Figura 3.8. Representação do esquema de estímulo VII.....	39
Figura 3.9. Representação esquemática do estímulo VIII.....	40
Figura 4.1. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo I.....	51
Figura 4.2. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo II.....	53
Figura 4.3. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo III.....	54
Figura 4.4. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo IV.....	55
Figura 4.5. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo V.....	56
Figura 4.6 Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos submetidos ao estímulo VIII.....	57
Figura 4.7. Dosagem de glicemia de jejum de animais submetidos ao estímulo crônico com leptina.....	59
Figura 4.8. Contagem de leucócitos totais na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina.....	61
Figura 4.9. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina na concentração de 1 mg/kg.....	63
Figura 4.10. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina na concentração de 2 mg/kg.....	64
Figura 4.11. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo VI.....	65
Figura 4.12. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo VII.....	66
Figura 4.13. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo VIII (subcutâneo).....	68
Figura 4.14. Contagem de leucócitos totais circulantes de animais estimulados cronicamente com leptina.....	70
Figura 4.15. Contagem de leucócitos totais circulantes de animais estimulados cronicamente com leptina pela via subcutânea.....	71

Figura 4.16. Contagem diferencial de leucócitos circulantes de camundongos estimulados cronicamente com leptina 1 mg/kg.....	73
Figura 4.17. Contagem diferencial de leucócitos circulantes de camundongos estimulados cronicamente com leptina 2 mg/kg.....	74
Figura 4.18. Contagem diferencial de leucócitos circulantes de camundongos estimulados cronicamente com leptina pela via subcutânea.....	76
Figura 4.19. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na medula óssea de camundongos submetidos ao estímulo II e III.....	78
Figura 4.20. Contagem total de leucócitos presentes no baço e linfonodos de camundongos submetidos ao estímulo II.....	79
Figura 4.21. Avaliação da biogênese de CLs em células provenientes da cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo II.....	81
Figura 4.22. Avaliação da biogênese de CLs em células provenientes da cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo III.....	82
Figura 4.23. <i>Western Blotting</i> de células obtidas de lavado peritoneal de camundongos submetidos ao estímulo II.....	83
Figura 4.24. Região determinada em tamanho (FSC) <i>versus</i> complexidade (SSC) nas análises de citometria de fluxo em células obtidas de animais submetidos ao estímulo III.....	85
Figura 4.25. Controle isotípico IgG da região determinada em tamanho (FSC) <i>versus</i> complexidade (SSC) nas análises de citometria de fluxo em células obtidas de animais submetidos ao estímulo III.....	86
Figura 4.26. Análises de citometria de fluxo em células obtidas de animais submetidos ao estímulo III.....	87
Figura 4.27. Análises de citometria de fluxo para avaliação de CLs em macrófagos provenientes de animais submetidos ao estímulo III.....	88
Figura 4.28. Quantificação dos níveis de leptina presentes no soro/plasma e na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina.....	90
Figura 4.29. Quantificação dos níveis de eotaxina presentes no soro/plasma e na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina.....	91
Figura 4.30. Dosagem de citocinas presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com leptina.....	92
Figura 6.1. Representação esquemática dos efeitos observados em resposta ao estímulo crônico com leptina.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Ações da leptina sobre a resposta imune inata e imunidade adquirida.....	20
Tabela 3.1 – Volumes de reagentes empregados para obtenção de 2 mini géis a 7,5%.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leptina	4
1.1.1. Estrutura	8
1.2. Receptores de Leptina	9
1.3. Vias de Sinalização.....	13
1.4. Leptina e Sistema neuroendócrino	16
1.5. Leptina e Sistema Imune	18
1.6. Leptina e Corpúsculos Lipídicos	23
1.7. Resistência à Leptina	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Animais.....	31
3.2. Vermifugação dos Animais.....	31
3.3. Doses e intervalos de administração seguidos durante o estímulo com leptina	32
3.4. Dosagem de Glicemia.....	40
3.5. Contagem Total e Diferencial Sangue.....	41
3.6. Punção cardíaca	42
3.7. Lavado Peritoneal	42
3.8. Marcação de corpúsculos lipídicos por <i>Oil Red O (ORO)</i>	43
3.9. Quantificação de citocinas	43
3.10. Lise Celular.....	44
3.11. Quantificação de Proteínas	44
3.12. <i>Western Blotting</i>	45
3.13. Citometria de Fluxo.....	46
3.14. Análises estatísticas	47
3.15. Preparo de Soluções	47
3.15.1. <i>PBS</i>	47
3.15.2. <i>Oil Red O solução estoque 3 %</i>	47
3.15.3. <i>May-Grünwald 0,25 %</i>	48
3.15.4. <i>Rippa Buffer - Tampão de Lise</i>	48
3.15.5. <i>Tampão de Corrida</i>	48
3.15.6. <i>Tampão de Transferência</i>	48

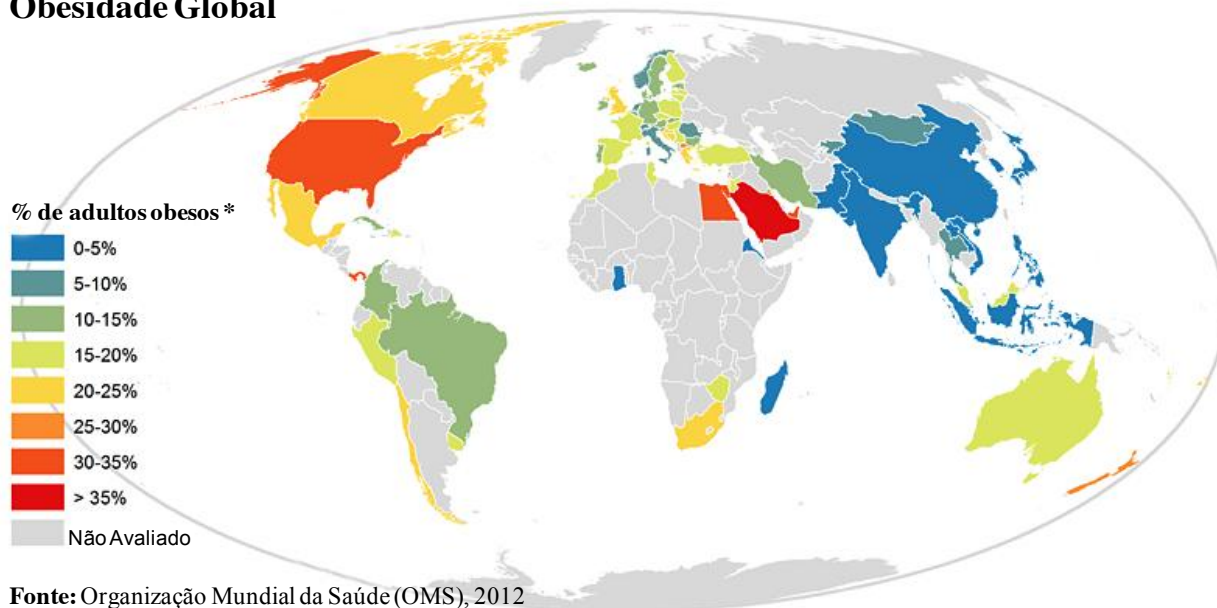
3.15.7.	<i>Solução Salina Tamponada com Tris (TBS)</i>	48
3.15.8.	<i>Solução Salina Tamponada com Tris acrescida de Tween (TBS-T)</i>	49
3.15.9.	<i>Coloração de Ponceau S</i>	49
3.15.10.	<i>Tampão de Bloqueio para WB</i>	49
4.	RESULTADOS	50
4.1.	Padronização da Metodologia Empregada nos Ensaios	50
4.2.	Influência do estímulo crônico com leptina sobre glicemia	58
4.3.	Efeitos da administração crônica de leptina sobre a migração de leucócitos para cavidade peritoneal	60
4.4.	Efeitos da administração crônica de leptina sobre a população de leucócitos circulantes	69
4.5.	Efeitos do estímulo crônico com leptina sobre a população leucocitária de órgãos imunes primários e secundários	77
4.6.	Avaliação do efeito de leptina sobre a biogênese de CLs	80
4.7.	Avaliação da expressão de ADRP em resposta ao estímulo crônico com leptina ...	83
4.8.	Citometria de Fluxo	84
4.9.	Avaliação de mediadores inflamatórios em resposta ao estímulo crônico com leptina	89
5.	DISCUSSÃO	93
6.	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídeos no tecido adiposo branco (WAT), decorrente do desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (Fairbridge *et al.*, 2015). Fatores como a má alimentação e sedentarismo estão frequentemente associados ao desenvolvimento da doença. Contudo, algumas disfunções genéticas, e outras patologias como hipotireoidismo, podem contribuir para o ganho excessivo de peso e, como consequência, levar ao quadro de obesidade (Weaver, 2008; Who, 2016).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam um aumento no número de indivíduos com sobrepeso nos últimos anos, sendo registrados mais de 1,9 bilhões de indivíduos adultos nessa condição, apresentando índices de massa corporal (IMC) superiores a 25 kg/m², dentre os quais 600 milhões são obesos, apresentando IMC superior a 30 kg/m² (Figura 1.1) (Who, 2016; Eckel *et al.*, 2011).

Obesidade Global



* Indivíduos obesos correspondem a pessoas com IMC > 30

Figura 1.1. Dados globais do percentual de indivíduos obesos (IMC > 30) segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2012). Figura adaptada de Lovell Johns, 2012.

Além do crescente número de indivíduos acometidos pela obesidade, um dos fatores que a caracterizam como uma das principais preocupações para a saúde global é o desenvolvimento de comorbidades, promovendo, desta forma, uma redução na qualidade e expectativa de vida do indivíduo (Who, 2016). Neste sentido, diversos trabalhos têm demonstrado um forte envolvimento da obesidade na gênese de doenças como diabetes mellitus tipo II, resistência à insulina, problemas cardiovasculares e alguns tipos de câncer, sendo considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica (Lafontan e Berlan, 2003; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2008).

O WAT é um órgão amplamente distribuído pelo corpo humano, constituído por diversos tipos celulares, tais como adipócitos e pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos T. O tecido adiposo branco desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase energética devido à sua capacidade em promover o armazenamento de nutrientes na forma de triacilgliceróis, e proporcionar a disponibilidade de substratos energéticos (Vázquez-Vela *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2009; Galic *et al.*, 2010; Kalupahana *et al.*, 2012).

É importante destacar que a distribuição do WAT tem sido considerada um importante contribuinte para o desenvolvimento das desordens associadas à obesidade, sendo observada uma forte correlação entre acúmulo de lipídeos no tecido de adiposo visceral e o aumento da predisposição para diabetes tipo II e doenças cardiovasculares, indicando que alterações em diferentes regiões de tecido adiposo podem promover alterações metabólicas distintas (Lafontan e Berlan, 2003; Vázquez-Vela *et al.*, 2008; Maury e Brichard, 2010; Eckel *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2012). Em adição, a obesidade conduz a um aumento do tecido adiposo subcutâneo, além de um quadro inflamatório crônico, decorrente de alterações na população de macrófagos residentes do tecido adiposo (ATMs) (Figura 1.2) (McNelis e Olefsky, 2014).

Esta maior predisposição ao desenvolvimento de desordens metabólicas não está associada somente ao aumento do quadro inflamatório, mas apresenta relação direta com o desbalanço imune caracterizado pela abundância de citocinas pró-inflamatórias e a redução de citocinas anti-inflamatórias provenientes das alterações na polarização dos macrófagos residentes desta região (McNelis e Olefsky, 2014).

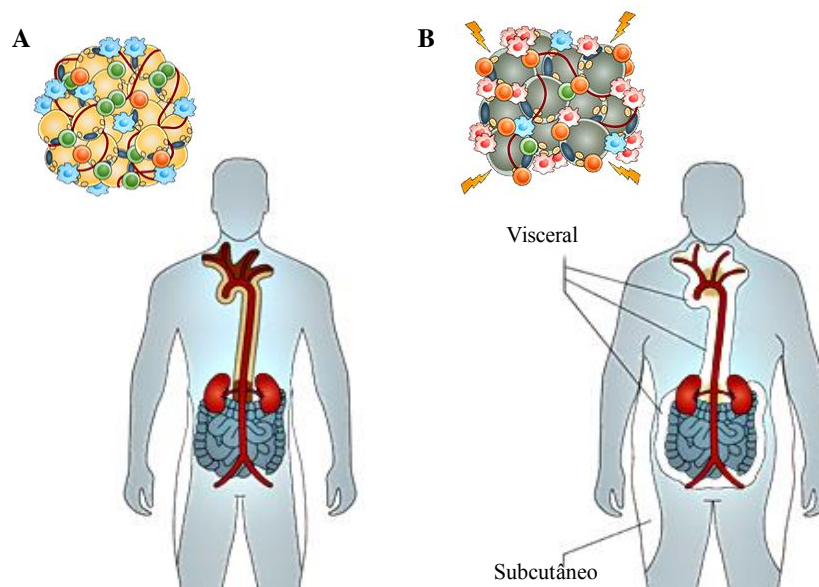


Figura 1.2. Distribuição de tecido adiposo branco subcutâneo e visceral no corpo humano e alterações no perfil de células do sistema imune em indivíduos obesos e saudáveis. **A** - Representação da expansão saudável do WAT, no qual o tecido encontra-se em um estágio anti-inflamatório, sendo adipócitos saudáveis representados por células amarelas e células NK representadas por células laranjas. Este tecido é caracterizado pela presença de macrófagos M2 (células azuis) e células T regulatórias -Treg (células verdes). **B** - Aumento e acúmulo de tecido adiposo branco subcutâneo e visceral em condições de obesidade, onde o tecido encontra-se em estágio de hipertrofia e estresse celular, sendo adipócitos não saudáveis representados por células cinzas. Este tecido é caracterizado pela presença de macrófagos M1 (células vermelhas) e aumento de células NK (células laranjas), acompanhado da redução na população de macrófagos M2 (células azuis). Figuras adaptadas de Kusminski *et al.*, 2016 e Giordano *et al.*, 2016.

O reconhecido papel do WAT como órgão endócrino pode ser atribuído à sua capacidade em secretar uma série de hormônios/citocinas, denominadas de adipocinas, que contribuem de modo importante para a maturação de adipócitos, comunicação do *status* nutricional e na regulação do metabolismo de diversos outros tipos celulares. A secreção de adipocinas pode ainda apresentar um perfil diferenciado de acordo com a região em que o tecido adiposo se encontra (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2009; Harwood Jr., 2012). Essas proteínas têm recebido grande atenção por participarem no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e resistência à insulina associada à obesidade, além de participarem ativamente da regulação das respostas imunes (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2009; Kalapuhana *et al.*, 2012). Dentre as adipocinas capazes de promover o elo entre o metabolismo e o sistema imune, destaca-se a leptina (Maury e Brichard, 2010).

1.1. Leptina

No ano de 1950, Ingalls e colaboradores relataram pela primeira vez a ocorrência de alterações gênicas recessivas em animais da linhagem C57BL/6 que conduziam a um quadro de elevação de cerca de 3 vezes do peso em relação aos camundongos normais da mesma linhagem, mantidos sob as mesmas condições alimentares e ambientais (Figura 1.3), o qual foi visto ser acompanhado de um quadro de infertilidade (Ingalls *et al.*, 1950). Dado o fenótipo de obesidade mórbida observado nos camundongos que apresentavam a mutação, foi empregado ao gene responsável por tal alteração o nome *obese* (*ob*) e ao camundongo cuja mutação é encontrada, *ob/ob* (Ingalls *et al.*, 1950). Essa descoberta foi um passo fundamental para o desenvolvimento de diversos novos estudos visando compreender os mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo e a patogênese da obesidade.

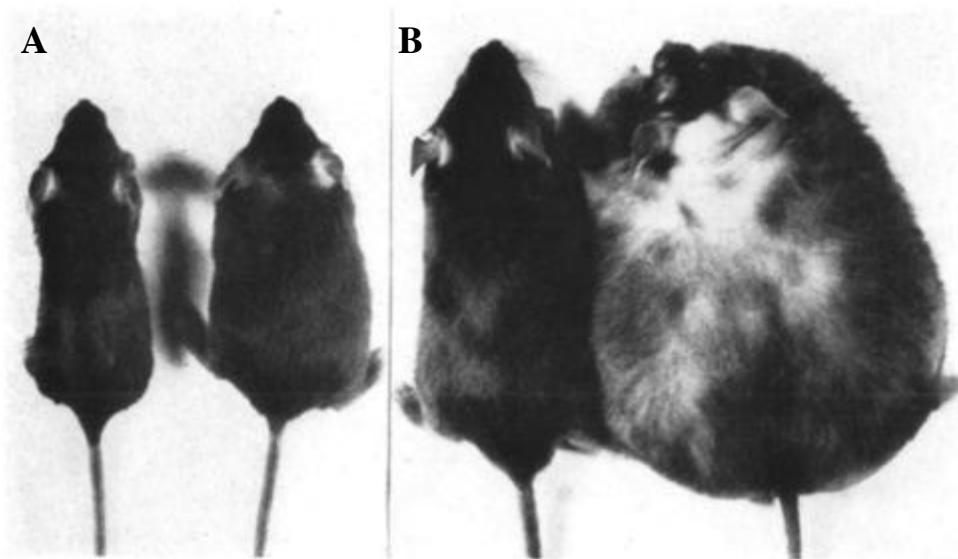


Figura 1.3. Camundongos normais e camundongos apresentando mutação no gene *ob* mantidos sobre as mesmas dietas e condições ambientais. **A** - Animal selvagem (esquerda) pesando 12 gramas e animal mutado (*ob/ob*) (direita) pesando 16 gramas, ambos com 21 dias de idade. **B** - Animal selvagem (esquerda) pesando 29 gramas e animal mutado (*ob/ob*) (direita) pesando 90 gramas, ambos com 10 meses de idade (Ingalls *et al.*, 1950).

Assim como a mutação do gene *ob*, o qual está localizado no cromossomo 6, outra mutação espontânea em um gene situado no cromossomo 4, denominado *diabetes* (*db*), revelou ser responsável pelo desencadeamento de uma síndrome similar à observada em camundongos *ob/ob*, caracterizada por hiperfagia, obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia (Coleman, 1973;

Halaas e Friedman, 1997). Essa distinta mutação genética associada à similaridade fenotípica despertou o interesse da comunidade científica para a necessidade de maiores estudos envolvendo animais *ob/ob* e *db/db*, sendo um marco importante os estudos de parabiose desenvolvidos por Coleman (1973), no qual uma conexão parcial do sistema circulatório de animais distintos foi promovida cirurgicamente (Tartaglia, 1997). Tais estudos forneceram grandes indícios de que um determinado fator pudesse estar ausente em animais *ob/ob* e que a incapacidade de resposta a este mesmo fator poderia ser responsável pela síndrome observada em animais *db/db* (Friedman e Halaas, 1998).

Em seus experimentos de parabiose, Coleman (1973) observou que a ligação de camundongos magros (+/+) com camundongos *db/db*, conduzia o animal magros (+/+) à severa perda de peso seguida de morte, não sendo observadas alterações no camundongo *db/db*. No entanto, a associação de camundongos *db/db* com camundongos *ob/ob* revelou uma acentuada perda de peso e hipoglicemia seguida de morte nos animais *ob/ob*, ao passo que a união fisiológica e anatômica entre *ob/ob* e camundongos magros (+/+) induziu o emagrecimento do camundongo *ob/ob* enquanto ligado ao camundongo magro, o qual não perdurava após esta ligação ser desfeita (Figura 1.4).

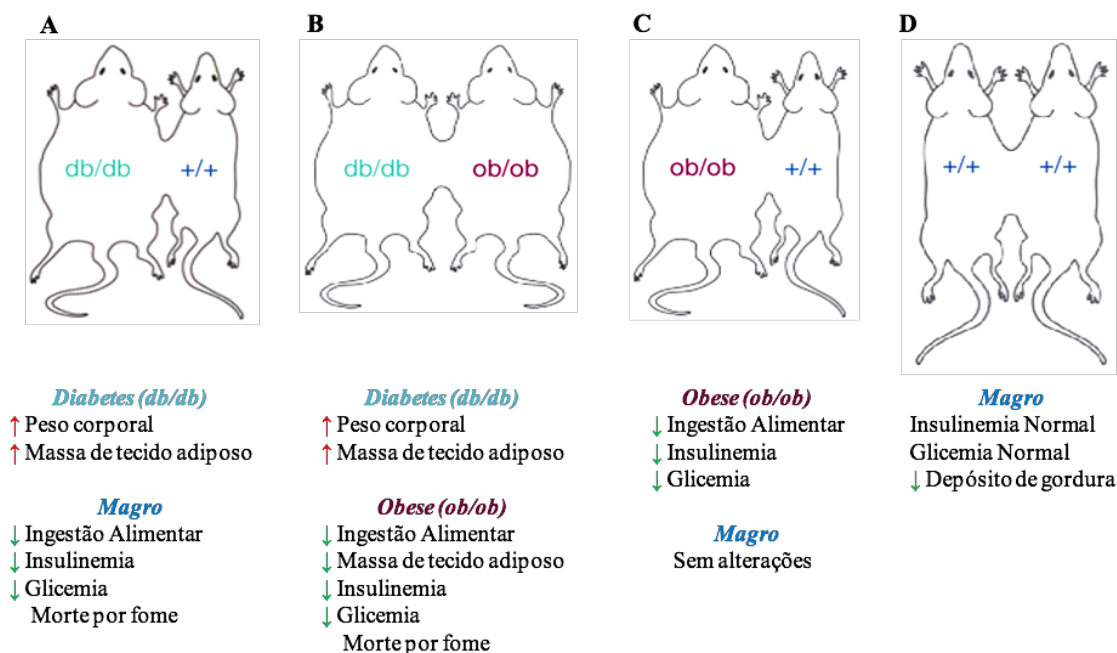


Figura 1.4. Modelo do experimento de parabiose desenvolvido por Coleman em 1973. São representadas quatro combinações parabióticas e os diferentes fenótipos observados em cada combinação realizada. **A** - Camundongos *db/db* ligados a camundongos magros (+/+); **B** - Camundongos *db/db* ligados a camundongos *ob/ob*; **C** - Camundongos *ob/ob* ligados a camundongos magros (+/+); **D**-Parabiose de dois camundongos magros (+/+). Figura adaptada de Coleman, 2010.

Alguns anos mais tarde, Bray e York (1979) mostraram que danos no hipotálamo induzem a geração de alterações no peso e ingestão alimentar levando a um quadro de obesidade. Estes estudos tiveram papel fundamental na geração de indícios de que o fator solúvel secretado como produto do gene *ob* pudesse atuar sobre o hipotálamo e desta forma exercer um mecanismo de sinalização para promover a sensação de saciedade (Zhang *et al.*, 1994; Campfield *et al.*, 1995; Maffei *et al.*, 1995a). Esses dados forneceram base para a hipótese de que camundongos *db/db* apresentam mutações no “sensor de saciedade”, sendo incapazes de responder ao fator circulante responsável por sinalizar a saciedade, enquanto que em camundongos *ob/ob* este fator está ausente, o que explica a observação de alterações metabólicas similares em ambos animais (Coleman, 1973; Bray e York, 1979; Zhang *et al.*, 1994). Desde então, diversos trabalhos foram conduzidos com intuito de identificar este fator, seu mecanismo de secreção e elucidar seu envolvimento no processo de regulação do metabolismo (Zhang *et al.*, 1994; Barinaga, 1995; Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995a; Maffei *et al.*, 1995a; Pelleymounter *et al.*, 1995).

No ano de 1994, Zhang e colaboradores clonaram o gene *ob* e reportaram a presença de um produto de 167 aminoácidos altamente conservado em humanos e camundongos, possivelmente secretado de maneira proporcional à massa de tecido adiposo, o qual foi visto estar ausente em camundongos *ob/ob* sugerindo que este poderia ser um dos fatores responsáveis por regular o peso corporal e o acúmulo de gordura (Figura 1.5) (Zhang *et al.*, 1994; Barinaga, 1995; Friedman e Halaas, 1998).

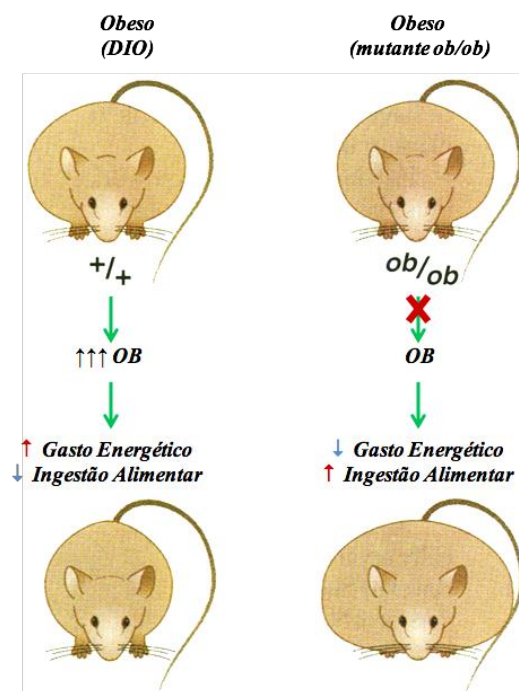


Figura 1.5. Níveis da proteína OB em camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO) e animais *ob/ob*. O aumento nos níveis da proteína refletem em maior gasto energético e saciedade, enquanto que sua ausência leva ao aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético conduzindo a um quadro de obesidade mórbida. Adaptado de Barinaga, 1995.

Corroborando os dados demonstrados por Zhang e colaboradores (1994), no ano de 1995, Halaas e colaboradores demonstraram que a proteína OB está presente no plasma de camundongos e humanos, estando ausente no plasma de animais *ob/ob* enquanto que animais *db/db* apresentam níveis plasmáticos elevados dessa proteína (Halaas *et al.*, 1995).

A clonagem do gene *ob* permitiu a obtenção da proteína recombinante proveniente da expressão deste gene, facilitando investigações sobre os efeitos de sua administração e contribuindo para o melhor entendimento de suas ações nos mais variados modelos experimentais (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995). Em experimentos realizados com a proteína OB recombinante, Campfield e colaboradores (1995) demonstraram sua capacidade em promover a redução da ingestão alimentar e redução do ganho de peso em animais *ob/ob* e animais do modelo de obesidade induzida por dieta (DIO), não sendo observado efeitos similares ao realizar a administração em camundongos *db/db*, reforçando as observações anteriormente descritas por Coleman (Campfield *et al.*, 1995).

Resultados similares foram apresentados por Pelleymounter e colaboradores (1995), nos quais a administração intraperitoneal da proteína recombinante nas concentrações de 0,1 a 10 mg/kg em animais da linhagem C57BL/6 demonstrou que camundongos *ob/ob* são mais sensíveis às ações da proteína, sendo observada uma redução acentuada do peso corporal, assim como a redução dos níveis de glicemia e insulina com o emprego de doses elevadas da proteína, enquanto que animais magros (+/+) não manifestam alterações de peso em resposta à administração da proteína, independente da dose utilizada (Pelleymounter *et al.*, 1995). Visto a necessidade do emprego de doses elevadas da proteína OB recombinante para que se pudesse verificar a esperada redução de quadro de obesidade, Cohen e colaboradores (1996) testaram a hipótese de que alterações estruturais fossem as responsáveis por esse efeito, entretanto não foram encontradas alterações que pudessem sustentar tal hipótese (Cohen *et al.*, 1996).

Juntos, estes dados sugerem que camundongos *db/db* podem ser resistentes à proteína OB uma vez que fenótipo similar ao de animais *ob/ob* é observado, e suportam a idéia de que o receptor da proteína OB seja produto da expressão do gene *db* (Zhang *et al.*, 1994; Halaas *et al.*, 1995). Além disso, verificou-se que além da homologia demonstrada por Zhang e colaboradores (1994), a administração de proteínas recombinantes de humanos e camundongos exercem efeitos similares sobre a regulação do peso, ingestão alimentar e acúmulo de lipídeos.

Visto esta capacidade da proteína OB em promover a redução do peso corporal foi proposto que esta proteína com peso molecular de 16 kDa recebesse o nome de *leptin*, derivada do grego *leptós*, que significa magro, o qual até hoje vem sendo empregado (Halaas *et al.*, 1995).

1.1.1. Estrutura

A substituição de glutamato (*Glu*) por triptofano (*Trp*) na posição 100 permitiu a obtenção de uma proteína biologicamente ativa com melhor solubilidade, denominada leptina-E100, a qual permitiu a determinação da estrutura cristalina da leptina, obtida por Zhang e colaboradores (1997).

Os dados de cristalografia indicam que a leptina é uma proteína não glicosilada, encontrada como monômero, constituída de quatro α -hélices antiparalelas, conectadas por duas longas ligações cruzadas e um *loop* curto, com feixe helicoidal torcido do lado esquerdo (Figura 1.6A), apresentando alta similaridade estrutural com outras citocinas como IL-6 (Figura 1.6B),

IL-12, fator inibitório de leucemia (LIF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (Figura 1.6C), dentre outros (Zhang *et al.*, 1997; La Cava e Matarese, 2004).

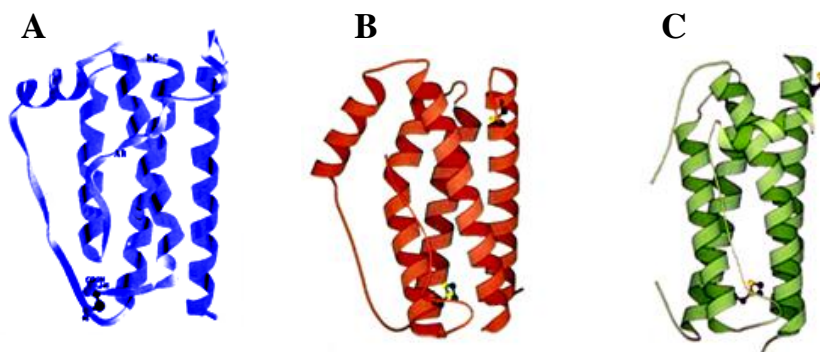


Figura 1.6. Homologia entre a estrutura cristalográfica de citocinas. **A** - Leptina, **B** - Interleucina-6 (IL-6), **C** - Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Todas apresentam as quatro α -hélices, o carbono terminal da extensão helicoidal, o segmento helicoidal curto e os loops conectores. Adaptado de Zhang *et al.*, 1997; Somers *et al.*, 1997.

A obtenção da estrutura cristalográfica de leptina permitiu a identificação de sua similaridade estrutural a diversas citocinas e sua caracterização como um membro da superfamília de citocinas, atuando como um elo importante entre as respostas imunes e o sistema neuroendócrino (Friedman, 1998; La Cava e Matarese, 2004; Bernotiene *et al.*, 2006).

1.2.Receptores de Leptina

A descrição do receptor de leptina, denominado Ob-R, ocorreu em 1995 por Tartaglia e colaboradores, após clonagem e identificação de um receptor de classe I pertencente à superfamília gp130 de receptores de citocinas. Estes receptores estão amplamente distribuídos pelos mais variados órgãos e sistemas, sendo responsáveis pelas ações centrais e periféricas desempenhadas pela leptina, visto a alta afinidade desta adipocina por receptores Ob-R (Tartaglia *et al.*, 1995; Frühbeck e Salvador, 2000; Li *et al.*, 2013; Folch *et al.*, 2015).

Até o momento são descritos na literatura 6 isoformas do receptor Ob-R, codificadas pelo gene *lepr* em humanos, correspondente aos genes *db* em camundongos ou *fa* em ratos, situado no cromossomo 4. Estas isoformas são discriminadas pelas letras de a-f (Figura 1.7) (Paracchini, *et al.*, 2005; Peelman *et al.*, 2014). As isoformas do receptor de leptina são classificadas em

isoformas curtas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf), isoforma longa (Ob-Rb) e isoforma secretada (Ob-Re). De um modo geral, os receptores Ob-R apresentam um domínio extracelular invariável, com cerca de 816 aminoácidos e um domínio intracelular variante, com exceção ao Ob-Re que não apresenta porção transmembranar e intracelular, atuando como uma forma solúvel do receptor (Lee *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997; Ahima e Osei, 2004).

Todos os receptores Ob-R, que possuem um domínio intracelular apresentam uma região conservada (box 1), constituído de 6 a 17 aminoácidos que possui um papel chave para a ligação e ativação de JAK2. Um outro domínio intracelular, denominado Box 2, constituído de 49 a 60 aminoácidos está presente em algumas isoformas e é requerido para uma maior interação e máxima ativação de JAK2 (Ahima e Osei, 2004; Ceddia, 2005). Dentre todas estas isoformas, a isoforma longa do receptor, denominada Ob-Rb, é a mais bem caracterizada, apresentando três tirosinas conservadas em seu domínio citoplasmático, correspondendo às posições Y985, Y1077 e Y1138, que atuam como sítios de ligação de moléculas intracelulares favorecendo a ativação de diferentes vias de sinalização (Ahima e Osei, 2004; Ceddia, 2005; Paz-filho *et al.*, 2012).

Ob-Rb é a única isoforma que contém uma região citoplasmática alongada contendo sequências requeridas para a transdução de sinal, sendo proposta como a única capaz de promover a ativação da via de sinalização celular JAK-STAT (Schaab e Kratzsch, 2015), estando amplamente distribuída pelos mais variados tipos celulares, tais como macrófagos, células β -pancreáticas, células endoteliais, entre outros (La Cava e Matarese, 2004; Zhang *et al.*, 2005), sendo majoritariamente encontrada no hipotálamo (Lee *et al.*, 1996), em zonas de controle do apetite e peso corporal (La Cava e Matarese, 2004; Li *et al.*, 2013).

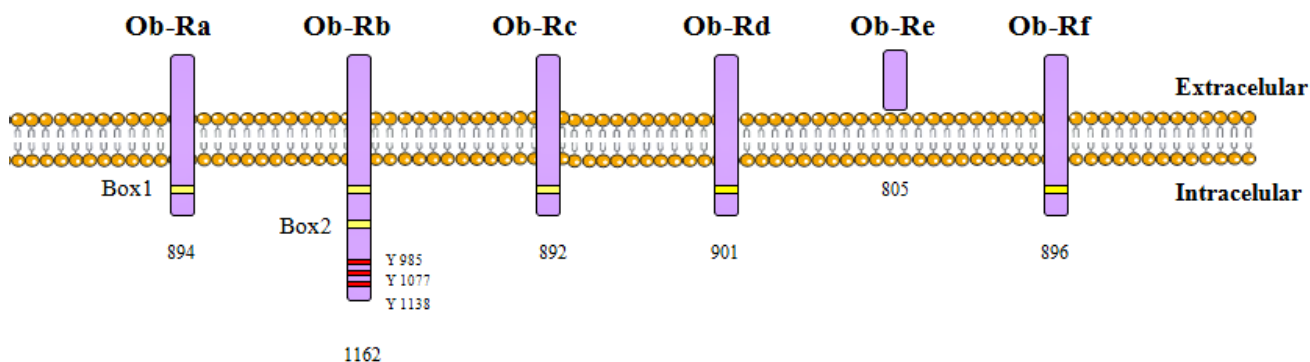


Figura 1.7. Representação esquemática das seis isoformas do receptor de leptina (Ob-Ra - Ob-Rf), mostrando o peso molecular abaixo das respectivas isoformas, o domínio extracelular comum e região intracelular variante ou ausente (Ob-Re). A isoforma longa ObRb apresentando as sequências box1 e box2, necessária para ativação da via JAK-STAT, além de três tirosinas conservadas na região intracelular do receptor representadas pela letra Y seguidas das posições que estas se encontram.

A ampla distinção entre as múltiplas isoformas do receptor de leptina, são geradas em decorrência de *splicing* alternativo, resultando em domínios intracelulares com diferentes sequências e comprimentos (Figura 1.8) (Lam e Lu, 2007; Paz-Filho *et al.*, 2012; Dam e Jockers, 2013; Thon *et al.*, 2016), apresentando entre 34 aminoácidos (isoforma curta) a 303 aminoácidos em sua isoforma longa (Tartaglia, 1997).

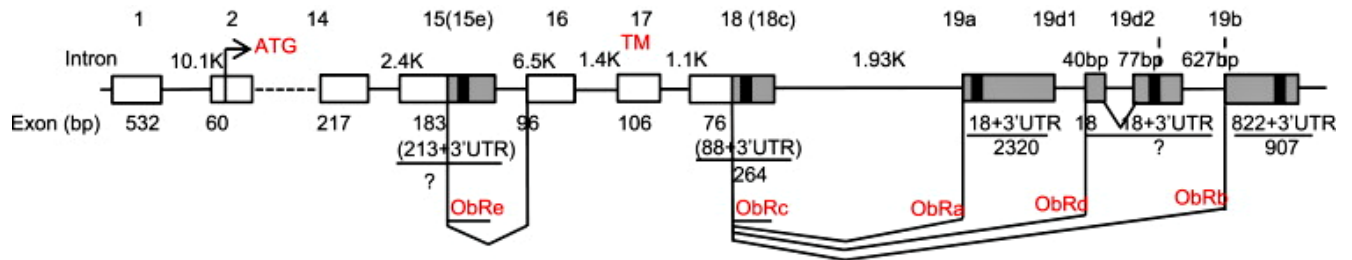


Figura 1.8. Diagrama ilustrando o *locus* genômico do receptor de leptina e 5 possibilidades de *splicing* alternativo para formação de diferentes isoformas do receptor. Os éxons são representados pelas caixas, tendo seus respectivos tamanhos apresentados abaixo em pb. O tamanho dos íntrons (linha horizontal) está apresentados Kb, acima de cada íntron (Li *et al.*, 2013).

Embora as isoformas curtas do receptor sejam expressas por diversas células e apresentem grande envolvimento no transporte e degradação da leptina, poucos estudos discutem seu papel isoladamente, tanto a nível central quanto periférico (La Cava e Matarese, 2004). Dados da literatura revelam que dentre as diferentes isoformas do receptor Ob-R, em grande parte dos tecidos a maior expressão de receptores de leptina pode ser atribuída à isoforma Ob-Ra. Contudo, poucos trabalhos levantam questionamentos sobre sua participação na regulação das atividades desempenhadas pela leptina (Li *et al.*, 2013).

Estudos sugerem uma possível participação de isoformas curtas do receptor de leptina na oxidação lipídica mediada pela ativação da via de sinalização p38 MAPK, o que é suportado pelos efeitos observados sobre a administração de leptina em camundongos *db/db* (Akasaka *et al.*, 2010; Schaab e Kratzsch, 2015).

Além disso, o emprego do silenciamento específico da isoforma Ob-Ra revelou que embora sutil, animais deficientes deste receptor apresentam alteração no peso corporal, atribuindo-se a esta isoforma um papel no transporte de leptina para o SNC, uma vez que seu curto domínio intracelular impossibilita a ativação da via de sinalização celular JAK2-STAT3 (Li

et al., 2013). Este mesmo estudo revelou que a depleção do seletiva do éxon Ob-Ra leva a um efeito compensatório em sítios onde há elevada expressão desta isoforma, induzindo uma elevação nos níveis de Ob-Rc sugerindo um possível papel redundante para ambas isoformas (Li *et al.*, 2013; Dan e Jockers, 2013).

A ausência de um domínio transmembranar na isoforma Ob-Re, permitiu que esta fosse sugerida como uma forma solúvel do receptor de leptina (Li *et al.*, 1998), responsável pelo transporte da proteína circulante (Lammert *et al.*, 2001), sendo a principal proteína associada à leptina no sangue humano, exercendo grande influência sobre sua biodisponibilidade (Schaab e Kratzsch, 2015). O receptor Ob-Re desempenha papel crucial no que se refere a associação de leptina à receptores Ob-Rb hipotalâmicos (Ahima, 2008), estando presente no hipotálamo, tecido adiposo, testículos e coração (Lee *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997; La Cava e Matarese, 2004), encontrando-se reduzida em condições de obesidade o que é decorrente do aumento nos níveis de leptina livre (Lam e Lu, 2007).

Estudos realizados por Wang e colaboradores (1996) revelaram a existência de uma sexta isoforma do receptor de leptina em ratos, denominada Ob-Rf que, ao contrário do observado para os receptores Ob-Ra e Ob-Rb, apresenta níveis elevados no baço em relação aos demais tecidos, sendo também encontrada no timo, porém em menores quantidades. Essas diferenças no padrão de expressão sugerem uma possível função diferenciada para essa isoforma (Wang *et al.*, 1996). Além disso, têm sido proposto papel similar ao desempenhado pelo receptor Ob-Ra para as isoformas Ob-Rf e Ob-Rd, as quais poderiam ainda participar de algum modo no controle do clearance renal da leptina (Zabeau *et al.*, 2015).

Assim como a leptina, proteína sintetizada como produto do gene *ob*, os receptores Ob-R apresentam alta homologia entre humanos e roedores, sendo observada cerca de 78% de similaridade entre a sequência de aminoácidos que constituem os domínios extracelulares e 71% para os domínios intracelulares da forma longa do receptor (Tartaglia *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997). A expressão desses receptores é detectada em um grande número de tecidos como músculo esquelético, glândulas supra-renais, rins, células imunes, fígado e células beta pancreáticas, sugerindo que a leptina possa exercer em amplo espectro uma forte influencia sobre funções periféricas (Zhang *et al.*, 2005).

1.3.Vias de Sinalização

Diversos trabalhos têm demonstrado que assim como muitas outras citocinas, uma das principais formas de atuação da leptina ocorre por meio da ativação da via JAK2-STAT3, a qual tem sido apontada como uma das responsáveis por regular grande parte de suas ações no que diz respeito ao controle do gasto energético e saciedade (Frühbeck e Salvador, 2000; Bernotiene *et al.*, 2006; Ahima, 2008; Li, 2011; Folch *et al.*, 2015).

Quando associada à isoforma longa de seu receptor (Ob-Rb), a leptina promove a dimerização e alteração conformacional do mesmo, esta alteração induz a atividade catalítica da proteína tirosina quinase Janus kinase 2 (JAK2), resultando na fosforilação de três resíduos de tirosina situados no receptor Ob-Rb que irão promover a ativação de proteínas sinalizadoras distintas (Morton e Schwartz, 2011; Sahu, 2011; Scotece e Mobasher, 2015).

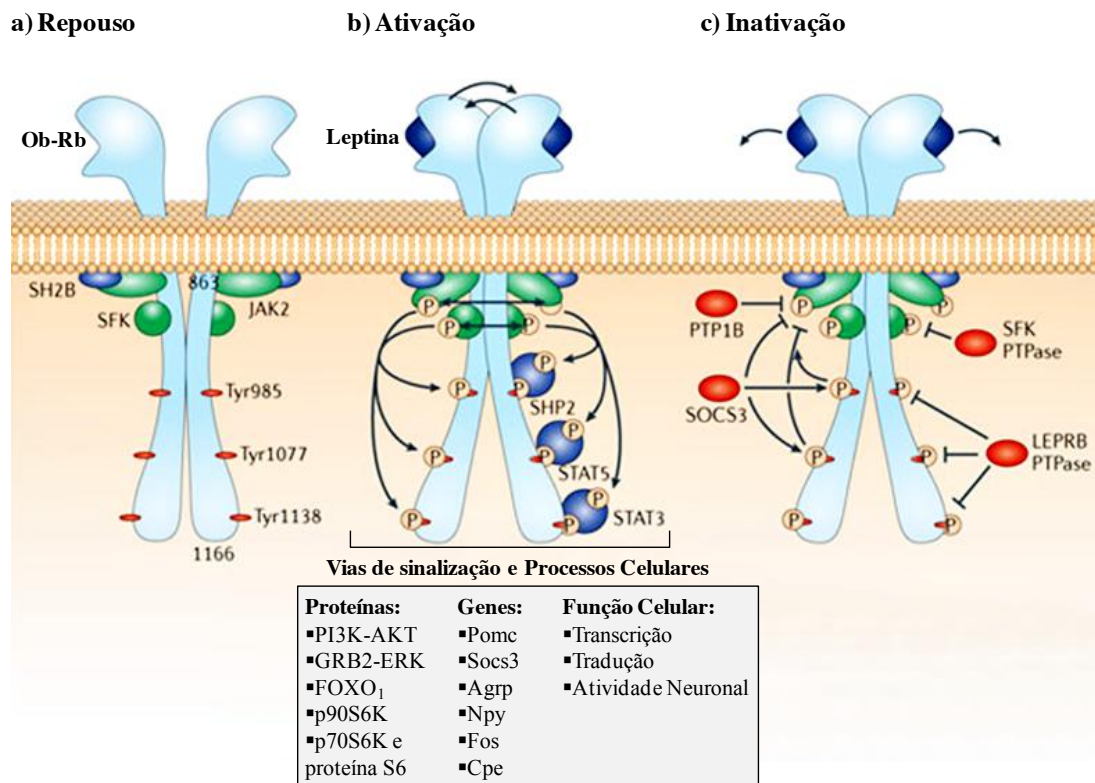


Figura 1.9. Isoforma longa do receptor de leptina em seu estado livre (sem a ligação de leptina), sua forma ativa e sua forma inativada. **A** - Receptor em seu estado de repouso, na forma de homodímero, as proteínas SFK e tirosina quinase Janus kinase 2 (JAK2) encontram-se associadas ao receptor próximo a membrana citoplasmática. **B** - Dimerização e alteração conformacional do receptor em resposta à ligação da leptina, promovendo a fosforilação e ativação de JAK2 e SFK responsáveis por fosforilar resíduos de tirosina situados no receptor, que irão promover a ativação de vias, proteínas sinalizadoras e processos celulares distintos. **C** - Receptor inativado pela atuação das proteínas fosfotirosina fosfatase 1B (PTP1B), através da desfosforilação de JAK2, ou pelo supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), atuando da mesma forma que PTP1B, inibindo a atividade JAK2, ou diretamente sobre as tirosinas do receptor (Coppari e Bjørbæk, 2012).

A fosforilação de Tyr₁₁₃₈ promove a ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), o qual após ser fosforilado pela JAK2 se dimeriza e é então translocado para o núcleo celular, onde irá induzir a expressão de peptídeos anorexigênicos como a proopiomelanocortina (POMC), e a supressão de peptídeos orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína agouti (AgRP), além de regular a expressão do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), o qual é responsável por inibir a sinalização de STAT3, e, portanto, interromper as ações induzidas por leptina (Schwartz *et al.*, 2000; Bernotiene *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2006; Ahima, 2008; Morton e Schwartz, 2011; Sahu, 2011; Crujeiras *et al.*, 2015; Folch *et al.*, 2015).

Outras vias de sinalização independentes de STAT3 são reguladas pela ação da leptina em diferentes tipos celulares (Bernotiene *et al.*, 2006; Maya-Monteiro e Bozza, 2008; Maya-Monteiro *et al.*, 2008; Sahu, 2011; Naylor e Petri Jr., 2016). Trabalhos de diferentes grupos têm reportado a indução de vias como ERK, PI3K/Akt/mTOR, p38 MAPK e AMPK/SIRT1 em resposta à ligação de leptina a receptores Ob-Rb (Minokoshi *et al.*, 2002; La Cava e Matarese, 2004; Bernotiene *et al.*, 2006; Maya-Monteiro *et al.*, 2008; Folch *et al.*, 2015). Dados da literatura relatam que a ativação de JAK2 é capaz de promover a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) o qual induz a ativação de PI3K e consequentemente de Akt, promovendo desta forma a modulação dos níveis de peptídeos anorexigênicos/orexigênicos (Amitani *et al.*, 2013). Também são observados mecanismos independentes de STAT3 no que se refere ao controle da ativação de JAK2 e término da sinalização de leptina, na qual a fosfotirosina fosfatase 1B (PTP1B), uma proteína presente na superfície do retículo endoplasmático, é responsável por promover a desfosforilação de JAK após a internalização do receptor Ob-Rb (Zabolotny *et al.*, 2002; La Cava e Matarese, 2004, Matarese *et al.*, 2010a).

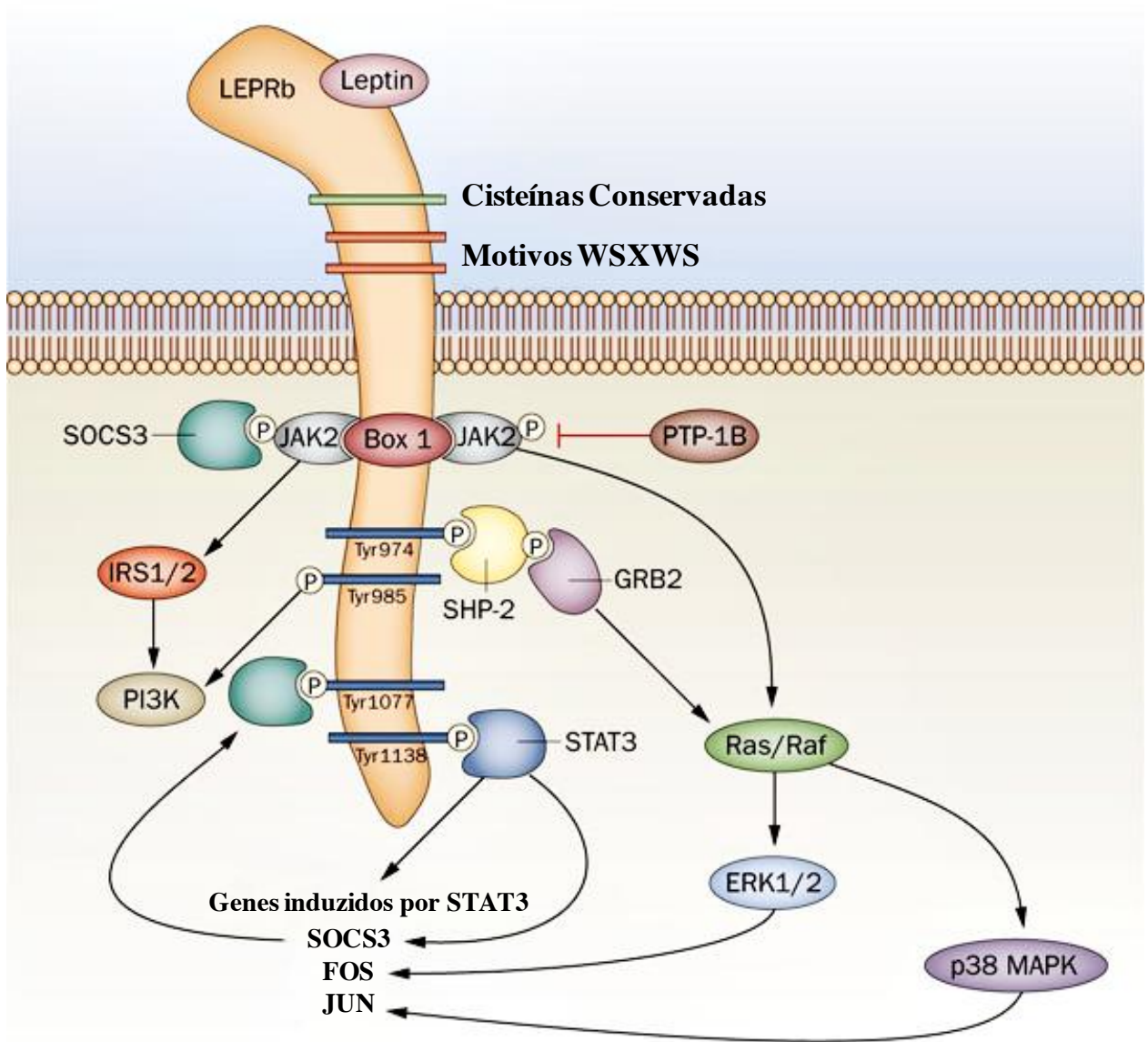


Figura 1.10. Vias de sinalização ativadas pela ligação de leptina à receptores Ob-Rb. Após a associação de leptina ao seu receptor JAK2 se torna ativa por um mecanismo de autofosforilação e promove a fosforilação de resíduos de tirosina presentes no domínio intracelular do receptor Ob-Rb. Estes resíduos de tirosina fosforilados atuam como adaptadores para a ligação de STATs, dentre estes a STAT3, a qual se dimeriza e transloca para o núcleo, onde induz a expressão de diversos genes, dentre eles o gene de SOCS3. A ligação de SOCS3 a JAK2 promove a inibição da sinalização desencadeada por leptina. SHP-2 é recrutado para Tyr₉₈₅ e Tyr₉₇₄ promovendo a ativação de ERK1/2 e p38 MAPK, culminando na expressão de FOS e JUN. A proteína PTP-1B promove a desfosforilação de JAK2 após internalização do complexo Ob-Rb. JAK2 também pode induzir a ativação de PI3K através da fosforilação de IRS1 e 2 (Matarese *et al.*, 2010a).

1.4. Leptina e Sistema neuroendócrino

De acordo com Maffei e colaboradores (1995b), os níveis circulantes de leptina em camundongos *wild-type* sob condições normais são de aproximadamente 12,5 ng/mL, sendo alterados proporcionalmente à massa adiposa, justificando seus elevados níveis encontrados em animais DIO. Estudos demonstraram que embora seja observado aumento nos níveis de leptina plasmática nesses animais, estes ainda possuem a capacidade de responder à administração da proteína recombinante (Campfield *et al.*, 1995).

Atualmente é sabido que, ao contrário do que se acreditava, em humanos o desenvolvimento de obesidade tem origem multifatorial, não sendo reportados casos onde a obesidade seja decorrente de defeitos na expressão do gene *ob* (Tartaglia, 1997). Embora a descoberta da leptina tenha surgido como uma promessa de um novo fármaco anti-obesidade (Ahima, 2008), diversos estudos demonstraram a presença de hiperleptinemia em indivíduos obesos, os quais são positivamente correlacionados com IMC e massa tecidual adiposa (Figura 1.11), sendo encontrados níveis séricos que variam de 31,3 a 55,4 ng/mL em indivíduos obesos, os quais são muito superiores aos níveis encontrados em indivíduos não obesos, os quais variam entre 7,5 a 16,8 ng/mL (Considine *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1996; Cammisotto e Bukowiecki, 2002; Rosen e Spiegelman, 2014).

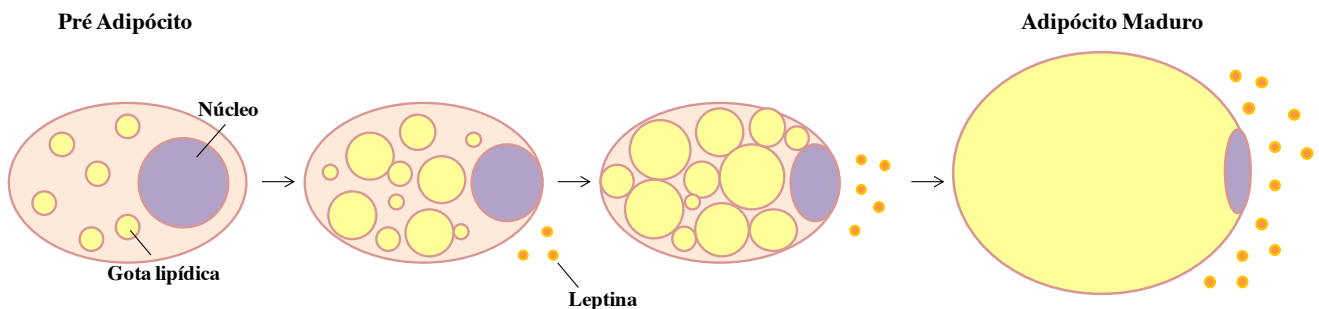


Figura 1.11. Representação esquemática do processo de adipogênese mostrando o aumento da secreção de leptina de modo proporcional à maturação do adipócito.

Além disso, níveis distintos de leptina plasmática são encontrados entre homens e mulheres com mesmo IMC, não sendo, no entanto, observadas diferenças nos níveis de leptina

quando correlacionados com percentual de massa adiposa de ambos os sexos (Maffei *et al.*, 1995b).

É bem descrito o fato de que a leptina é secretada como produto do gene *ob* por diversos tecidos, como estômago, placenta e músculo esquelético em baixas quantidades, sendo majoritariamente secretada por adipócitos diferenciados do tecido adiposo branco (Friedman e Halaas, 1998; Sobhani *et al.*, 2000; Faggioni *et al.*, 2001; Antuna-Puente *et al.*, 2008). Diferenças na sua expressão são também observadas entre sítios distintos de tecido adiposo (Margetic *et al.*, 2002), sendo estimado que cerca de 80% da produção total de leptina em humanos seja proveniente do depósito subcutâneo (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Maury e Brichard, 2010).

Além da expansão do WAT, outros fatores como os níveis de hormônios sexuais, desnutrição, temperatura, glicocorticóides e algumas condições inflamatórias, podem contribuir para que ocorram alterações nos níveis plasmáticos de leptina (Margetic *et al.*, 2002). Diversos trabalhos demonstram uma correlação positiva entre o *status* nutricional e os níveis séricos desta adipocina, reforçando sua fundamental participação na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético, o qual tem sido proposto ocorrer por meio de um mecanismo de *feedback* negativo através de sua ligação a receptores hipotalâmicos específicos (Figura 1.12), denominados Ob-R ou Lepr (Ahima *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997; La Cava e Matarese, 2004; Maya-Monteiro e Bozza, 2008; Friedman, 2010; Maury e Brichard, 2010).

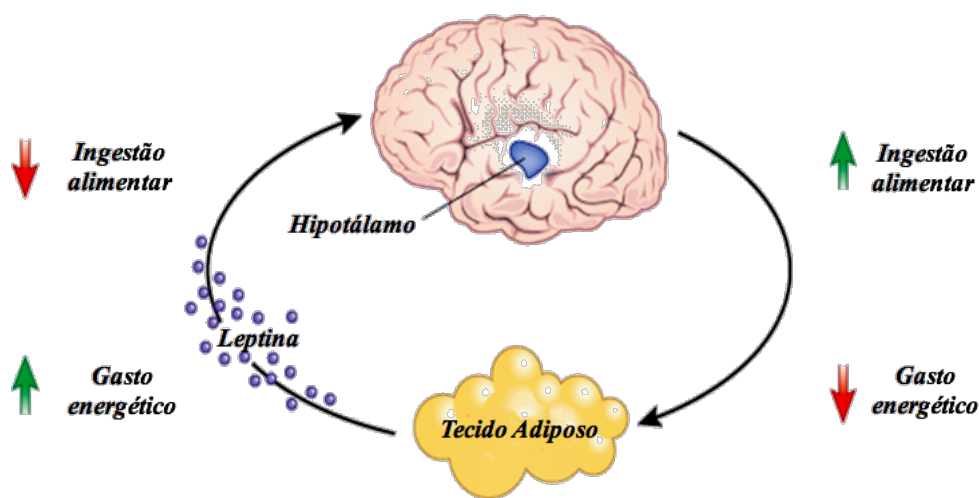


Figura 1.12. Correlação entre leptina e regulação do balanço energético. A leptina induz um mecanismo de *feedback* negativo através de sua ligação e sinalização a receptores hipotalâmicos e cerebrais, promovendo a regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. Esse sistema mantém a homeostase do tecido adiposo, visto que a concentração plasmática de leptina é inversamente proporcional ao estímulo do apetite. Adaptado de Friedman, 2010.

Conforme descrito anteriormente, grande parte dos indivíduos obesos apresentam altos níveis de leptina circulantes. Além disso, estudos demonstram que na maioria das vezes indivíduos obesos não respondem efetivamente à administração de leptina exógena, indicando uma possível resistência dos receptores, o que, portanto, diminuiu a possibilidade de seu emprego como um fármaco anti-obesidade (Hukshorn *et al.*, 2002; Coppari e Bjørbæk, 2012). No entanto, a terapia com leptina pode ser efetiva nos casos em que a obesidade é caracterizada por hipoleptinemia ou ainda ser empregada como um adjuvante no tratamento da obesidade induzida por dieta (Zhang *et al.*, 2005), fazendo-se necessária uma compreensão mais profunda para terapêutica dessa adipocina no que se refere a manutenção do peso corporal assim como no tratamento de outras síndromes metabólicas como as lipodistrofias (Coppari e Bjørbæk, 2012).

Lipodistrofias correspondem a um grupo de desordens raras originadas por causas distintas, caracterizadas pela distribuição inadequada de tecido adiposo (Garg, 2000; Savage e O’Rahilly, 2002; Hussain e Garg, 2016), acompanhada da diminuição nos níveis de leptina e outras adipocinas (Haque *et al.*, 2002; Garg e Agarwal, 2009), que podem conduzir ao desenvolvimento de complicações metabólicas como resistência à insulina, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia e esteatose hepática (Zhang *et al.*, 2005; Hussain e Garg, 2016).

Dados na literatura revelaram que a administração subcutânea crônica de leptina humana recombinante, metreleptin, em pacientes com lipodistrofia severa promove melhora significativa no quadro de resistência à insulina, hipertrigliceridemia e esteatose hepática, ampliando a perspectiva sobre o uso (Oral *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2002; Coppari e Bjørbæk, 2012; Rodriguez *et al.*, 2015). Esses dados demonstram os benefícios clínicos e ampliam a perspectiva sobre o uso da leptina, além de promover a possibilidade de sua utilização em situações clínicas adicionais, sendo necessário o estabelecimento de melhores formas e intervalos de administração para o tratamento de distúrbios relacionados (Chan *et al.*, 2011).

1.5. Leptina e Sistema Imune

Embora exista certa divergência sobre as condições inflamatórias em que os níveis leptina possam estar alterados, trabalhos relatam sua atuação como uma citocina pró-inflamatória, passível de ter sua secreção induzida por outros mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6, os quais também estão passíveis de ter sua secreção modulada positivamente pela ação

desta adipocina, gerando desta forma um mecanismo inflamatório crônico (Figura 1.13) (Faggioni *et al.*, 1998; Lord, 2002; La Cava e Matarese, 2004; Paz-Filho *et al.*, 2012).

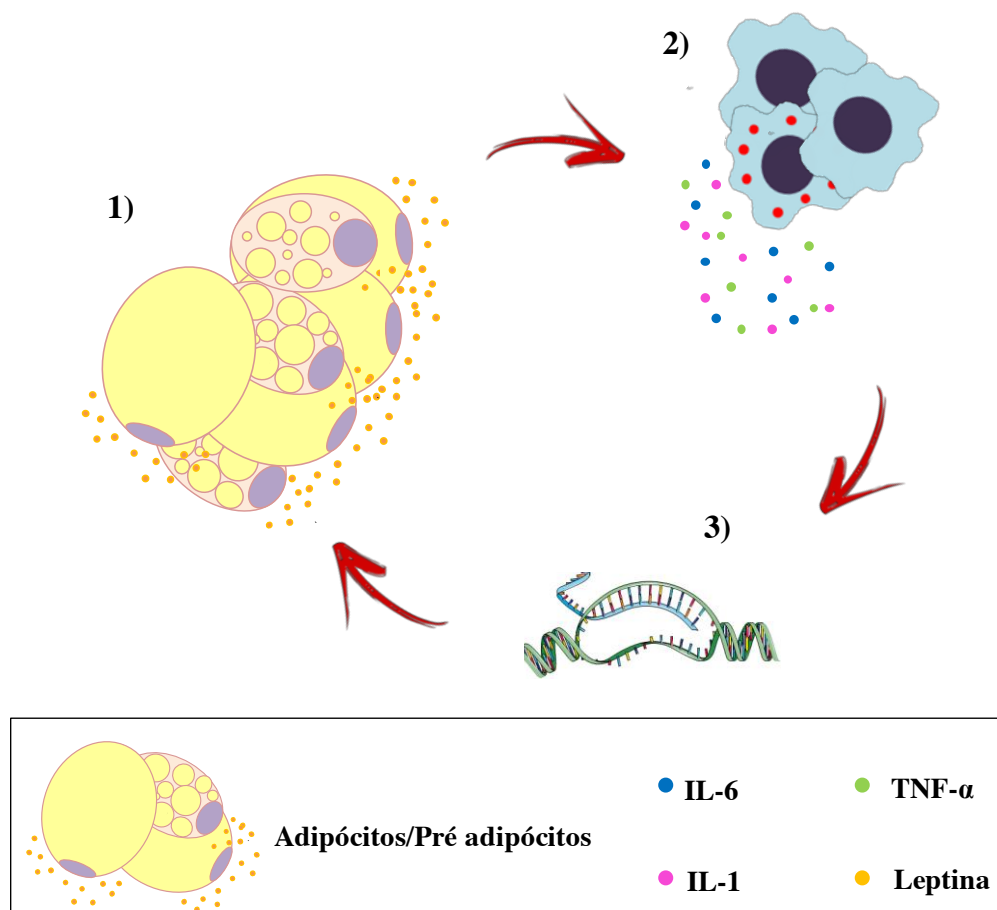


Figura 1.13. Leptina e mediadores inflamatórios interagindo de forma co-dependente. 1) Aumento da secreção de leptina pelo tecido adiposo. 2) A ação da leptina leva a ativação de células imunes e secreção de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- α . 3) As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α secretadas modulam a expressão de mRNA de leptina, sustentando um estado inflamatório crônico.

As ações da leptina sobre o sistema imune se estendem tanto as respostas inatas quanto à imunidade adaptativa. Sua participação nas respostas imuno inflamatórias tornam-se ainda mais evidentes uma vez que dados na literatura demonstram que animais deficientes dessa adipocina possuem a ativação de linfócitos T, bem como a apresentação de antígenos e a ativação de fagócitos contra patógenos prejudicadas (Kanneganti e Dixit, 2012), além de estarem mais susceptíveis à mortalidade induzida por LPS e TNF (Faggioni *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Busso *et al.*, 2002). Alguns efeitos da leptina sobre a imunidade inata e adaptativa são apresentados resumidamente na tabela 1.1 e figura 1.14.

Tabela 1.1. Ações da leptina sobre a resposta imune inata e imunidade adquirida.

IMUNIDADE INATA		IMUNIDADE ADAPTATIVA	
POPULAÇÃO CELULAR	EFEITO	POPULAÇÃO CELULAR	EFEITO
<i>Monócitos/Macrófagos</i>	↑ Fagocitose ↑ Proliferação ↑ IL-1, IL-6, TNF	<i>Timócitos</i>	↑ Maturação ↓ Apoptose
<i>Monócitos</i>	↑ Expressão de marcadores de ativação ↑ Expressão de marcadores de superfície	<i>Células T naive</i>	↑ Proliferação ↓ Apoptose
<i>Macrófagos</i>	↑ Eicosanóides, LTB ₄ , NO, CTA1, COX-2	<i>Células T de Memória</i>	↓ Proliferação
<i>Neutrófilos</i>	↑ Formação e liberação de ROS ↑ Quimiotaxia ↓ Apoptose ↑ Expressão de CD11b	<i>Ativação celular Th1</i>	↑ IgG2a switch ↑ TNF- α , ↑ INF- γ
<i>Eosinófilos</i>	↑ Moléculas de adesão ↑ Quimiocinese ↑ Liberação de IL-1 β , IL-6, IL-8	<i>Inibição celular Th2</i>	↓ IgG1 switch
<i>Células dendríticas</i>	↑ Liberação de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ↑ Maturação ↓ Apoptose	<i>Células Treg</i>	↑ Anergia ↑ Hiporesponsividade
<i>Linfócitos NK</i>	↑ Proliferação, maturação ↑ Diferenciação, ativação, ↑ Citotoxicidade	<i>Células B</i>	↓ Apoptose ↑ Proliferação

Fonte: Adaptado de Paz-Filho *et al.*, 2012.

A atuação da leptina na imunidade inata pode ser vista por sua capacidade em ativar monócitos/macrófagos e neutrófilos, assim como induzir a secreção de leucotrieno B₄ (LTB₄), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico (NO) e algumas citocinas pró-inflamatórias, que podem estar associadas ao papel quimiotático desempenhado pela leptina (La Cava e Matarese, 2004; Lam e Lu, 2007). Um papel controverso em relação a sua atuação sobre a ativação de células NK tem sido discutido por alguns autores, sendo demonstrada sua capacidade em influenciar na ativação, maturação e citotoxicidade destas células, as quais encontram-se com a função prejudicada em animais *db/db* (La Cava e Matarese, 2004; Matarese *et al.*, 2005; Lam e Lu, 2007; Fernandez-Riejos *et al.*, 2010). De forma diferente, outros trabalhos sugerem que a longo prazo os níveis elevados de leptina sejam capazes de promover a inibição da ativação destas células (Naylor e Petri Jr., 2016).

Dados na literatura têm demonstrado um importante papel desempenhado pela leptina sobre a quimiotaxia de eosinófilos, o que pode ser sustentado pela presença de isoformas longas e

curtas do receptor de leptina nestas células, sendo ainda demonstrado a capacidade da adipocina em promover efeitos diretos ou indiretos sobre a migração e ativação destas células (Wong *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2011). É importante destacar que embora a leptina possa atuar como um fator de sobrevivência de eosinófilos no sítio inflamatório, efeitos similares não são observados sobre estas células na circulação sanguínea (Conus *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* revelaram que a migração de eosinófilos induzida por leptina ocorre de modo concentração dependente, em resposta à fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e PI3K, além de ter uma participação importante na inibição de eventos pró-apoptóticos para mitocôndria, resultando no impedimento da liberação de citocromo *c* para o citoplasma, e portanto, diminuindo a apoptose espontânea destas células (Conus *et al.*, 2005; Schratl *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2012).

Em algumas condições patológicas de origem inflamatória, como asma e síndromes dermatológicas, a presença marcante de eosinófilos e o aumento nos níveis circulantes de leptina são constantemente observados, podendo este aumento nos níveis da adipocina ser um dos fatores envolvidos na elevação desta população de células (Conus *et al.*, 2005). Também têm sido reportada a capacidade da leptina em contribuir para a atuação de moléculas quimioatraentes para eosinófilos, sendo observada uma maior indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 e algumas quimiocinas como a CCL11/eotaxina em resposta ao estímulo com leptina. Esta atuação como um potencial ativador de eosinófilos pode estar diretamente envolvida em diversas doenças alérgicas, sobretudo em indivíduos obesos, os quais geralmente apresentam melhora após redução do peso corporal, condição onde uma redução nos níveis de leptina é observada, justificando o fato desses indivíduos estarem mais propensos ao desenvolvimento de doenças inflamatórias de cunho alérgico (Wong *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2012; Davoine e Lacy, 2014).

A importante participação da leptina sobre a migração e ativação de neutrófilos foi reportada por Souza-Almeida e colaboradores (2017), sendo observado que este efeito parece não ocorrer através de uma resposta direta à leptina, uma vez que neutrófilos não apresentam a isoforma longa do receptor Ob-R. Sendo reportado tratar-se de uma ação desencadeada pela secreção de TNF e CXCL1/KC por macrófagos ativados pela adipocina. Esses achados sustentam a importância da necessidade de uma sinalização eficiente desencadeada pela leptina em respostas inflamatórias de origem infecciosa (Souza-Almeida *et al.*, 2017 – dados não publicados).

Na imunidade adaptativa, a leptina têm sido demonstrada capaz de promover efeito anti-apoptótico sobre células T, devido sua capacidade em aumentar a expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-X_L (Fujita *et al.*, 2002). Outros estudos revelam sua capacidade em induzir a ativação e proliferação de células T efectoras murinas com perfil Th1, através do estímulo da síntese de IL-2, IL-12 e IFN- γ , além da inibição da produção de citocinas Th2 como IL-10 e IL-4 (Lord *et al.*, 1998; Fernandez-Riejos *et al.*, 2010; Uner e Sulu, 2012; Saucillo *et al.*, 2014). Estes efeitos podem ser atribuídos à ativação de fatores nucleares como NF- κ B e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (Fernandez-Riejos *et al.*, 2010). Estes dados podem ser suportados pela visualização de danos na ativação de linfócitos de camundongos *ob/ob* (Fernandez-Riejos *et al.*, 2010).

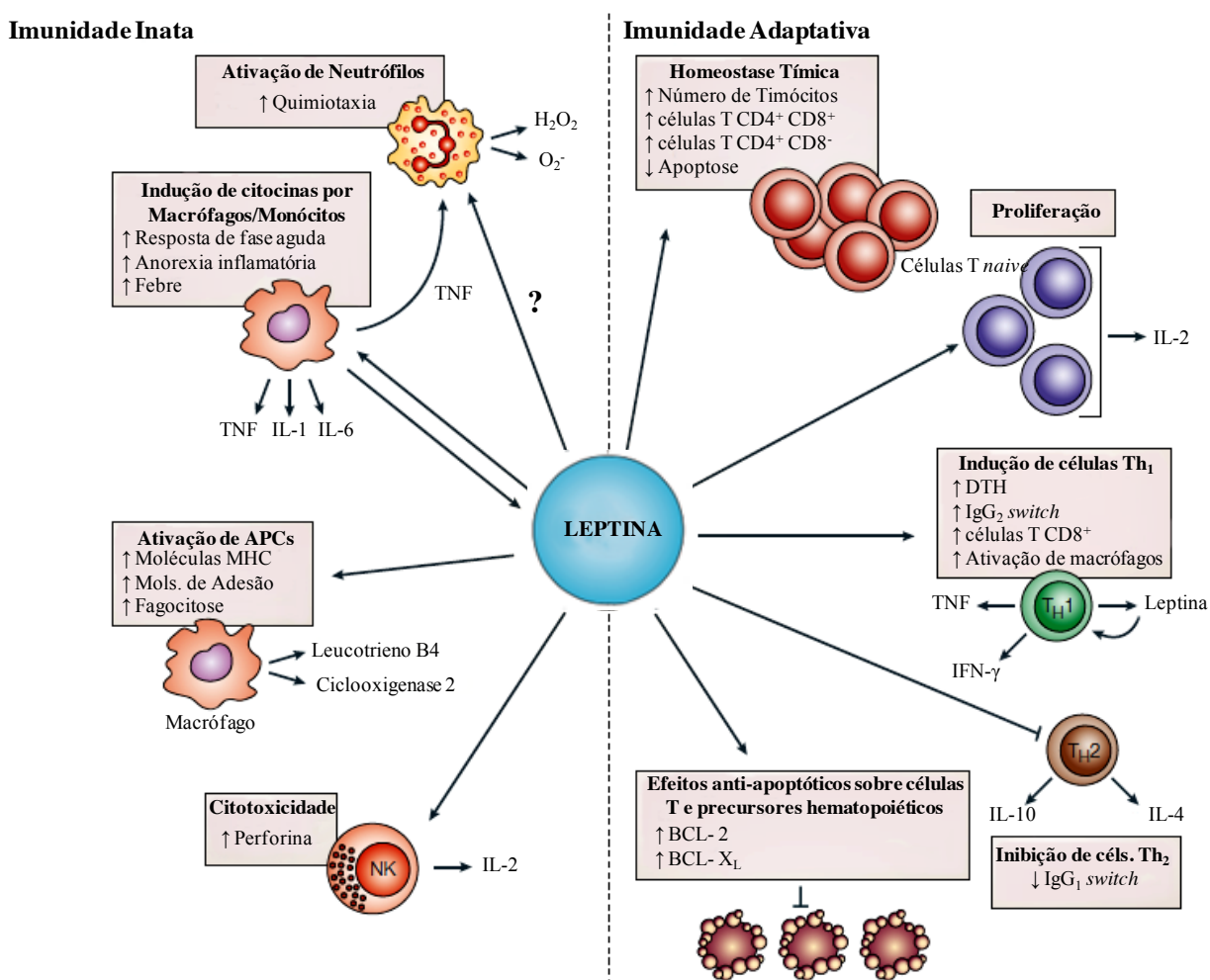


Figura 1.14. Modulação da atividade e função de diferentes tipos celulares do sistema imune pela leptina através de mecanismo direto ou indireto. Na imunidade inata a leptina exerce efeito sobre neutrófilos, células apresentadoras de antígenos (APCs), induz a fagocitose e secreção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos e aumenta a secreção de perforinas e interleucina 2 (IL-2) pelas células NK. Na imunidade adaptativa a leptina atua sobre linfócitos T, reduzindo apoptose e estimulando a proliferação e secreção de IL-2 e induzindo a polarização de linfócitos Th1 aumentando a secreção de TNF e INF- γ . Adaptado de La Cava e Matarese, 2004.

1.6. Leptina e Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs), do inglês *lipid droplet* ou *lipid body*, são organelas citoplasmáticas esféricas, que variam de 0,1 μM a 50 μM de diâmetro, constituídas por uma monocamada de fosfolipídeos, apresentando em seu interior grande quantidade de lipídeos neutros e composição proteica variada (Murphy e Vance, 1999; Bozza *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2011). Essas organelas são encontradas na maioria das células eucarióticas, sendo as principais responsáveis pela compartimentalização e pelo transporte de lipídeos neutros, como triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (EC), além de apresentarem grande envolvimento em diversos processos metabólicos, na sinalização celular e inflamação (Bozza *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2011; Thiam, *et al.*, 2013; Rabhi *et al.*, 2016). Juntamente aos fosfolipídeos que compõem sua membrana, os CLs apresentam proteínas estruturais membros da família PAT, os quais correspondem à perilipina (Plin1), *adipose differentiation related protein* (ADRP/Plin2) e *tail-interacting protein* de 47 kDa (TIP47/Plin3), que participam de modo importante no processo de formação dos corpúsculos lipídicos e na lipólise (Martin e Parton, 2006; Bozza *et al.*, 2009; Kimmel *et al.*, 2010).

Embora a biogênese de CLs não esteja completamente elucidada, alguns modelos têm sido propostos para explicar sua formação, sendo sugerido, de um modo geral, que sua origem ocorra no retículo endoplasmático (RE), em resposta a presença níveis elevados de ácidos graxos no meio intracelular (Martin e Parton, 2006; Fei *et al.*, 2011), podendo aumentar seu volume seja pelo aumento da síntese lipídica ou ainda pela fusão de CLs (Kuerschner *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2009). Um dos primeiros modelos descritos propõe que os corpúsculos lipídicos se originam através de um mecanismo de “brotamento” do RE, o qual ocorre em resposta ao acúmulo de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e síntese de lipídeos neutros entre os folhetos membranares do RE, formando ao final do processo uma organela citoplasmática independente envolvida por uma membrana derivada dos folhetos do RE, apresentando núcleo hidrofóbico enriquecido em lipídeos neutros e proteínas como GTPases, caveolinas e fosfolipases (Figura 1.15) (Murphy, 2001; Martin e Parton, 2006; Bozza *et al.*, 2009).

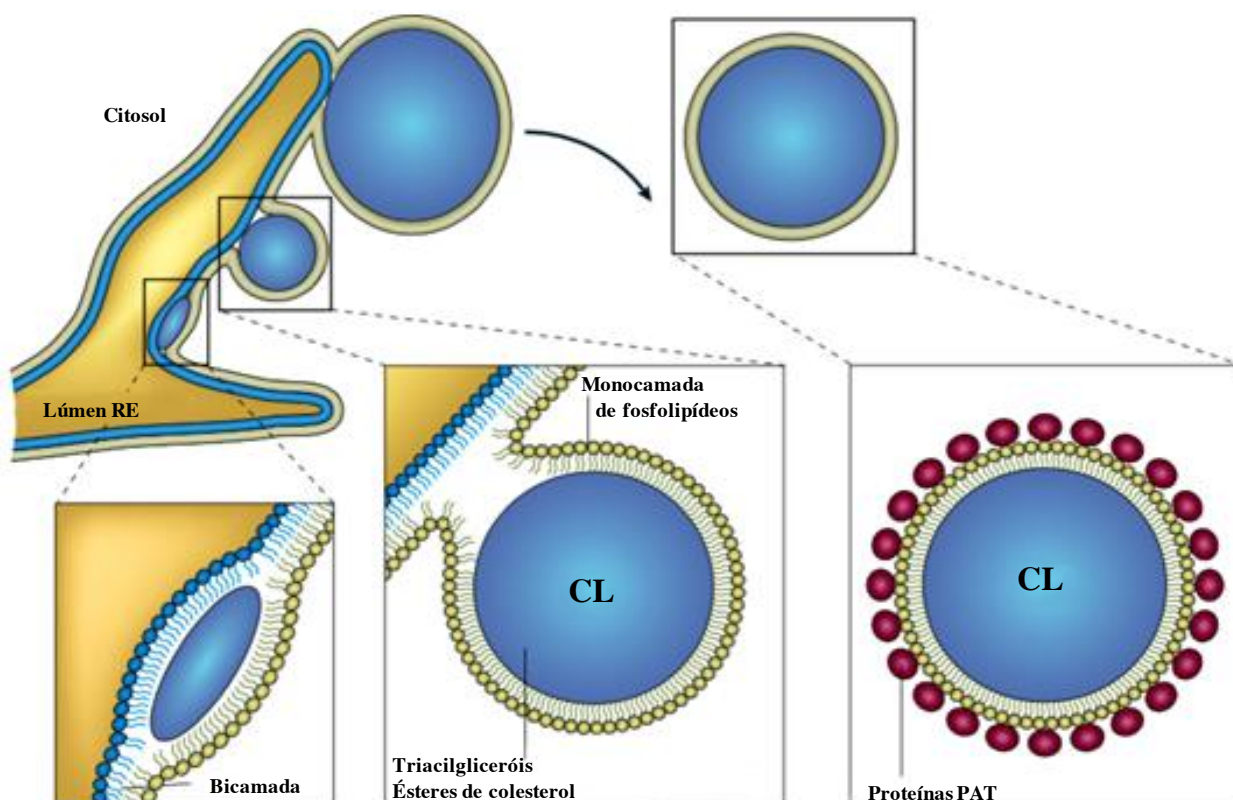


Figura 1.15. Modelo de brotamento proposto para biogênese dos corpúsculos lipídicos (CLs). Lipídeos neutros são sintetizados na membrana do retículo endoplasmático, onde os CLs sofrem maturação, aumentando seu conteúdo lipídico e formando uma organela independente envolta por uma monocamada de fosfolípidos que associam-se a proteínas da família PAT (ADRP, perilipina e TIP47-related protein) (Martin e Parton, 2006).

Outro modelo proposto por Robenek e colaboradores (2006), denominado modelo de “copo de ovo”, sugere que a formação de CLs ocorra em uma espécie de “copo” situado ao lado do RE, enriquecido de ADRP, onde esta proteína seria a responsável por transferir os lipídeos neutros do RE para o interior dos CLs (Robenek *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009).

Um terceiro modelo, proposto por Wan e colaboradores (2007), baseado no estudo de CLs de diferentes tipos celulares, sugere que a biogênese de corpúsculos lipídicos ocorra através de um mecanismo de “envolvimento”, onde domínios membranosos citoplasmáticos e luminais do RE são incorporados para formação de CLs, sendo seguido do acúmulo de lipídeos neutros entre as membranas situadas no interior dos corpúsculos lipídicos (Figura 1.16) (Wan *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011). Esta hipótese foi suportada pelo fato de que enzimas formadoras de eicosanóides como as ciclooxigenases (COX), fosfolipase A₂ (cPLA₂) e 5-lipoxigenases (5-LO), presentes no interior dos CLs permanecem funcionais em células inflamatórias, reforçando a possível presença de uma estrutura membranar no interior destas

organelas (Bozza e Weller, 2001; Bozza *et al.*, 2009). Além disso, a presença destas enzimas reforçam o papel dos CLs como uma organela dinâmica, capaz de atuar como uma fonte lipídica importante, passível de ser rapidamente mobilizada para a realização de diversos processos biológicos (Martin e Parton, 2006).

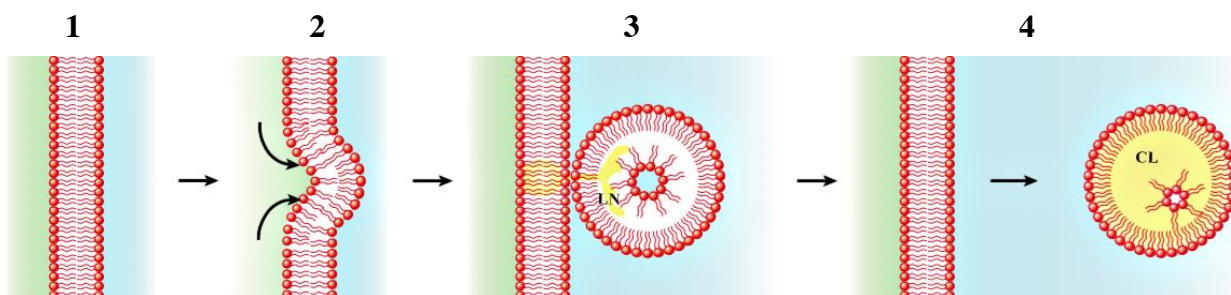


Figura 1.16. Modelo de envolvimento proposto para biogênese dos corpúsculos lipídios (CLs). **1.** Membrana do RE em estado de repouso. **2.** Incorporação de domínios membranosos citoplasmáticos e luminiais do RE. **3.** Lipídeos neutros são sintetizados e se acumulam no espaço intermembranar enquanto ocorre a formação da vesícula. **4.** Internalização de uma pequena porção derivada do RE, podendo esta permanecer no interior dos CLs ou ser eliminada fusionando-se com a monocamada lipídica. Esse modelo é compatível com o proposto de que proteínas hidrofílicas podem ser encontradas no interior de CLs (Saka e Valdivia, 2012).

A presença de enzimas envolvidas no metabolismo de colesterol e na síntese de ácidos graxos corrobora o importante papel dos CLs na manutenção da homeostase celular, indicando que etapas importantes do processo anabólico e catabólico do metabolismo lipídico ocorrem no interior destas organelas. O estoque lipídico armazenado em seu interior pode ser disponibilizado de acordo com a demanda requerida para o ideal funcionamento da célula (Brasaemle *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004).

Alterações tanto no tamanho quanto no número de CLs podem ser observadas em resposta a fatores internos e externos, além disso, diferentes tipos de corpúsculos são observados em tipos celulares distintos. Em adipócitos brancos, é possível se observar o armazenamento de uma grande quantidade de lipídios, o que é altamente compreensível visto a capacidade de armazenamento e especialização destas células (Fei *et al.*, 2011). A mobilização desse estoque de lipídios é crucial para processos como a β -oxidação e síntese de membrana celular, lipoproteínas, esteróides e de mediadores lipídicos envolvidos em diversas vias de sinalização e processos inflamatórios (Fujimoto e Parton, 2011). Ao contrário dos adipócitos brancos, células imunes como macrófagos e eosinófilos apresentam uma quantidade relativamente pequena de CLs quando não estão em seu estado ativado, demonstrando uma forte relação entre o grau de

ativação da célula e o número de CLs presentes em seu citoplasma (Bozza *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com intuito de compreender os mecanismos envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos em leucócitos e outros tipos celulares (Bozza e Viola, 2010), este é um processo altamente regulado, podendo ocorrer de maneiras distintas não somente em resposta à diferentes estímulos, mas também podendo ser variado de acordo com o tipo celular (Bozza e Bandeira-Melo, 2005; D'avila *et al.*, 2008). Dados na literatura demonstram que a ativação de leucócitos e consequente formação de corpúsculos lipídicos pode ser rapidamente desencadeada por diferentes estímulos inflamatórios como aqueles observados na obesidade, aterosclerose, sepse, artrite e síndromes respiratórias, bem como nas respostas contra patógenos intracelulares e processos neoplásicos (Bozza e Viola, 2010; Melo *et al.*, 2011; Saka e Valdivia, 2012; Rabhi *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que a indução na biogênese de CLs não ocorre simplesmente em resposta à incorporação de ácidos graxos exógenos, uma vez que ao contrário dos ácidos graxos insaturados, o estímulo com ácidos graxos saturados não é capaz de promover a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos, reforçando a hipótese de que a biogênese de CLs pode ocorrer de maneira dependente da ativação de vias e receptores distintos (Bozza e Weller, 2001; Bozza e Viola, 2010). Durante a inflamação induzida por obesidade, condição em que níveis elevados de algumas adipocinas, como a leptina, são encontrados, é possível se observar um elevado número de corpúsculos lipídicos em diferentes tipos celulares (Bozza *et al.*, 2009; Naylor e Petri Jr., 2016). Fazolini e colaboradores (2015) demonstraram que o estímulo com leptina é capaz de induzir a biogênese de CLs em células do epitélio intestinal (Fazolini *et al.*, 2015). Outros estudos demonstraram ainda que o estímulo tanto *in vitro* quanto *in vivo* com leptina induziu o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais, através de um mecanismo dependente da ativação de PI3K/mTOR, sendo o pico máximo de indução de corpúsculos alcançado 24 horas após o estímulo com a adipocina (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos realizados com *M. tuberculosis* demonstraram que a ativação da biogênese de CLs ocorre através da ativação de receptores do tipo Toll 2 (TLR2), de um modo dose e tempo dependente (D'Avila *et al.* 2006).

Todos estes dados sustentam o fato de que, ao contrário do que se pensava, os CLs não correspondem a inclusões citoplasmáticas com a função restrita ao armazenamento de reservas energéticas, mas que se tratam de organelas passíveis de ter sua biogênese induzida e participam fundamentalmente tanto de processos metabólicos quanto de respostas imunes, atuando de modo

importante como marcadores da ativação de leucócitos (Dong e Czaja, 2011; Greenberg e Colleman, 2011; Quiroga e Lehner, 2011; Wang e Sztalryd, 2011).

1.7. Resistência à Leptina

O desenvolvimento de uma condição de resistência à leptina desencadeada pela constante hiperleptinemia vem sendo reportado por diversos trabalhos (Frederich *et al.*, 1995; Ioffe *et al.*, 1998; Munzberg *et al.*, 2005; Sainz *et al.*, 2015), uma vez que em condições de sobrepeso/obesidade uma elevada concentração da adipocina circulante é encontrada, visto que sua secreção ocorre de modo proporcional a massa de tecido adiposo (Klein *et al.*, 1996). Esta elevação na concentração de leptina têm sido sugerida ser capaz de induzir uma maior ativação de STAT3 e como consequência, uma maior atuação de proteínas como SOCS e PTP1B, responsáveis por inibir a sinalização de leptina, promovendo desta forma a ausência de resposta as ações do hormônio, conforme demonstrado anteriormente na figura 1.10 (Bjørnbæk e Kahn, 2004; McArdle *et al.*, 2013; Roujeau *et al.*, 2014). Tal hipótese têm sido sustentada pela marcante expressão gênica de PTP1B e SOCS3 associada aos elevados níveis de leptina em camundongos *db/db*, nos quais somente a isoforma longa do receptor está ausente. Este mecanismo pode ser um dos responsáveis pela incapacidade destes animais em responder aos estímulos realizados com a administração de leptina exógena, sendo a ativação de receptores do tipo Ob-Rb um passo fundamental para que esta sinalização ocorra (Munzberg *et al.*, 2005; Munzberg e Myers, 2005; Munzberg e Morrison, 2015).

Juntamente com as alterações na expressão de proteínas inibitórias da sinalização de leptina, uma outra hipótese tem sido sugerida para justificar a redução da resposta à leptina em indivíduos obesos, nos quais uma redução no transporte da adipocina seria desencadeada durante o desenvolvimento de obesidade, contribuindo para que o transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica torne-se prejudicado e a sinalização ocorra de modo ineficiente (Bjørnbæk, 2009).

Outros trabalhos reportam ainda uma importante participação da inflamação hipotalâmica. Neste sentido, a resposta inflamatória conduziria a mudanças estruturais no hipotálamo além do aumento de citocinas pró-inflamatórias, e, desta forma, comprometeria a regulação da ingesta alimentar. Uma quarta hipótese para justificar o quadro de resistência desencadeado pela obesidade, está associada a uma elevação do estresse gerado no RE, conduzindo ao aumento da

síntese de proteínas não enoveladas e, assim, promoveria a ativação de vias de sinalização que culminariam em uma menor resposta às ações da leptina (Balland e Cowley, 2015).

O quadro de resistência hipotalâmica à leptina é caracterizado por hiperfagia e constante redução do gasto energético, tornando o quadro de obesidade ainda mais acentuado, além de contribuir para o funcionamento inadequado de diversas vias metabólicas (Denroche *et al.*, 2012).

É importante destacar que embora uma grande concentração de receptores Ob-Rb seja encontrada no SNC (Silva *et al.*, 1998), sua presença também pode ser observada em diversos tipos celulares como células epiteliais e células imunes como macrófagos, células NK e linfócitos T demonstrando assim uma importante atuação de leptina no que se refere à regulação das respostas periféricas (Munzberg *et al.*, 2005; Schulz e Widmaier, 2007).

Dados na literatura têm reportado que sob condições de resistência à leptina, a oxidação lipídica torna-se prejudicada, podendo em alguns casos conduzir a um quadro de lesão celular (Ren, 2004). Outros trabalhos mostram ainda sua participação no desenvolvimento de alterações no metabolismo de carboidratos, resistência à insulina e alterações na absorção de nutrientes pelo epitélio intestinal (Ceddia, 2005; Sainz *et al.*, 2015). Além disso, visto o frequente quadro inflamatório associado à obesidade (Tilg e Moschen, 2006), trabalhos que visem compreender o impacto da hiperleptinemia decorrente de DIO sobre células imunes responsáveis pela manutenção da homeostase tecidual têm se tornado cada vez mais relevantes (Ando e Catalano, 2012).

Em estudo publicado por Rosa e colaboradores (2007) foi demonstrado que o aumento nos níveis de leptina promovidos pela obesidade contribuem para o desenvolvimento de uma redução da resposta de células Treg às ações mediadas pela adipocina, e uma menor proliferação destas células (Rosa *et al.*, 2007; Matarese *et al.*, 2010b; Ando e Catalano, 2012). Também tem sido reportada uma redução na citotoxicidade de células NK em animais submetidos à DIO (Procaccini *et al.*, 2012). Estes dados associados com as observações de danos na resposta imune celular e humoral de camundongos resistentes à leptina são importantes indicativos de que a ausência de resposta ao hormônio pode trazer um grande impacto sobre a ativação, migração e proliferação de células do sistema imune (Tilg e Moschen, 2006).

Contudo, embora tenha sido sugerido que o aumento nos níveis plasmáticos da adipocina possam conduzir a um quadro de resistência central e periférica à leptina, os efeitos promovidos pelo seu constante aumento sobre a ativação e migração de células do sistema imune ainda não está bem esclarecido (Frederich *et al.* 1995; Ren, 2004). Sendo assim, neste trabalho buscamos determinar os efeitos da administração crônica de leptina murina recombinante em diferentes

intervalos e esquemas de tratamento sobre células do sistema imune e sobre o desenvolvimento de resistência central à leptina.

2. OBJETIVOS

2.1.Geral

Verificar os efeitos da administração recorrente de leptina sobre o sistema imune e sobre o desenvolvimento de resistência central e/ou periférica à leptina em camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2.Específicos

1. Avaliar os efeitos da administração periódica de leptina sobre a migração leucócitos e biogênese de corpúsculos lipídicos em modelo murino alimentado com dieta padrão.
2. Quantificar a liberação de mediadores inflamatórios na circulação sanguínea e cavidade peritoneal dos animais submetidos ao estímulo crônico com leptina.
3. Avaliar o desenvolvimento de resistência hipotalâmica à leptina através do acompanhamento de parâmetros fisiológicos.
4. Avaliar o desenvolvimento de resistência periférica de leucócitos em resposta à diferentes vias de administração, intervalos e doses de leptina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para realização dos experimentos, foram utilizados animais da linhagem C57BL/6, machos, adultos pesando entre 15-20 g, com idade aproximada de 3 semanas. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ), sob licença CEUA L-011/2015.

Antes de iniciar o estímulo com leptina os camundongos foram vermifugados e distribuídos três animais por caixa, mantendo-se o tempo necessário para aclimação conforme requerido para cada experimento. Os animais receberam água e comida *ad libitum*, sendo a ingesta alimentar e peso dos mesmos acompanhados diariamente.

Durante todo o período de estímulo os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal situado no pavilhão Helio e Peggy Pereira sob as condições de temperatura entre $20-22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 75-80%, tendo ciclo de luz/escuro de 12 horas (Speakman e Keijer, 2013).

3.2. Vermifugação dos Animais

Antes de dar início ao estímulo crônico com leptina, alguns grupos experimentais com animais de 3 semanas de idade foram submetidos ao tratamento com vermífugo Drontal Puppy[®] (Bayer), sendo administrados 100 μL do vermífugo na concentração de 10 % através de gavagem, empregando água destilada como veículo.

De modo a ampliar a gama de parasitos passíveis de sofrer ação do vermífugo, associado ao tratamento oral realizou-se tratamento tópico empregando solução de Ivermectina (Ivomec[®] solução injetável - Merial) 0,02 % (v/v) em água destilada. Esta solução foi borrifada diretamente sobre os camundongos de modo a cobrir toda a extensão corporal do animal.

Os animais foram submetidos a um período de aclimação durante 30 dias antes dar início ao estímulo crônico com leptina de modo a minimizar os efeitos decorrentes de metabólitos gerados a partir dos vermífugos ou aqueles decorrentes de estresse por manipulação e/ou transporte.

3.3. Doses e intervalos de administração seguidos durante o estímulo com leptina

Todos os ensaios foram realizados com leptina murina recombinante (cat. num. 450-31 - Peprotech), diluída em água estéril e apirogênica (Isofarma), e posteriormente armazenada em alíquotas em freezer -20°C, conforme especificações fornecidas pelo fabricante. As alíquotas foram diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9 % (p/v) estéril e apirogênica (Equiplex) para ajuste do volume e dose no momento do uso.

Para avaliar os efeitos da administração crônica de leptina sobre o sistema imune dos animais foram realizados diferentes esquemas de tratamento, nos quais variou-se o intervalo entre as injeções ou a via de administração do hormônio.

De modo a determinar a melhor dosagem a se utilizar para a realização dos experimentos, após o período de aclimação, os animais da linhagem C57BL/6 foram inicialmente distribuídos em 3 grupos experimentais, sendo eles *Controle*, o qual corresponde ao grupo de animais que não recebeu estímulo crônico, sendo somente manipulado no decorrer do período experimental, *Salina*, o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a injeções intraperitoneais de solução salina isotônica estéril e apirogênica e *Leptina* o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a injeções intraperitoneais periódicas de leptina.

Foram empregados nas administrações intraperitoneais 200 µL da solução de leptina. Como controle, o mesmo volume de solução isotônica estéril e apirogênica de cloreto de sódio foi injetado nos animais do grupo *Salina*.

Durante todo “estímulo crônico I” os animais foram mantidos em caixas individuais e acompanhados diariamente. Nos demais esquemas de tratamento, de modo a minimizar os efeitos inerentes ao estresse, foram mantidos 3 animais por caixa.

Ao final do período de estímulo crônico os animais dos 3 grupos (*Controle*, *Salina* e *Leptina*), foram mantidos em jejum *overnight* e redistribuídos de maneira a obter 6 grupos experimentais, sendo estes submetidos à administração intraperitoneal de solução salina isotônica estéril e apirogênica ou de leptina nas 24 horas que antecederam a eutanásia dos animais (Figura 3.1).

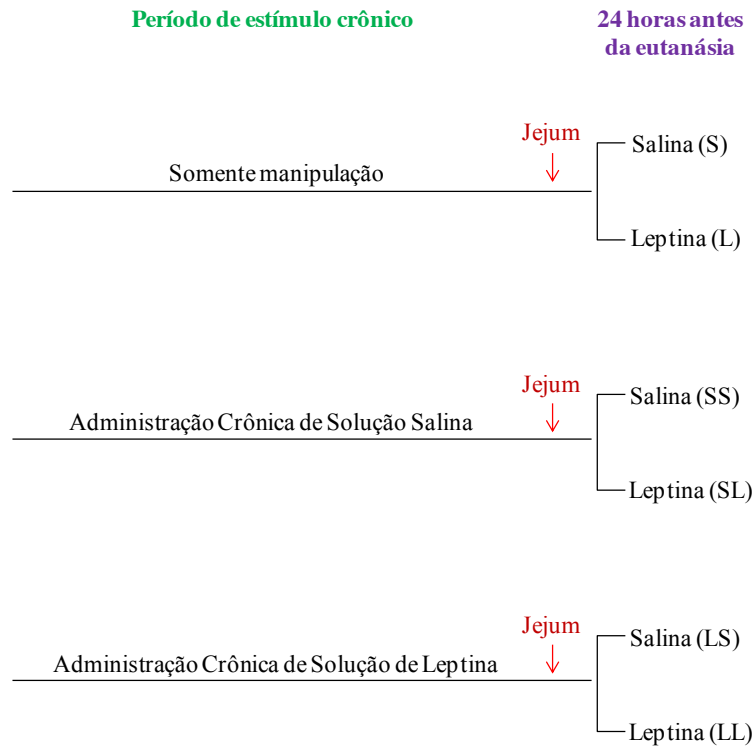


Figura 3.1. Representação esquemática da distribuição de grupos e esquema geral de estímulo adotado durante o período experimental. As setas vermelhas apontam o período em que os animais foram colocados em jejum enquanto os colchetes pretos correspondem a distribuição dos grupos experimentais nas 24 horas que antecederam a eutanásia.

Os grupos experimentais obtidos durante a redistribuição adotada nos estímulos crônicos 1, 2 e 3 apresentam-se descritos detalhadamente abaixo:

- *Salina (S)*: Animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de salina estéril 24 horas antes da eutanásia, não estimulados cronicamente, sendo apenas manipulados.
- *Leptina (L)*: Animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de 1 mg/kg de leptina estéril 24 horas antes da eutanásia, não estimulados cronicamente, sendo apenas manipulados.
- *Salina + Salina (SS)*: Animais estimulados cronicamente com salina estéril intraperitoneal, submetidos à administração intraperitoneal de solução salina estéril 24 horas antes da eutanásia.
- *Salina + Leptina (SL)*: Animais estimulados cronicamente com salina estéril intraperitoneal, submetidos à administração intraperitoneal de 1 mg/kg de leptina estéril 24 horas antes da eutanásia.
- *Leptina + Salina (LS)*: Animais estimulados cronicamente com leptina estéril intraperitoneal, submetidos à administração intraperitoneal de solução salina estéril 24 horas antes da eutanásia.
- *Leptina + Leptina (LL)*: Animais estimulados cronicamente com leptina estéril intraperitoneal, submetidos à administração de 1 mg/kg de leptina estéril intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia.

Os esquemas de tratamento empregados em cada experimento seguem descritos abaixo, e encontram-se especificados na legenda da figura correspondente.

- *Estímulo I*

Os animais pertencentes ao grupo experimental *LS* e *LL* foram submetidos a 8 administrações do hormônio, o qual teve sua dosagem elevada gradativamente, iniciando-se com a administração da dose de 0,1 mg/kg, seguida de 3 administrações de 0,25 mg/kg e 5 administrações de 0,5 mg/kg, realizando-se intervalos de 72 horas entre cada nova administração.

ESTÍMULO I INTRAPERITONEAL

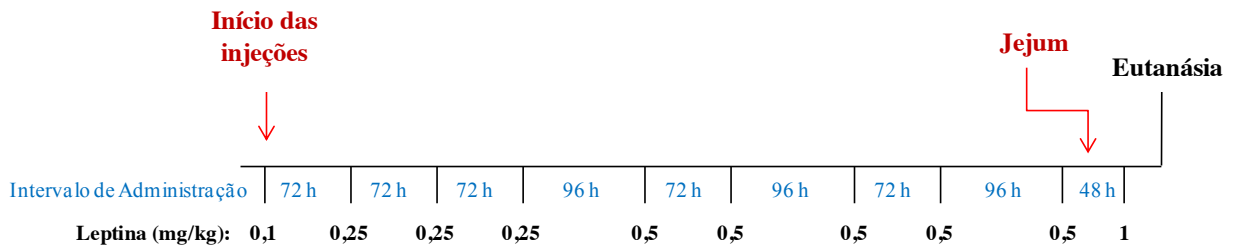


Figura 3.2. Representação esquemática do estímulo I, mostrando as doses e os intervalos de administração seguidos durante o período de estímulo crônico. As setas vermelhas apontam o início das injeções e período em que os animais foram colocados em jejum e as setas verde e preta a distribuição e redistribuição dos grupos experimentais.

▪ Estímulo II

Nesse esquema de tratamento os animais pertencentes ao grupo experimental *LS* e *LL* foram submetidos a 12 administrações de 1 mg/kg de leptina preparada conforme descrito no item 3.3., realizando-se intervalos de 48 horas a 6 dias entre cada nova administração, conforme apresentado na figura 3.3.

ESTÍMULO II INTRAPERITONEAL Leptina 1 mg/kg

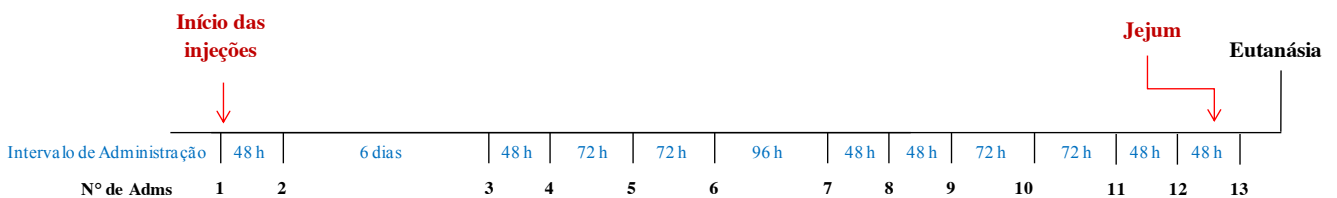


Figura 3.3. Representação esquemática do estímulo II, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico intraperitoneal com leptina. Para este experimento foram administrados 1 mg/kg de leptina em cada injeção.

- *Estímulo III*

Após o período necessário para aclimação e eliminação de metabólitos provenientes da administração do vermífugo, os camundongos foram distribuídos, conforme descrito no item 3.3. Os animais pertencentes ao grupo experimental *LS* e *LL* foram submetidos a 12 administrações de 1 mg/kg de leptina, realizando-se intervalos de 48 horas a 7 dias entre cada nova administração, conforme apresentado na figura 3.4.

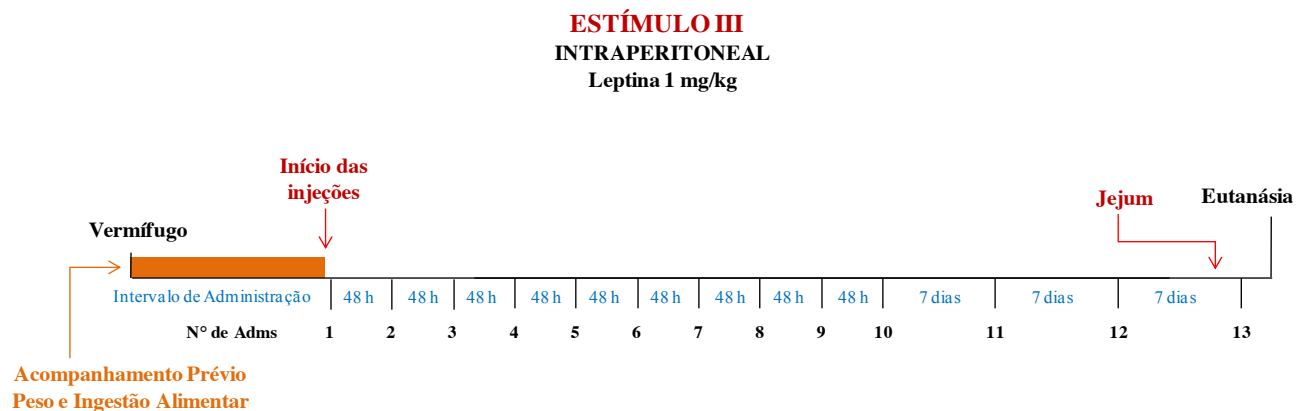


Figura 3.4. Representação do esquema de estímulo III, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico. As setas vermelhas apontam o início das injeções e período em que os animais foram colocados em jejum e as setas preta e verde a distribuição e redistribuição dos grupos e a barra laranja o período prévio de acompanhamento de peso/ingesta.

- *Estímulo IV*

Após vermifugados, os animais foram acompanhados diariamente, sendo respeitado o período necessário para aclimação e eliminação de metabólitos provenientes da administração do vermífugo, antes de se iniciar o estímulo crônico com leptina ou solução salina.

Posteriormente, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo eles *SS* e *SL*, o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a injeções intraperitoneais de solução salina isotônica estéril e apirogênica e *LS* e *LL* o qual corresponde ao grupo de animais submetidos à injeções intraperitoneais periódicas de leptina. Para realização dos experimentos, foram mantidos 3 animais por caixa.

Os animais pertencentes ao grupo experimental *LS* e *LL* foram submetidos a 7 administrações de 2 mg/kg de leptina preparada conforme descrita anteriormente, realizando-se intervalos de 72 horas entre cada nova administração, conforme apresentado na figura 3.5.

ESTÍMULO IV
INTRAPERITONEAL
Leptina 2 mg/kg

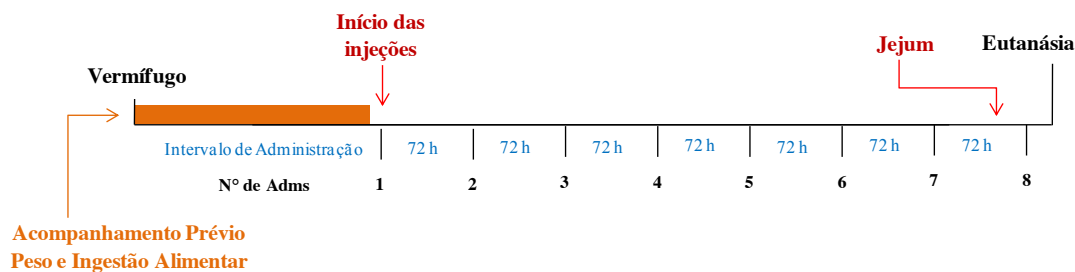


Figura 3.5. Representação esquemática do estímulo IV, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico intraperitoneal com leptina 2 mg/kg em cada administração.

▪ *Estímulo V*

Após o período de ambientação, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, sendo eles *Salina* (SS), o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a 8 injeções intraperitoneais de solução salina isotônica estéril e apirogênica, *Leptina 1* (LL1) o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a 8 injeções intraperitoneais periódicas de leptina na dosagem de 1 mg/kg e *Leptina 2* (LL2) o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a 8 injeções intraperitoneais periódicas de leptina na dosagem de 2 mg/kg.

Para realização dos experimentos, foram mantidos 3 animais por caixa, realizando-se o intervalo de 72 horas entre cada nova administração. Os animais foram submetidos ao jejum nas 12 horas que antecederam a última injeção, e permaneceram em jejum até o momento da eutanásia, a qual ocorreu 24 horas após a oitava injeção.

ESTÍMULO V
INTRAPERITONEAL
Leptina 1 mg/kg – LL1
Leptina 2 mg/kg – LL2

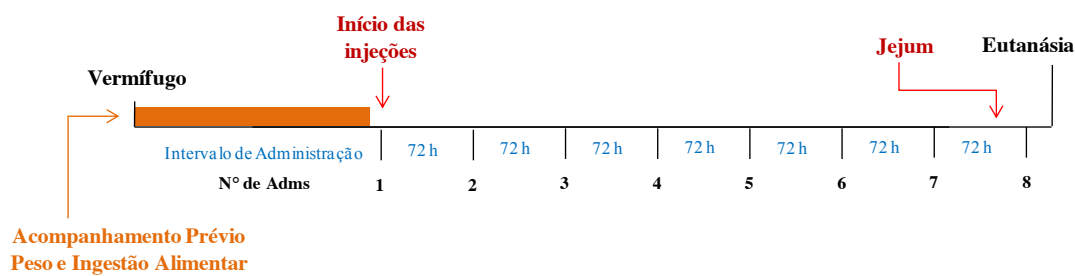


Figura 3.6. Representação do esquema de estímulo crônico V, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico intraperitoneal com 1 ou 2 mg/kg de leptina em cada administração.

- *Estímulo VI*

Para avaliação dos efeitos de diferentes administrações de leptina sobre a migração de células imunes, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo eles *Salina 1* e *Salina 2*, os quais correspondem aos grupos de animais submetidos, respectivamente, à 1 e 2 injeções intraperitoneais de solução salina isotônica estéril e apirogênica e *Leptina 1* e *Leptina 2*, os quais correspondem aos grupos de animais submetidos à 1 e 2 injeções intraperitoneais periódicas de leptina 1 mg/kg. Para realização dos experimentos, foram mantidos 4 animais por caixa, realizando-se intervalos de 72 horas entre cada nova administração, conforme apresentado na figura 3.7.

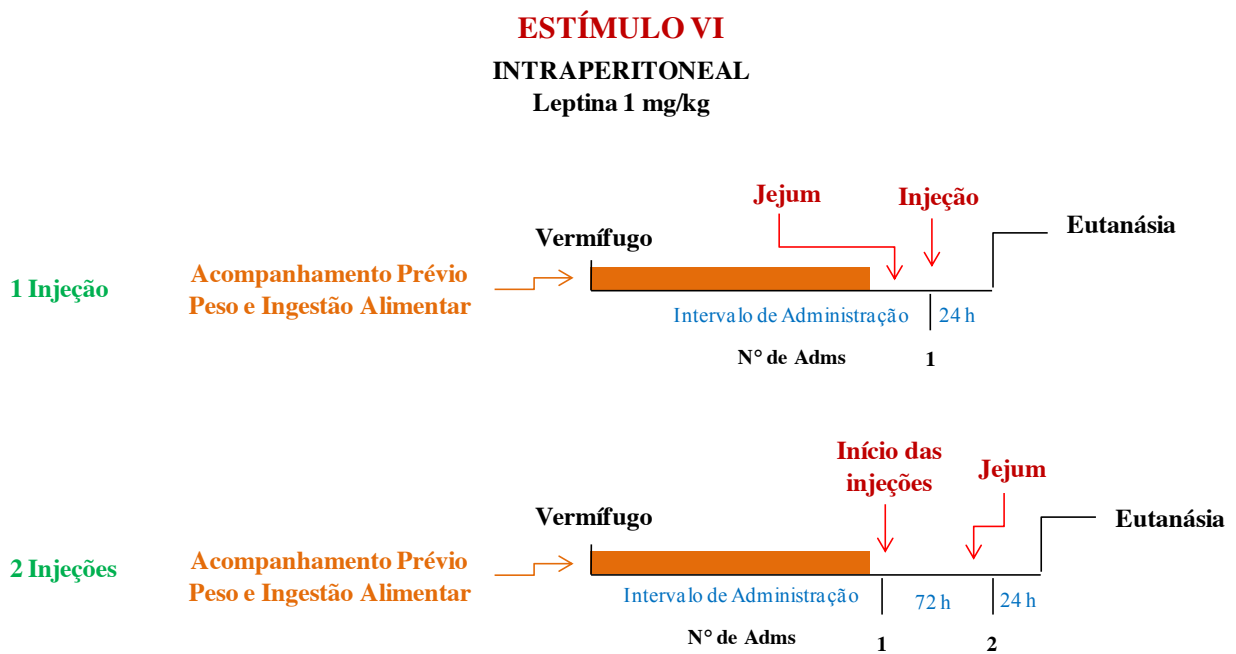


Figura 3.7. Representação esquemática do estímulo VI, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico intraperitoneal com leptina, 1 mg/kg em cada injeção.

- *Estímulo VII*

Para avaliação de possíveis efeitos tardios de leptina sobre a migração de células imunes, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo eles *Salina (24 h)* e *Salina (48 h)*, os quais correspondem aos grupos de animais submetidos à uma administração intraperitoneal de solução salina isotônica estéril e apirogênica e eutanasiados, respectivamente, 24 e 48 horas após o estímulo e *Leptina (24 h)* e *Leptina (48 h)*, os quais correspondem aos grupos de animais submetidos à uma administração intraperitoneal de leptina 1 mg/kg e

eutanasiados após 24 e 48 horas da administração, respectivamente. Para realização dos experimentos, foram mantidos 4 animais por caixa, os quais não foram manipulados previamente de modo a diminuir o estresse ocasionado aos animais.

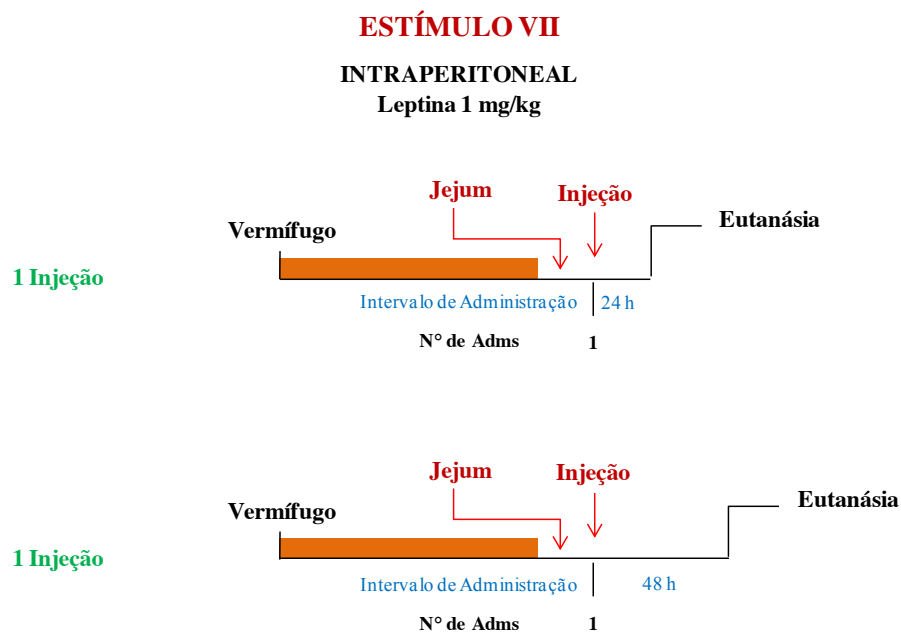


Figura 3.8. Representação do esquema de estímulo VII, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico intraperitoneal com leptina, 1 mg/kg em cada injeção.

- *Estímulo VIII - Subcutâneo*

Nesse esquema de tratamento os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo eles *SS* e *SL*, o qual corresponde ao grupo de animais submetidos a 7 injeções subcutâneas de solução salina isotônica estéril e aprotínica, e *LS* e *LL*, o qual corresponde ao grupo de animais submetidos à 7 injeções subcutâneas periódicas de leptina na dosagem de 2 mg/kg.

Para realização dos experimentos, foram mantidos 3 animais por caixa, realizando-se o intervalo de 72 horas entre cada nova administração. Após a realização de jejum *overnight* (12 horas), os animais receberam a última administração de leptina ou solução salina, a qual foi realizada via intraperitoneal de modo a proporcionar uma melhor visualização dos efeitos do aumento crônico de leptina sobre a migração de células imunes para a cavidade peritoneal. A eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂ 24 horas após a última injeção.

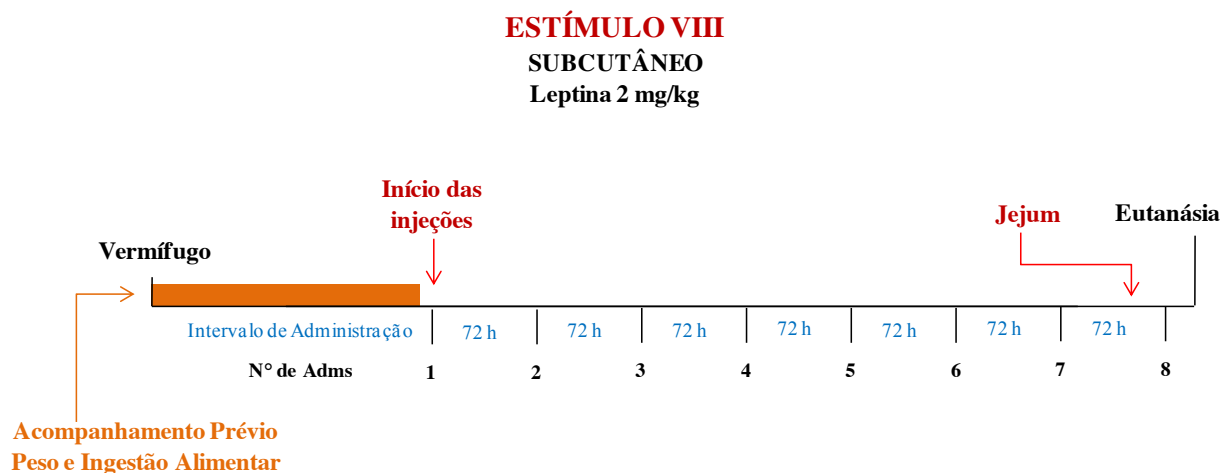


Figura 3.9. Representação esquemática do estímulo VIII, mostrando os números e os intervalos de administração seguidos durante o estímulo crônico subcutâneo com leptina 2 mg/kg em cada administração.

3.4. Dosagem de Glicemia

Para averiguação dos efeitos da administração de leptina sobre os índices glicêmicos, foi realizada a aferição de glicemia dos animais em jejum submetidos aos diferentes esquemas de tratamento através da aplicação do sangue coletado da cauda do animal em fita reativa e leitura no aparelho One Call Plus (Medleventsohn), cerca de duas horas antes da eutanásia. Os dados obtidos estão expressos em mg/dL.

3.5. Contagem Total e Diferencial Sangue

Foi realizada punção caudal nos animais para recolhimento de amostras de sangue, empregadas na realização da contagem de leucócitos totais, e posteriormente na contagem diferencial de leucócitos.

A contagem de leucócitos totais foi efetuada através do emprego de 5 µL de sangue total em 95 µL de líquido de Türk, de modo a promover a lise de hemácias e melhor visualização dos leucócitos. Esta solução foi homogeneizada e aplicada em câmara de Neubauer e a contagem realizada em microscópio óptico em aumento de 40x. O número de leucócitos totais está expresso em milhões de células/mL, o qual foi determinado seguindo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{céls contadas} \times fd \times 10000}{4}$$

4

onde fd = fator de diluição

Posterior a obtenção do número de leucócitos presentes no sangue dos animais, foi realizada a contagem diferencial destas células, para isso, uma alíquota de 5 µL de sangue total obtida da cauda dos animais foi aplicada diretamente em lâmina de vidro e realizada a extensão do sangue periférico (esfregaço).

O esfregaço sanguíneo foi submetido à coloração de May-Grünwald (item 3.15.3) através da submersão das lâminas durante 45 minutos, seguido de lavagem e imersão no corante Giensa a 20 % (p/v) (cat. num. 1.09204.0500 – Merck Millipore) por cerca de duas horas. Após este período as lâminas foram retiradas do corante, lavadas em água corrente e mantidas a temperatura ambiente durante o processo de secagem para posterior contagem diferencial em microscópio óptico (Olympus BX41) em objetiva de imersão (100x), sendo contadas um total de 100 células, as quais correspondem a 100 % da população celular presente na amostra.

Os dados obtidos a partir da contagem diferencial foram normalizados pelo número de leucócitos totais (obtido conforme descrito acima), de modo a obter-se o número absoluto de cada tipo leucocitário presente na amostra, sendo empregada a seguinte fórmula:

$$\frac{\% \text{ tipo leucocitário} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ leucócitos totais/mL}}$$

Os valores obtidos para cada tipo leucocitário estão expressos em milhões de células/mL (tipo leucocitário $\times 10^6$ /mL).

3.6.Punção cardíaca

Após eutanásia dos animais em câmara de CO₂, foi realizada punção cardíaca empregando agulha de 0,45 x 13 mm (26G x 1/2") (BD PrecisionGlide™) e seringa de 1 mL (BD Plastipak™). Nos casos em que se fez necessária a obtenção de plasma, utilizou-se 100 µL de solução anticoagulante de citrato de sódio no momento da obtenção do sangue.

O material obtido após a punção cardíaca foi mantido em temperatura ambiente (20-25°C) por cerca de 25 minutos, de modo a facilitar a ativação de fatores de coagulação para obtenção do soro, e posteriormente levado à centrifugação a 1600 rpm, 4°C por 20 minutos. Após este período, soro ou plasma foram coletados, aliquotados e mantidos em freezer a -80°C para posterior realização de ensaios imuno-enzimáticos.

3.7.Lavado Peritoneal

Para obtenção de células presentes na cavidade peritoneal, realizou-se o lavado desta região através da administração de 3 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9 % (p/v), mantida sob a temperatura de 4°C de modo a favorecer o maior recolhimento de células.

O conteúdo injetado no peritônio dos animais (3 mL) foi recolhido e empregado na contagem de leucócitos totais e na confecção de lâminas utilizando citocentrífuga Cytospin® 3 (Thermo Shandon) e posteriormente levado a centrifugação à 1800 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi coletado, aliquotado e mantido em freezer a -80°C para posterior avaliação de citocinas presentes nesta região.

A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer empregando 10 µL da solução constituída por 50 µL do lavado peritoneal e 450 µL de líquido de Türk. Os valores obtidos da contagem estão expressos em número de células x10⁶, seguindo fórmula descrita no item 3.5. Para obtenção do número total de células presentes na cavidade peritoneal os dados obtidos foram multiplicados pelo volume de solução salina utilizada para realização do lavado.

A confecção de lâminas para contagem diferencial da população de leucócitos e avaliação de corpúsculos lipídicos foi realizada utilizando 100 µL do lavado peritoneal em citocentrífuga, à 500 rpm durante 5 minutos, seguindo o protocolo de coloração e contagem descritos no item 3.5.

3.8. Marcação de corpúsculos lipídicos por *Oil Red O* (ORO)

Após a confecção das lâminas empregando o conteúdo do lavado peritoneal em citocentrífuga Cytospin 3 (Thermo Shandon), as amostras foram fixadas por imersão *overnight* em solução de formalina 3,7 % (v/v) em PBS, pH 7,4. Posterior ao período de fixação, as lâminas foram submersas em solução salina tamponada utilizando PBS pH 7,4, preparada conforme descrito no item 3.15.1., até o momento da coloração.

As lâminas foram coradas em solução de *Oil Red O* a 60 % (v/v) preparada a partir da solução descrita no item 3.15.2., diluída em água destilada, submetida a dupla filtragem e adicionada em cuba vertical para coloração de lâminas.

As lâminas contendo os citocentrifugados previamente mantidas em PBS foram lavadas em água corrente e então submersas nesta solução durante 5 minutos. Posterior a este período as lâminas foram lavadas com água corrente e imersas por 30 segundos em isopropanol 30 % (v/v), seguida de uma nova etapa de lavagem e imersão em PBS por 5 minutos. Após este período as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e imersas em hematoxilina de Myers (cat. num. 1.09249.0500 - Merck Millipore) durante 1 minuto para marcação de núcleos, seguida de lavagem em água corrente e secagem a temperatura ambiente.

A observação de corpúsculos lipídicos foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX60), utilizando objetiva de imersão (100x), respeitando o período máximo de duas semanas após a coloração para realizar a observação de CLs, de modo a evitar a formação de cristais de *ORO* e artefatos. A contagem de CLs foi realizada manualmente pela observação de inclusões citoplasmáticas presentes em células mononucleares coradas em vermelho e normalizada pela relação entre o número de células mononucleares com morfologia característica de macrófagos presentes no mesmo campo.

3.9. Quantificação de citocinas

Possíveis alterações no perfil de citocinas secretadas foram verificadas através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando amostras de plasma ou soro e sobrenadante obtido a partir de centrifugação do lavado peritoneal realizado em centrífuga Beckman Coulter - Allegra™ 6R.

As dosagens foram realizadas utilizando os kits para quantificação de Leptina (cat. num. 900 K76 - Peprotech), TNF- α (cat. num. 555268 - BD OptEIA™), Eotaxina (cat. num. DY420 - DuoSet® R&D Systems), IL-1 β (cat. num. DY401 - DuoSet® R&D Systems), e MCP-1 (cat. num. DY479 - DuoSet® R&D Systems), segundo instruções do fabricante, aplicando-se 50 μ L de amostras diluídas duas vezes para a dosagem de eotaxina plasmática/sérica e amostras não diluídas para as demais reações, em placa de 96 poços com metade da área. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro Molecular Devices SPECTRA max 190 em comprimento de onda de 450 nm.

3.10. Lise Celular

Para avaliar diferenças no perfil de expressão de proteínas associadas a corpúsculos lipídicos foi realizada a técnica de *western blot*, para isso adicionou-se ao *pellet* celular obtido após centrifugação do lavado peritoneal 50 μ L de tampão de lise (preparado conforme descrito no item 3.15.4.) para cada 1×10^6 células. A suspensão obtida foi submetida à sonicação durante 10 minutos a 30°C. Após este período as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm durante 10 minutos a 25°C em centrífuga Eppendorf 5415 R, e o sobrenadante gerado foi recolhido para posterior quantificação de proteínas.

3.11. Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas totais presente em cada amostra foi determinada através do método proposto por Lowry e colaboradores (1951), empregando como padrão solução de albumina bovina - BSA a 1 mg/mL (cat. num. A4503 - Sigma Aldrich), para realização da curva padrão. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro Molecular Devices SPECTRA max 190 em comprimento de onda de 550 nm.

3.12. Western Blotting

Após a lise celular e quantificação de proteínas conforme descrito anteriormente, as amostras foram preparadas de modo a obter 20 µg de proteínas totais. Foram adicionadas as amostras 5 µL de tampão de amostra proposto por Laemmli (1970), 5 vezes concentrado e o volume final ajustado para 25 µL. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida a 7,5 % contendo SDS, conforme demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 3.1 – Volumes de reagentes empregados para obtenção de 2 mini géis a 7,5%. Nesta porcentagem a malha do gel retém proteínas com peso molecular entre 24 e 205 kDa.

Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) 7,5 %		
	<i>Gel de Separação</i>	<i>Gel de Empilhamento</i>
Água Destilada	10 mL	6,10 mL
Bis/Acrilamida 30% (p/v)	5 mL	1,33 mL
Tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,6	5 mL	-----
Tampão Tris HCl 0,5 M pH 6,8	-----	2,5 mL
SDS 10 % (p/v)	200 µL	100 µL
APS 10 % (p/v)	400 µL	100 µL
TEMED	16 µL	16 µL

Após o preparo do gel, a cuba de eletroforese foi completada com 800 mL de tampão de corrida gelado descrito no item 3.15.5., seguida da aplicação de 25 µL de amostra por poço, tendo como padrão o marcador de peso molecular Amersham ECL Full- Range rainbow (cat num RPN800E - GE Healthcare Life Sciences). A corrida foi realizada sob resfriamento, iniciando-se com 100V até que as amostras saíssem do gel de empilhamento e alcançassem o gel de separação sendo a voltagem elevada para 120V até o termino da corrida.

Após a separação das proteínas, os géis foram submetidos à transferência em membrana de nitrocelulose Amersham Protran 0,45 NC (cat. num. 10600003 - GE Healthcare), conforme protocolo estabelecido por Towbin e colaboradores (1979).

A transferência das amostras foi realizada sob refrigeração utilizando 800 mL de tampão de transferência descrito no item 3.15.6, a 200 mA durante 2 horas. A confirmação da

transferência foi realizada pela visualização de bandas presentes na membrana coradas pela solução de vermelho de Ponceau, descrita no item 3.15.9.

Após transferência as membranas foram lavadas com tampão TBS-T (item 3.15.8) e incubadas por duas horas com solução de bloqueio descrita no item 3.15.10. Posterior a este período, o tampão de bloqueio foi descartado e adicionou-se a membrana anticorpo primário para anti-ADRP H-80 rabbit (cat. num. 32888- Santa Cruz) na proporção 1:1000 em tampão de bloqueio, e seguiu-se sob incubação *overnight* a 4°C.

Posteriormente, a membrana foi submetida a 5 ciclos de lavagem com duração de 2 minutos em tampão TBS-T e adicionou-se anticorpo secundário IRDye® 800CW produzido em goat anti-mouse (cat. num. 926-32210 – LI-COR Bioscience) na proporção 1:10000 em tampão de bloqueio, seguindo incubação a temperatura ambiente durante uma hora. Após este período as membranas foram lavadas novamente e reveladas no sistema de imagem Odyssey ® CLx (LI-COR Biosciences).

A membrana foi submetida a 5 ciclos de lavagem com duração de 2 minutos em tampão TBS-T e 2 ciclos de lavagem de 2 minutos em tampão TBS, seguido do bloqueio pelo período de uma hora e marcação da proteína constitutiva, realizada incubando-se a membrana com anticorpo primário anti- β -actina murina (cat. num. A-1978 - Sigma) produzido em camundongo, na proporção 1:10000, pelo período de uma hora. A revelação da membrana seguiu conforme descrito anteriormente.

A análise do nível de expressão de ADRP foi realizada através do programa *Image J*, a partir da densitometria das bandas apresentadas para esta proteína e normalizadas pela expressão de β -actina da amostra correspondente, sendo os valores expressos através da razão ADRP/ β -actina.

3.13. Citometria de Fluxo

A avaliação da distinção de macrófagos presentes na cavidade peritoneal dos animais foi realizada através da marcação com anti-CD11b conjugado a alofococianina (APC) e anti-F4/80 conjugado a ficoeritrina (PE) (BD PharmingenTM) e pelo tamanho e granulosidade, característicos desse tipo celular. A marcação de corpúsculos lipídicos foi realizada pela adição de 5 μ L de *Bodipy*® 493/503 (cat. num. D3922 - ThermoFisher Scientific) no momento da aquisição dos eventos. Isotipos foram usados como controle da ligação inespecífica dos anticorpos.

Foram adquiridos 10.000 eventos por região em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience) após compensação apropriada das cores. Todas as aquisições foram analisadas através do *software* FlowJo[®].

3.14. Análises estatísticas

As análises estatísticas de todos os dados obtidos foram realizadas com o programa GraphPad Prism[®] versão 5.01, empregando oneway ANOVA para análise de variância e *posthoc* de Bonferroni para verificação da diferença em uma variável entre dois grupos experimentais. O mesmo programa foi utilizado para construção dos gráficos.

3.15. Preparo de Soluções

3.15.1. PBS

Fosfato de Potássio Monobásico	0,024 %
NaCl	0,08 %
Fosfato de Sódio Dibásico	0,0144 %
KCl	0,02 %

Os analitos foram pesados e dissolvidos em água destilada, a solução foi aquecida a 37°C para dissolução completa dos sais, sendo o pH ajustado para 7,4.

3.15.2. Oil Red O solução estoque 3 %

A solução estoque de *Oil Red O* (cat. num. O0625 - Sigma) foi preparada a 3% (p/v) em Isopropanol (Sigma). Esta solução foi mantida em repouso por 24 horas e posteriormente submetida a dupla filtragem e empregada na coloração de lâminas, conforme descrito no item 3.8.

3.15.3. May-Grünwald 0,25 %

Para o preparo do corante, 2,5 g de May-Grünwald foram pesados em balança analítica e dissolvidos em metanol q.s.p. 1 L de solução. A solução foi mantida sob aquecimento a 60°C em capela química durante uma hora, e posteriormente mantida em repouso durante 24 horas. Após este período a solução foi duplamente filtrada e empregada na coloração diferencial de leucócitos.

3.15.4. Ripa Buffer - Tampão de Lise

Tris-HCl, pH 8.0.....	50 mM
NaCl.....	150 mM
Triton X-100.....	0.1 % (v/v)
Deoxicolato de Sódio.....	0.5 % (p/v)
SDS.....	0.1 % (p/v)
Inibidor de Protease cOmplete, EDTa free (cat. num. 11 873 580 001 - Roche)	

3.15.5. Tampão de Corrida

Tris.....	25 mM
Glicina.....	190 mM
SDS.....	0,1 % (p/v)

3.15.6. Tampão de Transferência

Tris.....	25 mM
Glicina.....	190 mM
Metanol.....	20 % (v/v)

3.15.7. Solução Salina Tamponada com Tris (TBS)

Tris, pH 7,5.....	20 mM
NaCl.....	150 mM

3.15.8. Solução Salina Tamponada com Tris acrescida de Tween (TBS-T)

Tris, pH 7,5.....	20 mM
NaCl.....	150 mM
Tween 20.....	0.1% (v/v)

3.15.9. Coloração de Ponceau S

Ponceau S	0.2% (p/v)
Ácido acético glacial.....	5% (v/v)

3.15.10. Tampão de Bloqueio para WB

Leite Desnatado	5 g
TBS-T	q.s.p. 100 mL

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da Metodologia Empregada nos Ensaio

De modo a determinar a dose ideal a ser administrada nos animais, inicialmente realizou-se injeção intraperitoneal de leptina em concentrações que variaram de 0,1 a 1 mg/kg conforme apresentado na figura 4.1.

O aumento gradual da dose também foi planejado de modo a evitar um emagrecimento excessivo em decorrência da administração de uma dose inicial muito elevada, sendo o peso e ingesta alimentar dos animais acompanhados durante o período de estímulo, a fim de verificar a existência de uma possível correlação entre a dose administrada e os efeitos sobre a massa corporal e saciedade dos camundongos.

Tal monitoramento nos permitiu observar uma sutil redução no peso dos animais após a administração de leptina quando comparado aos controles, no entanto resultados similares não foram observados sobre a ingesta alimentar, sugerindo que a redução de peso observada se deve a uma maior indução do gasto energético e não a alterações significativas no mecanismo de saciedade.

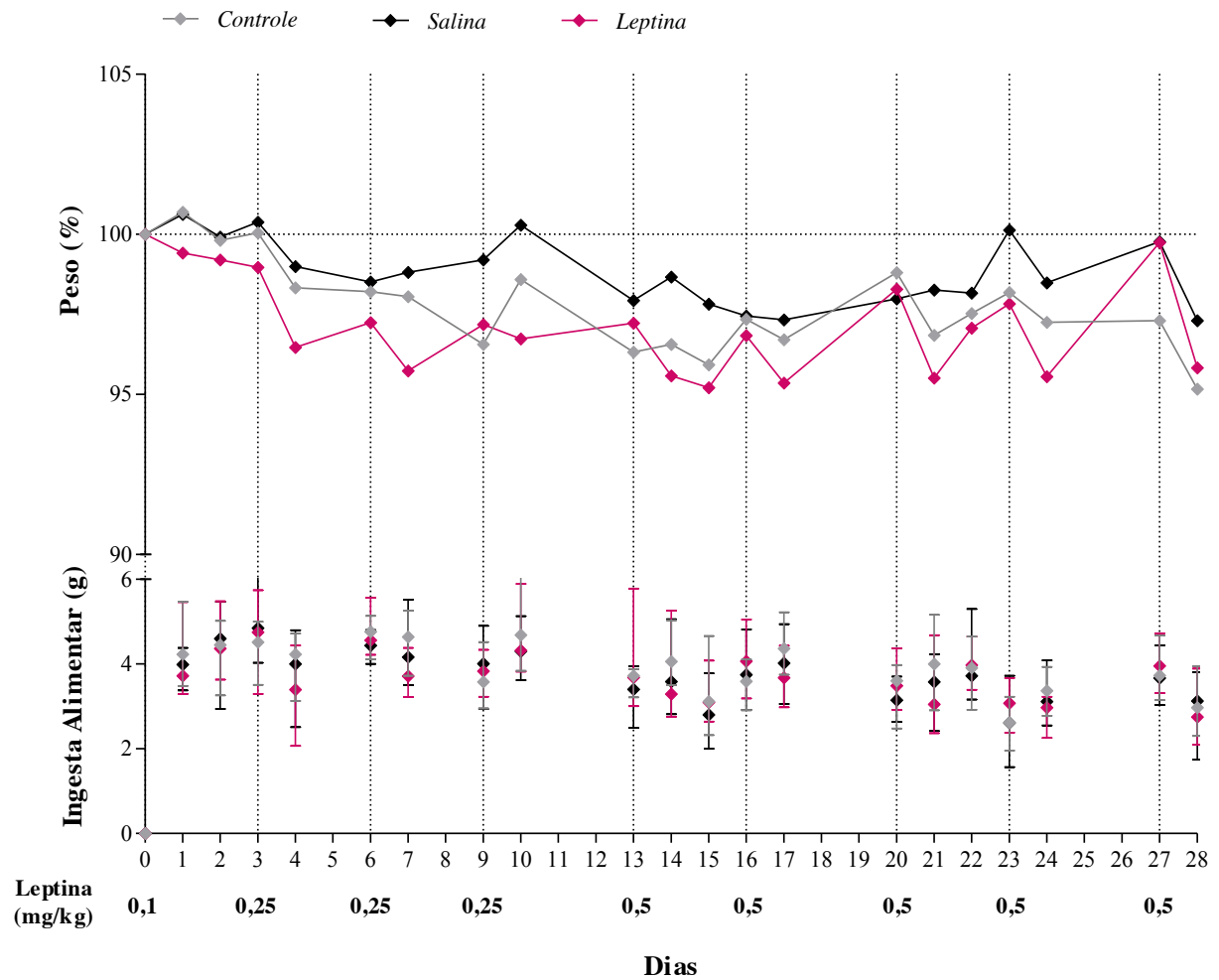


Figura 4.1. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de camundongos C57BL/6 estimulados com doses graduais de leptina. Foram empregados 10 animais por grupo, mantendo 1 animal por caixa, os animais receberam injeções intraperitoniais de leptina (♦) ou solução salina estéril (◆), além da manutenção de grupo não estimulado (◇). Linhas verticais pontilhadas indicam o dia da injeção, sendo administradas as seguintes concentrações de leptina. Dia 0: 0,1 mg/kg; Dias 3, 6 e 9: 0,25 mg/kg; Dias 13, 16, 20, 23 e 27: 0,5 mg/kg. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 30 dias. Dados apresentados no gráfico representam a mediana ± SEM 10 animais.

Após estabelecida a melhor condição para a manutenção dos animais durante realização dos experimentos, os camundongos foram submetidos a diferentes esquemas de tratamento, sendo empregadas doses de 1 e 2 mg/kg de leptina, os quais foram administrados em diferentes intervalos e vias de administração. Com intuito de verificar se tais modificações poderiam de algum modo induzir um quadro de hiporresponsividade hipotalâmica, peso e ingestão alimentar dos animais foram acompanhados ao longo de cada experimento, sendo observada uma tendência ao emagrecimento nos animais estimulados com leptina, o que parece ocorrer de modo dependente do intervalo de administração seguido.

De modo a proporcionar uma melhor visualização dos efeitos de leptina sobre a ingestão alimentar dos animais foram considerados o percentual de alimento ingerido em relação ao dia anterior da injeção, conforme pode ser observado nas figuras 4.2 a 4.6.

A fim de verificar se diferentes intervalos entre as administrações poderiam promover uma resposta diferenciada sobre parâmetros fisiológicos (peso e ingestão alimentar), foram realizadas variações nos intervalos de injeção de forma a dar maior intervalo no início (Figura 4.2) ou no final do estímulo (Figura 4.3). Fizemos ainda duplicata experimental com intervalos regulares utilizando o estímulo com o dobro da dosagem de leptina (2 mg/kg) (Figuras 4.4-4.5), em que podemos observar de forma consistente que não houveram alterações significativas sobre o peso e ingestão alimentar dos animais. Este resultado é surpreendente, uma vez que o esperado com base em dados da literatura, era de que houvesse uma redução importante destes parâmetros.

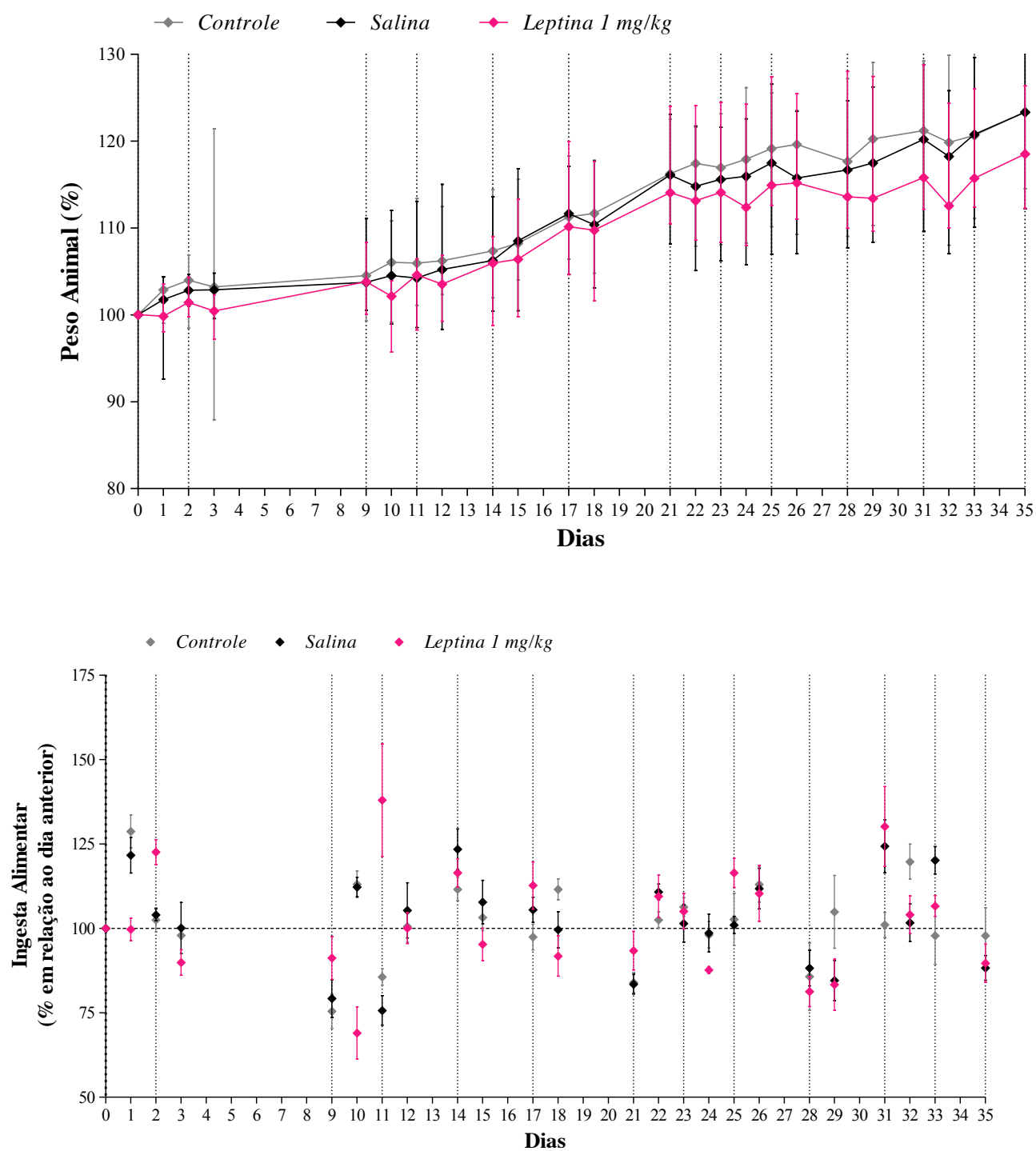


Figura 4.2. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar dos animais estimulados com 1 mg/kg de leptina. Foram empregados 12 animais por grupo, mantendo 3 animais por caixa, os animais pertencentes ao grupo não estimulado cronicamente estão representados por \blacklozenge . O grupo de animais que recebeu injeções de leptina intraperitoneal está representado por \blacklozenge , como controle administrou-se solução salina estéril (\blacklozenge). As linhas verticais pontilhadas representam o dia da administração de leptina ou salina no grupo correspondente. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 35 dias. Dados apresentados nos gráficos correspondem à mediana \pm SEM de 12 animais, sendo os desvios representados pelas barras verticais nas cores referentes a cada grupo.

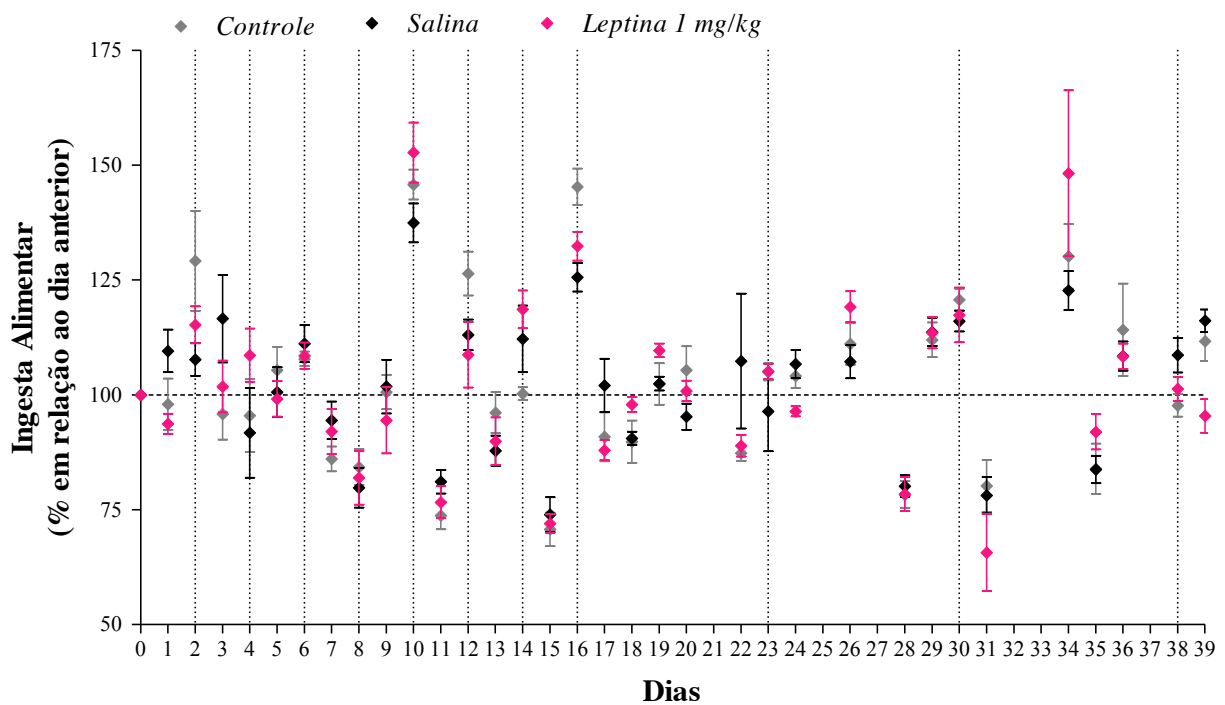
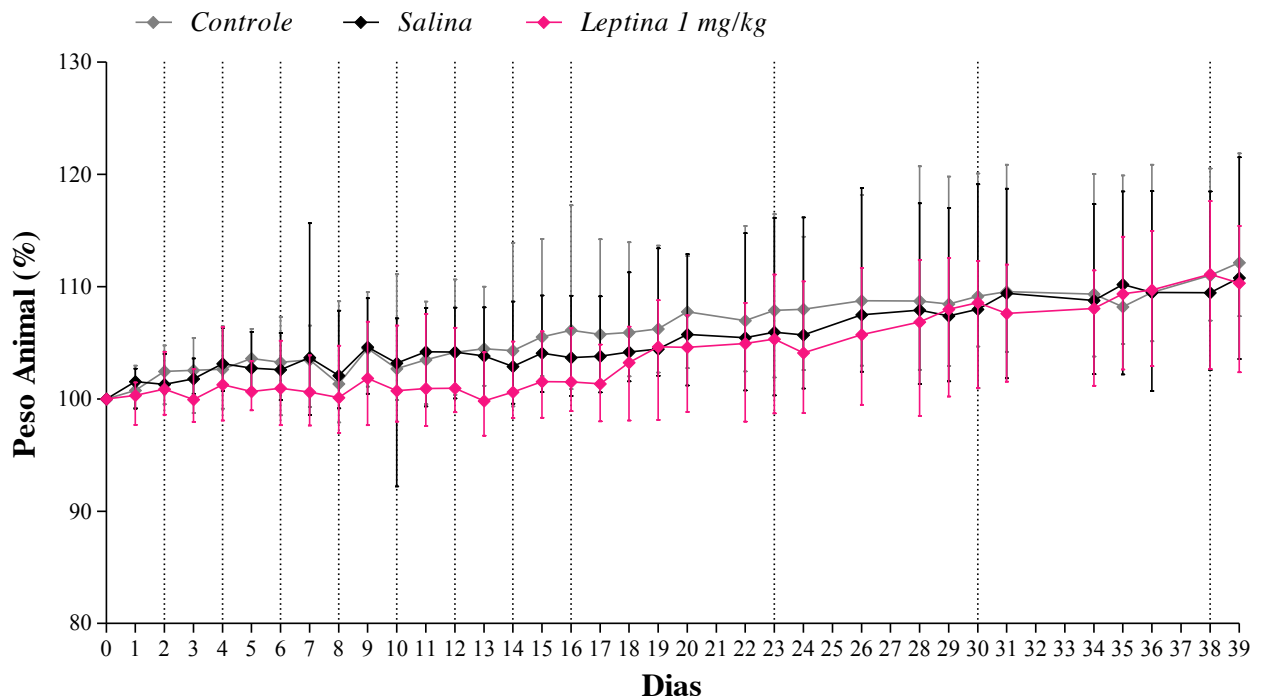


Figura 4.3. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar dos animais estimulados cronicamente com 1 mg/kg de leptina. Foram empregados 12 animais no grupo controle e 14 animais nos grupos salina e leptina, mantendo 3 animais por caixa, os animais pertencentes ao grupo não estimulado cronicamente estão representados por \blacklozenge . O grupo de animais que recebeu injeções de leptina intraperitoneal está representado por \blacklozenge , como controle administrava-se solução salina estéril (\blacklozenge). As linhas verticais pontilhadas representam o dia da administração de leptina ou salina no grupo correspondente. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 39 dias. Dados representados no gráfico referem-se à mediana dos animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

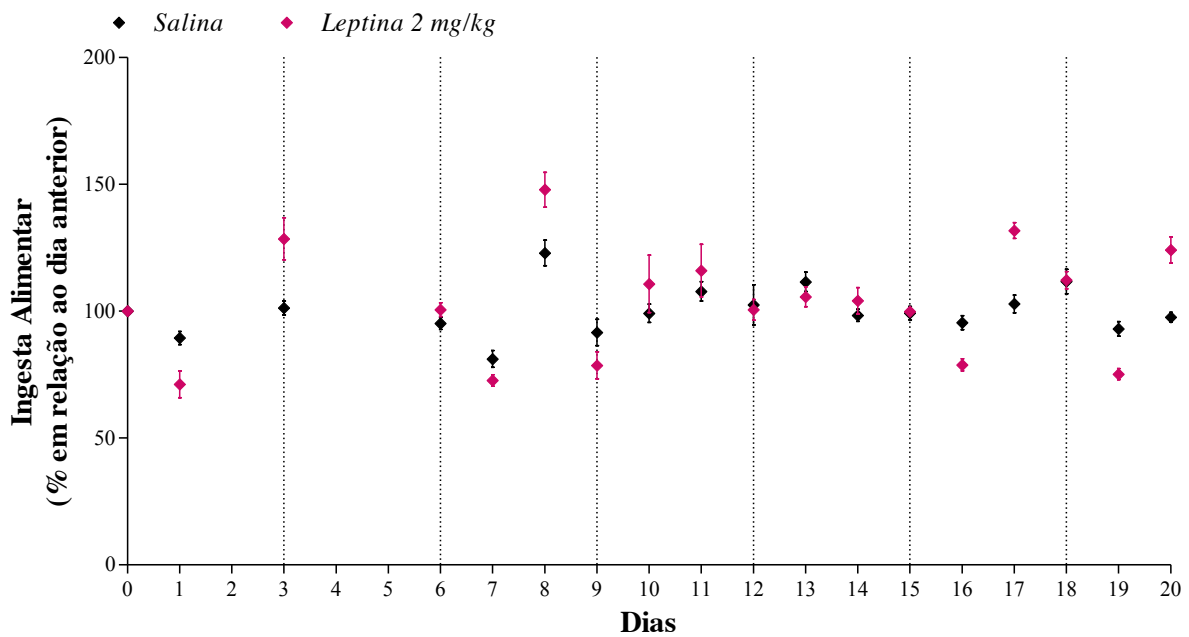
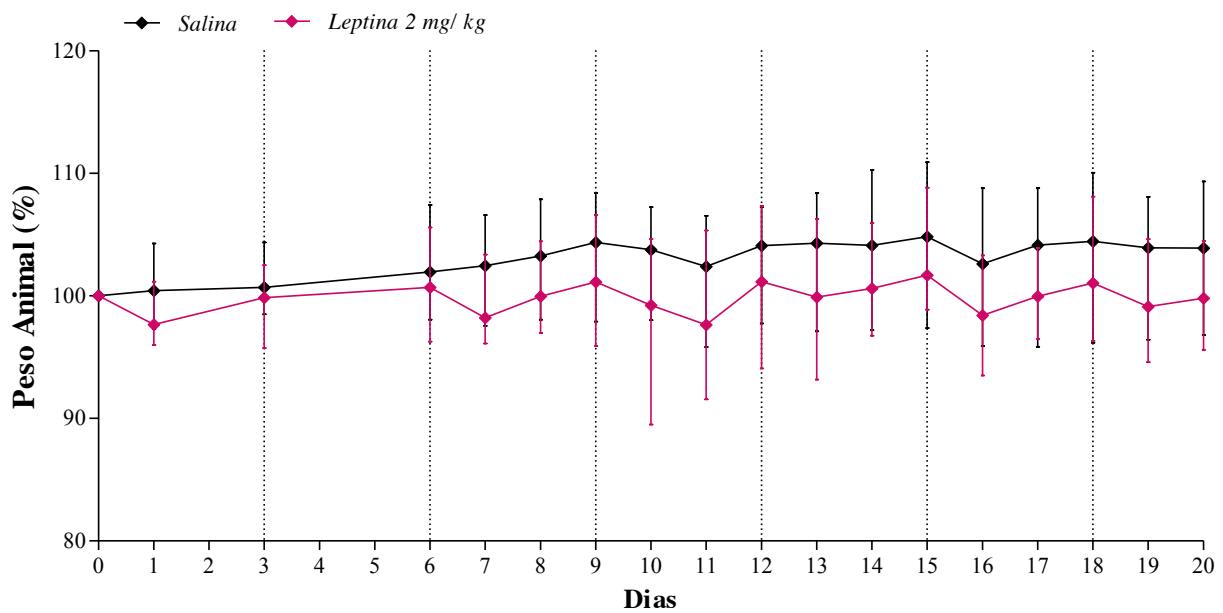


Figura 4.4. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar dos animais de animais estimulados com 2 mg/kg de leptina. Foram empregados 16 animais no grupo salina e 17 animais no grupo leptina, mantendo 3 animais por caixa. O grupo de animais que recebeu injeções de leptina intraperitoneal está representado por \blacklozenge , como controle administrava-se solução salina estéril (\blacklozenge). As linhas verticais pontilhadas representam o dia da administração de leptina ou salina no grupo correspondente. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 20 dias. Dados representados no gráfico referem-se à mediana dos animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

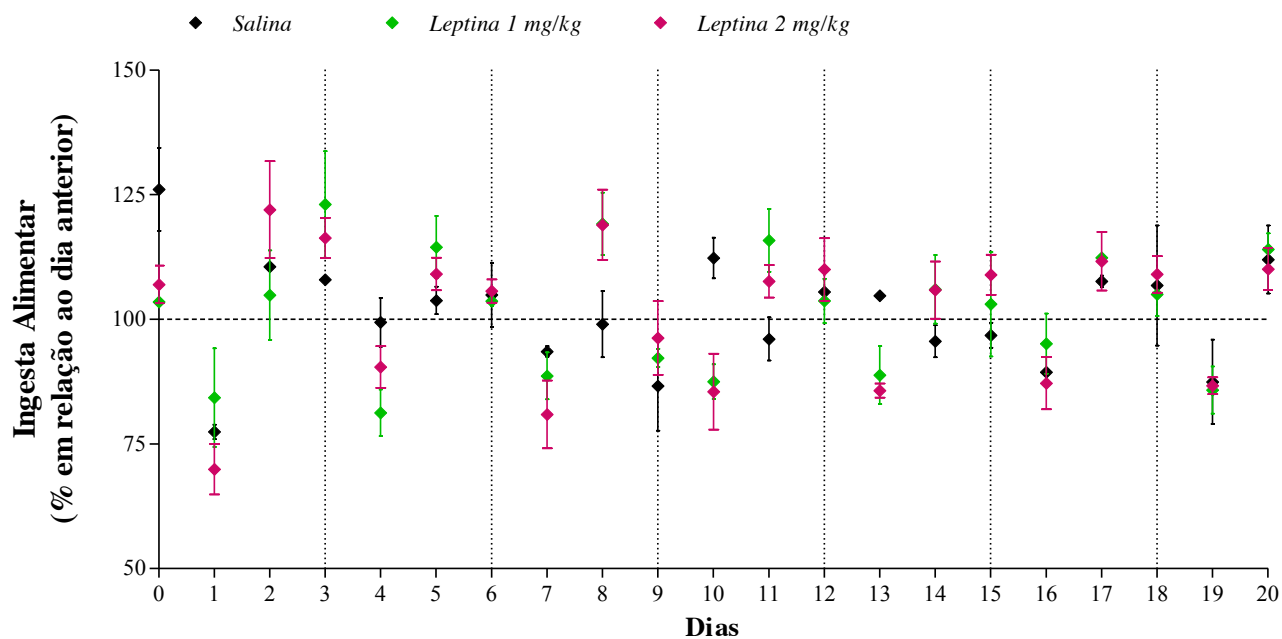
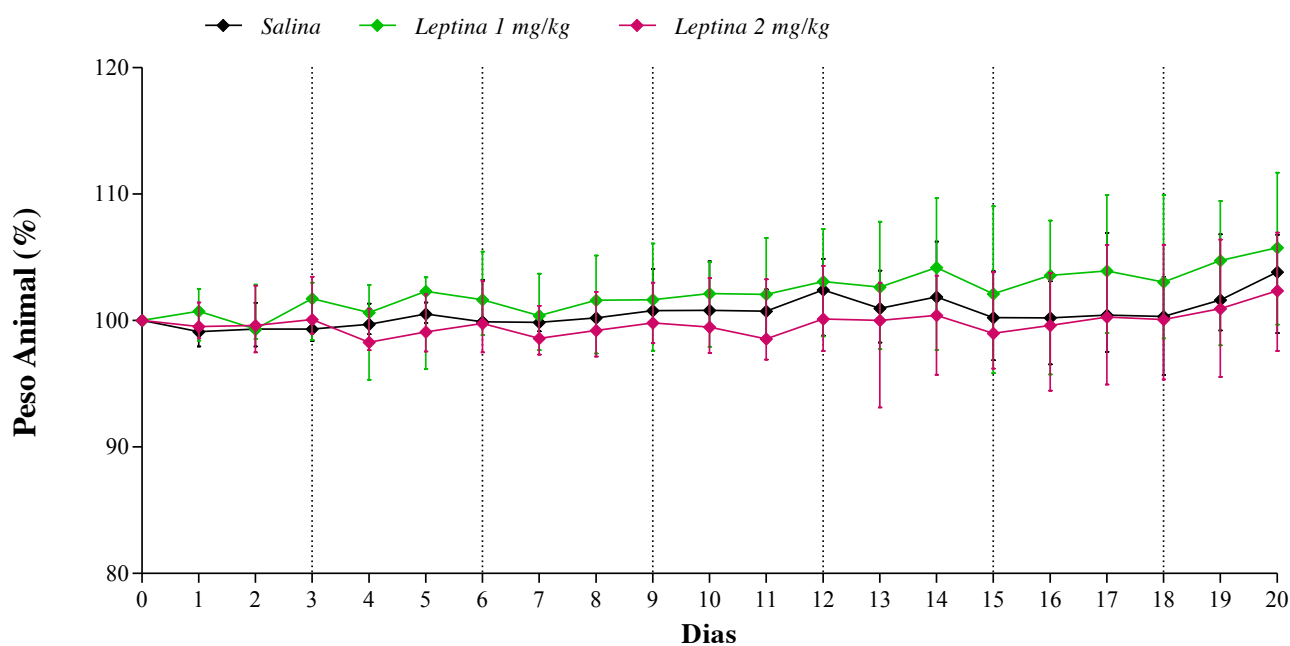


Figura 4.5. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar de animais estimulados com 1 e 2 mg/kg de leptina. Foram empregados 5 animais no grupo salina, 7 animais no grupo leptina 1 mg/kg e 8 animais no grupo leptina 2 mg/kg, mantendo 3-2 animais por caixa. O grupo de animais que recebeu injeções de leptina intraperitoneal 2 mg/kg está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina está representado por \blacklozenge , como controle administrou-se solução salina estéril (\blacklozenge). As linhas verticais pontilhadas representam o dia da administração de leptina ou salina no grupo correspondente. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 20 dias. Dados representados no gráfico referem-se à mediana dos animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

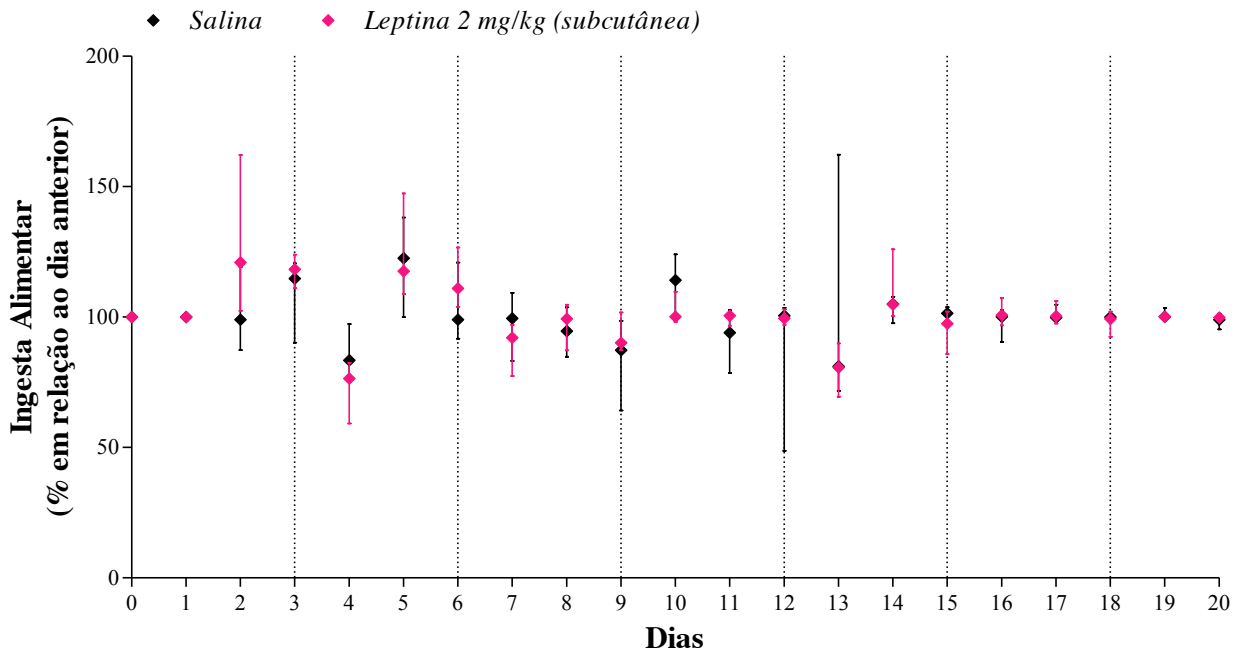
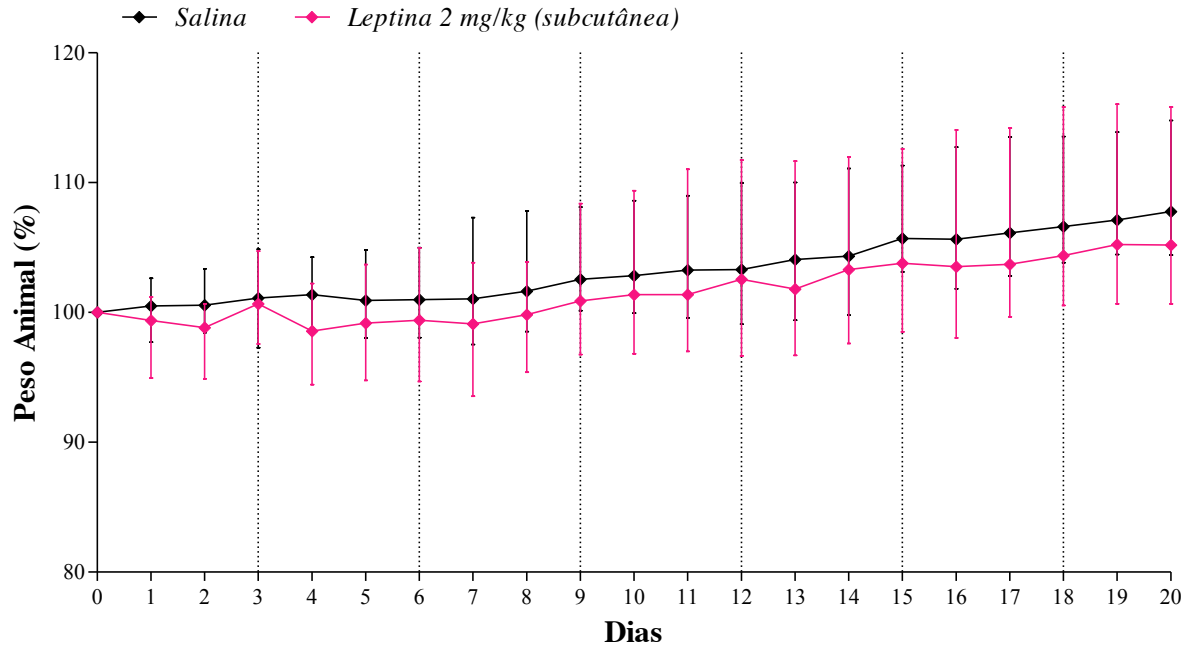


Figura 4.6. Acompanhamento de peso e ingesta alimentar dos animais estimulados com 2 mg/kg de leptina subcutânea. Foram empregados 20 animais por grupo, mantendo 2-3 animais por caixa. O grupo de animais que recebeu injeções de leptina pela via subcutânea está representado por \blacklozenge , como controle administraram-se solução salina estéril (\blacklozenge). As linhas verticais pontilhadas representam o dia da administração de leptina ou salina no grupo correspondente. Todos os animais foram acompanhados ao longo de 20 dias. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 20 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

4.2. Influência do estímulo crônico com leptina sobre glicemia

Com intuito de avaliar se o estímulo crônico com leptina poderia induzir alterações no metabolismo de glicose, após a última administração intraperitoneal da adipocina, os animais foram previamente mantidos em jejum e posteriormente submetidos à dosagem de glicemia. Não foram observadas alterações neste parâmetro quando administrou-se leptina na concentração de 1 mg/kg, independente do número de administrações realizadas ou do esquema de tratamento empregado (Figura 4.7).

Ao contrário dos dados encontrados quando leptina foi administrada na concentração de 1 mg/kg, uma redução de aproximadamente 30 % nos índices plasmáticos de glicose foi observada ao realizarmos a administração da adipocina na concentração de 2 mg/kg. Estes resultados sugerem uma participação de leptina sobre a modulação da via de insulina de maneira dose-dependente (Figura 4.7C). Além disso, a modulação dos índices glicêmicos promovida pela leptina parece ocorrer independente da via de administração utilizada, uma vez que também observou-se redução nos índices glicêmicos de animais estimulados cronicamente com leptina a 2 mg/kg administrada pela via subcutânea (Figura 4.7D).

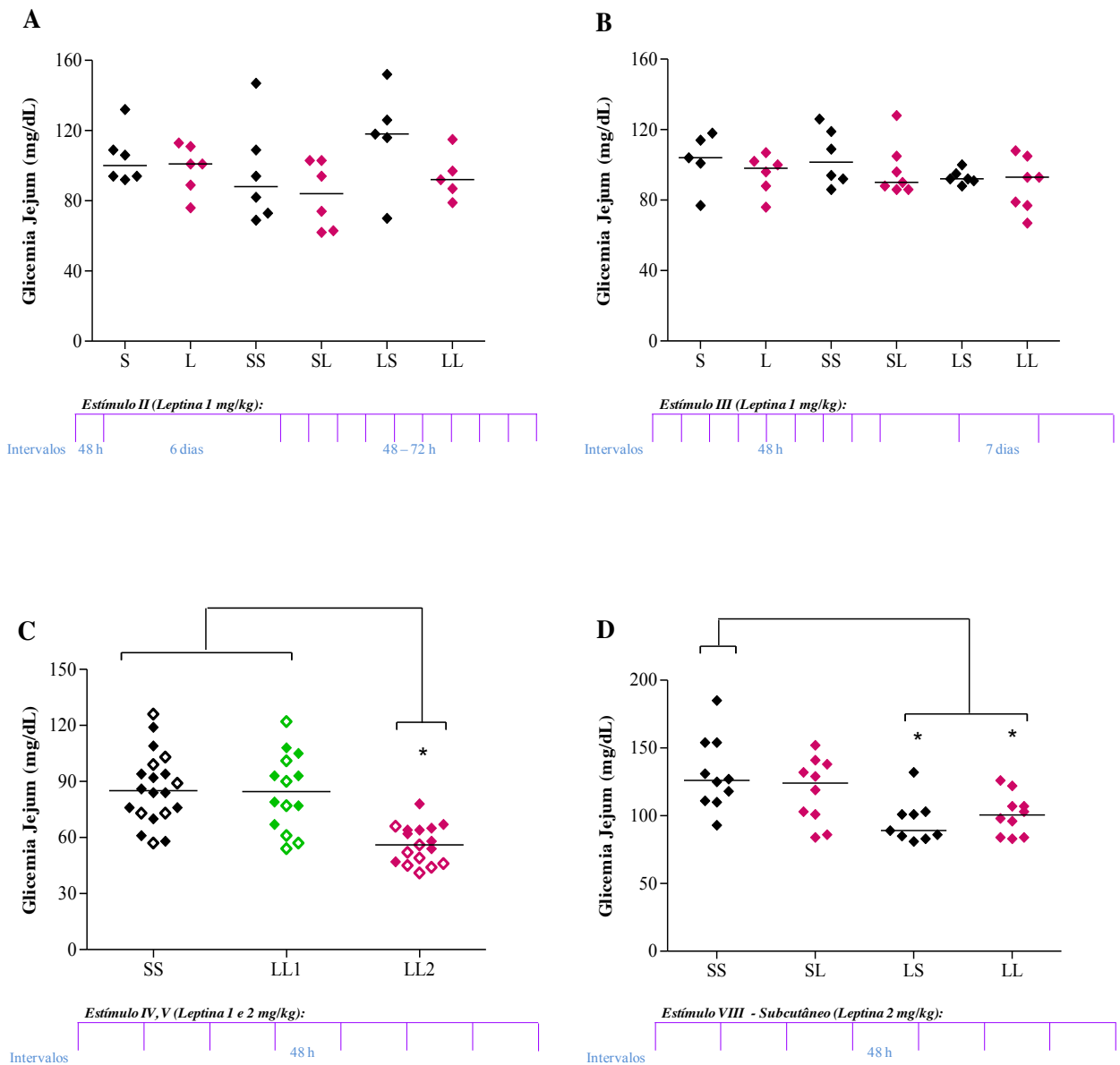


Figura 4.7. Dosagem de glicemia após 30 horas de jejum. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge ou \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico II. **B:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico III. **C:** Administração intraperitoneal crônica de leptina 1 mg/kg (\blacklozenge) e 2 mg/kg (\blacklozenge). Como controle administrou-se solução salina estéril e apirogênica (\blacklozenge), os dados contidos no gráfico referem-se a dois experimentos independentes. **D:** Efeitos da administração subcutânea recorrente de leptina a 2 mg/kg. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

4.3. Efeitos da administração crônica de leptina sobre a migração de leucócitos para cavidade peritoneal

As análises de microscopia realizadas para verificação da população de leucócitos presentes na cavidade peritoneal nos permitiu observar que a administração crônica de leptina pela via intraperitoneal, na concentração de 1 mg/kg, foi capaz de induzir um aumento na população leucocitária independente do intervalo realizado entre as injeções ou do reestímulo empregado nas 24 horas que antecederam a eutanásia dos animais, conforme pode ser observado nas figuras 4.8A-B.

Os efeitos promovidos pela leptina sobre estas células parecem ocorrer de maneira independente da concentração administrada. A figura 4.8C revela que tanto a administração de 1 ou 2 mg/kg de leptina induzem um aumento na migração de leucócitos para cavidade peritoneal em relação à animais não estimulados com a adipocina, sem, entretanto, ser observado um efeito mais pronunciado sobre este parâmetro quando o dobro da dosagem foi administrada.

No entanto, quando a administração crônica de leptina foi realizada através da via subcutânea, torna-se evidente a necessidade do reestímulo com leptina para que o aumento de leucócitos seja observado (Figura 4.8D), este dado é suportado pelo fato de que somente a última administração do hormônio foi realizada pela via intraperitoneal, não havendo, desta forma, um estímulo recorrente na cavidade peritoneal que justificasse a migração de leucócitos para esta região nos demais grupos.

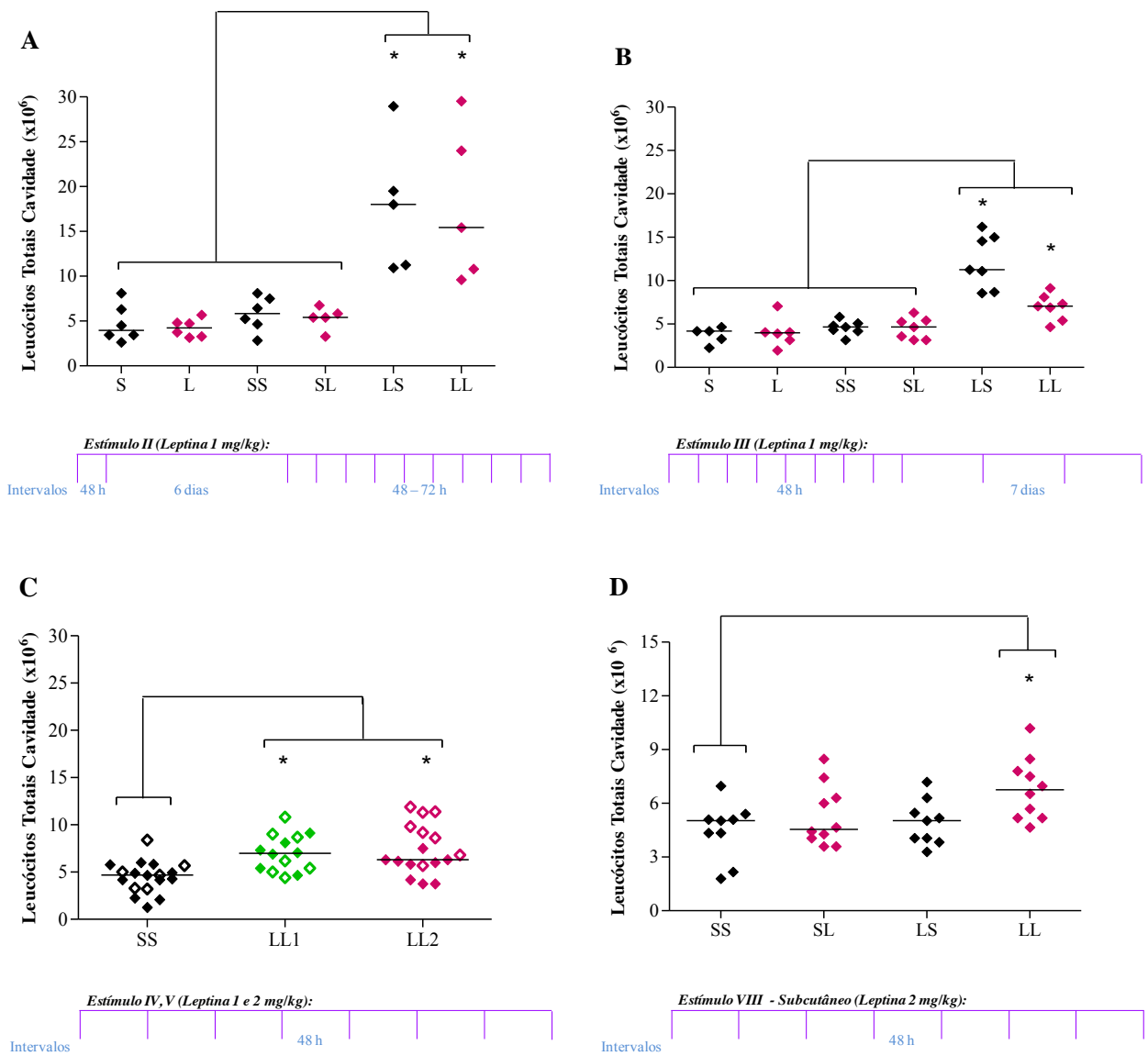


Figura 4.8. Contagem de leucócitos totais de lavado peritoneal. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge ou \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** Animais submetidos ao estímulo crônico II (1 mg/kg). **B:** Animais submetidos ao estímulo crônico III (1 mg/kg). **C:** Administração intraperitoneal crônica de leptina 1 mg/kg – LL1 ($\blacklozenge/\blacklozenge$) e 2 mg/kg – LL2 ($\blacklozenge/\blacklozenge$). Como controle administrou-se solução salina estéril e apirogênica ($\blacklozenge/\blacklozenge$). **D:** Efeitos da administração subcutânea recorrente de leptina a 2 mg/kg. Os dados contidos no gráfico “C” referem-se a dois experimentos independentes. Referindo-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

Ao avaliar os efeitos de leptina sobre a migração dos diferentes tipos leucocitários para a cavidade peritoneal foi possível observar que administração crônica de leptina por via intraperitoneal induziu o aumento no número de células mononucleares e eosinófilos independente do intervalo realizado entre as injeções e do reestímulo empregado, conforme pode ser observado na figura 4.9.

Assim como observado nos experimentos realizados com o emprego de leptina na concentração de 1 mg/kg, a administração recorrente de 2 mg/kg da adipocina também mostrou-se capaz de promover a migração de células mononucleares e eosinófilos para cavidade peritoneal (Figura 4.10). De maneira interessante, a concentração mais elevada também se mostrou capaz de induzir a migração de neutrófilos para o sítio de administração de leptina, o que não foi visto na administração de 1 mg/kg, indicando que doses mais elevadas de leptina fazem-se necessárias para indução direta ou indireta da resposta e ativação deste tipo leucocitário.

Com intuito de analisar se os efeitos observados sobre o sistema imune em resposta à administração recorrente de leptina poderiam ser dependentes do elevado número de administrações realizadas, os animais foram submetidos a duas administrações de leptina realizando um intervalo de 72 horas entre cada administração. Tal modelo experimental revelou que o emprego de duas administrações de leptina a 1mg/kg foram capazes de induzir o aumento na população de eosinófilos na cavidade peritoneal (Figura 4.11).

Uma vez encontrada tal diferença na população de eosinófilos em animais submetidos a duas administrações da adipocina, o próximo passo foi verificar se estas alterações estariam de fato relacionadas ao reestímulo realizado ou se poderiam ser reflexo de algum efeito latente da promovido pela primeira administração de leptina. Sendo assim, uma única administração do hormônio foi realizada e a eutanásia dos animais ocorreu 24 ou 48 horas após a administração de leptina.

De maneira interessante, foi verificado que ao reduzir o estresse gerado pela manipulação dos animais é possível notar-se um aumento na população de neutrófilos na cavidade peritoneal, a qual não é observada 48 horas após a administração de leptina (Figura 4.12C). Este resultado sugere um possível término da migração desta população celular em resposta à leptina. Do mesmo modo, não foram observadas alterações na população de eosinófilos independente do intervalo realizado entre a administração de leptina e eutanásia dos animais (Figura 4.12D), indicando que os efeitos observados anteriormente ocorrem em resposta à readministração do hormônio e não de um efeito tardio em resposta à leptina.

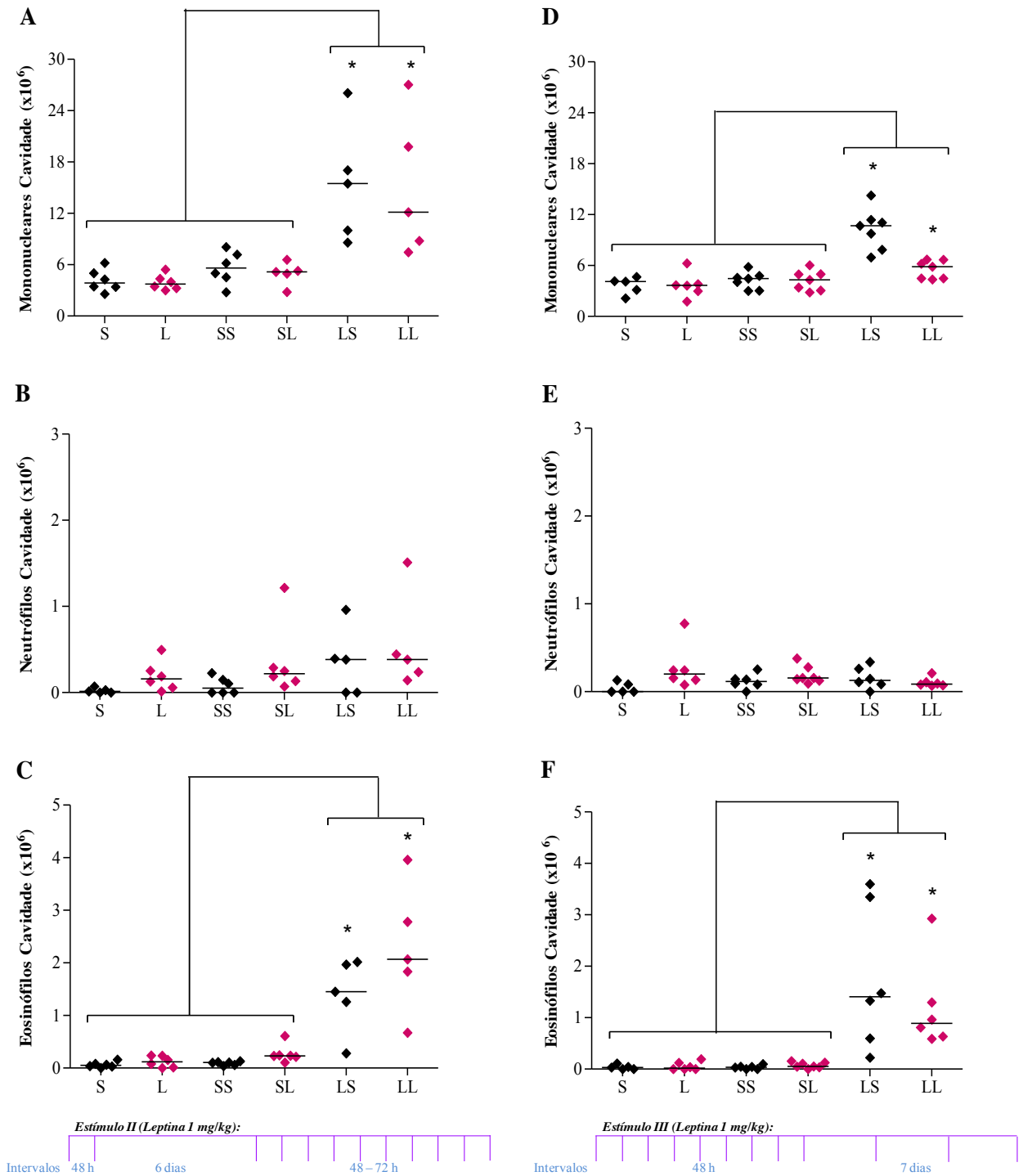


Figura 4.9. Contagem diferencial de leucócitos da cavidade peritoneal de animais estimulados com leptina 1 mg/kg. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A-C:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico II. **D-F:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico III. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-7 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação (*) corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes em relação aos demais grupos, sendo $p < 0,05$.

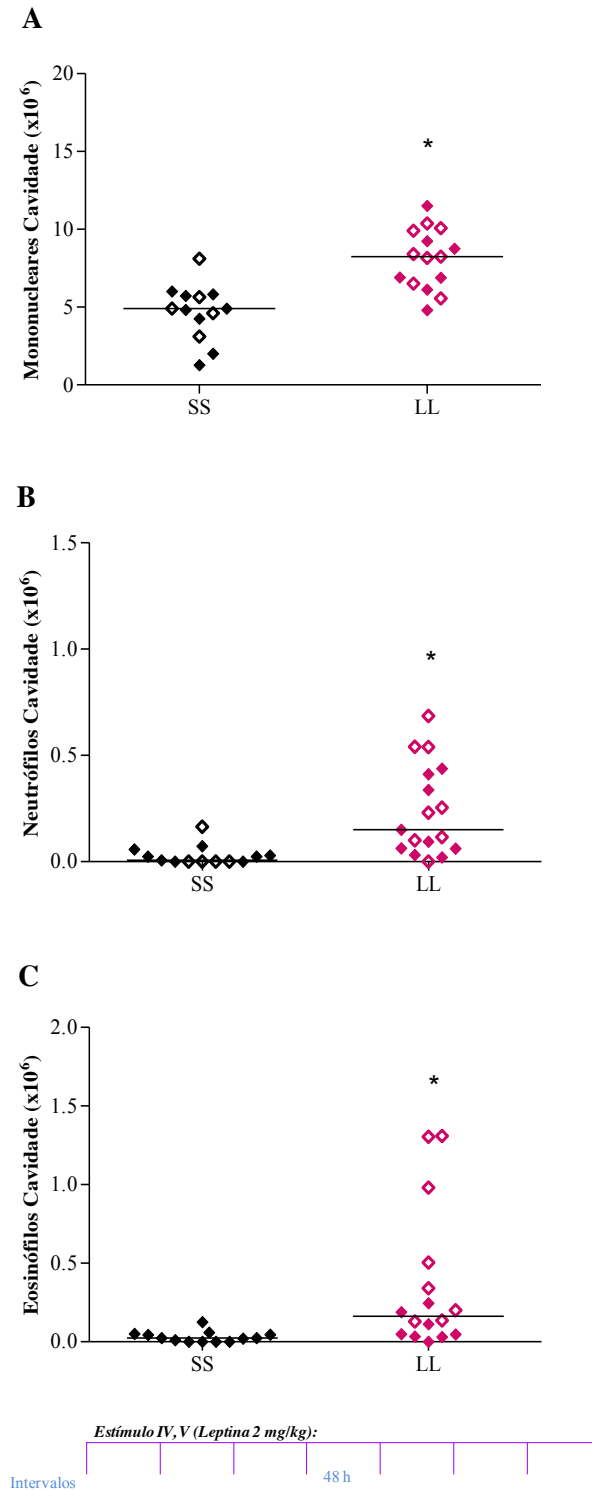


Figura 4.10. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com 2 mg/kg leptina intraperitoneal. O grupo de animais estimulado com leptina está representado por $\blacklozenge/\blacklozenge$. Como controle administrou-se solução salina estéril e apirogênica ($\blacklozenge/\blacklozenge$), os dados contidos no gráfico referem-se a dois experimentos independentes. **A** – Células mononucleares. **B** – Neutrófilos. **C** – Eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

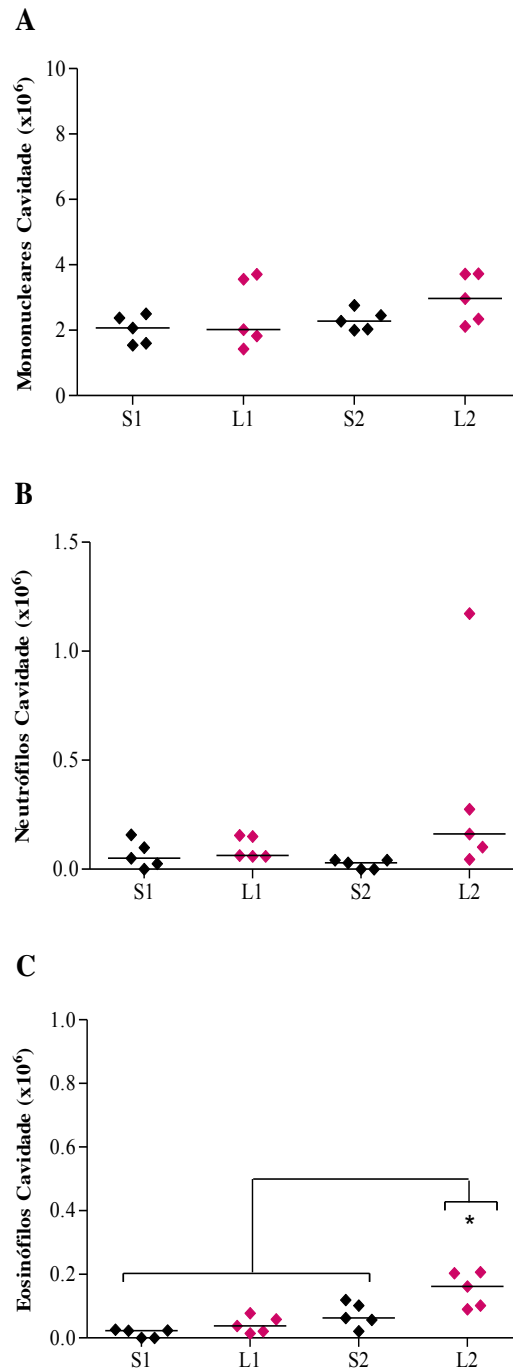


Figura 4.11. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com 1 mg/kg leptina intraperitoneal (estímulo VI). O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge . Como controle administrava-se solução salina estéril e apirogênica (\blacklozenge). **A** – Células mononucleares. **B** – Neutrófilos. **C** – Eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

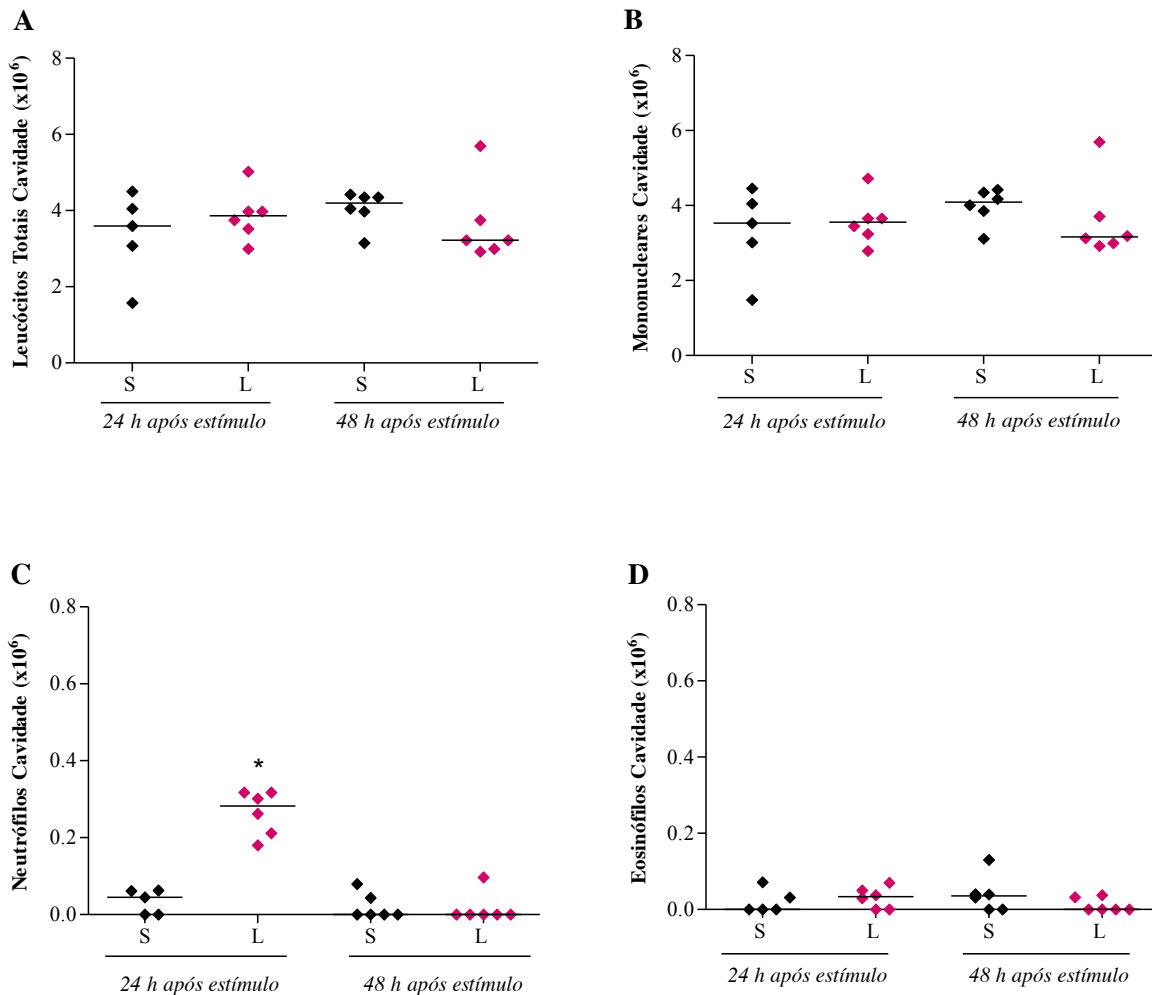


Figura 4.12. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com 1 mg/kg leptina intraperitoneal (estímulo VII). O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge . Como controle administrava-se solução salina estéril e aprotínica (\blacklozenge). **A** – Leucócitos totais. **B** – Células mononucleares. **C** – Neutrófilos. **D** – Eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-6 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

A administração crônica de leptina pela via subcutânea permitiu verificar que, ao contrário do encontrado quando injeções intraperitoneais recorrentes foram realizadas, a migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal não é afetada pela presença de leptina (Figura 4.13A).

O estímulo crônico pela via subcutânea também não induziu alterações na população de neutrófilos (Figura 4.13B), indicando que não somente a concentração de leptina é importante para a migração destas células, mas que a via de administração pode promover um impacto importante no que se refere à resposta de neutrófilos frente a sinalização mediada por leptina.

Contudo, os dados apresentados na figura 4.13C mostram que os efeitos da administração crônica de leptina sobre a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal ocorre de maneira independente da via de administração crônica utilizada, visto pela elevada presença deste tipo celular na cavidade peritoneal quando uma injeção intraperitoneal de leptina a 2 mg/kg é realizada.

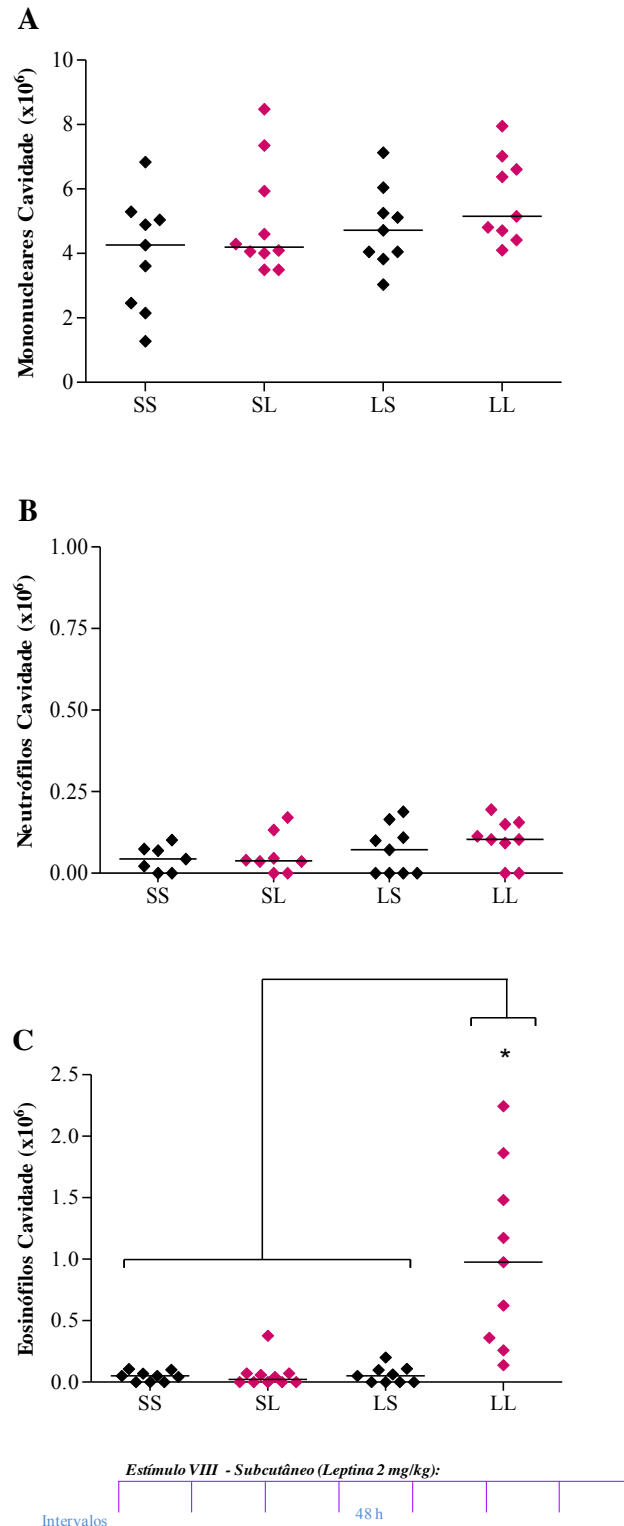


Figura 4.13. Contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com 2 mg/kg leptina pela via subcutânea. O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge . Como controle administrava-se solução salina estéril e apirogênica (\blacklozenge). **A** – Células mononucleares. **B** – Neutrófilos. **C** – Eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

4.4. Efeitos da administração crônica de leptina sobre a população de leucócitos circulantes

Com intuito de verificar o impacto da administração recorrente de leptina sobre leucócitos presentes na circulação sanguínea, foram avaliados se os diferentes esquemas de tratamento e vias de administração poderiam promover alterações no número absoluto de leucócitos nessa região.

Interessantemente, foi observado que a realização de intervalos maiores em etapas iniciais do estímulo não são capazes de induzir alterações no número de leucócitos totais presentes no sangue (Figura 4.14A). No entanto, quando intervalo similar é realizado em etapas mais tardias do tratamento, animais não reestimulados com leptina nas 24 horas que antecederam a eutanásia apresentam aumento no número absoluto de leucócitos circulantes (Figura 4.14B), mostrando que os intervalos de administração são fundamentais para a resposta dessas células frente a sinalização mediada pela leptina.

Afim de verificar se a administração de doses mais elevadas leptina apresentariam efeitos mais pronunciados aos observados, foi realizada a administração intraperitoneal de leptina a 2 mg/kg. Este tratamento revelou que embora o dobro da dosagem tenha sido empregada o aumento de leucócitos circulantes não ocorre de modo proporcional à dose administrada (Figura 4.14C).

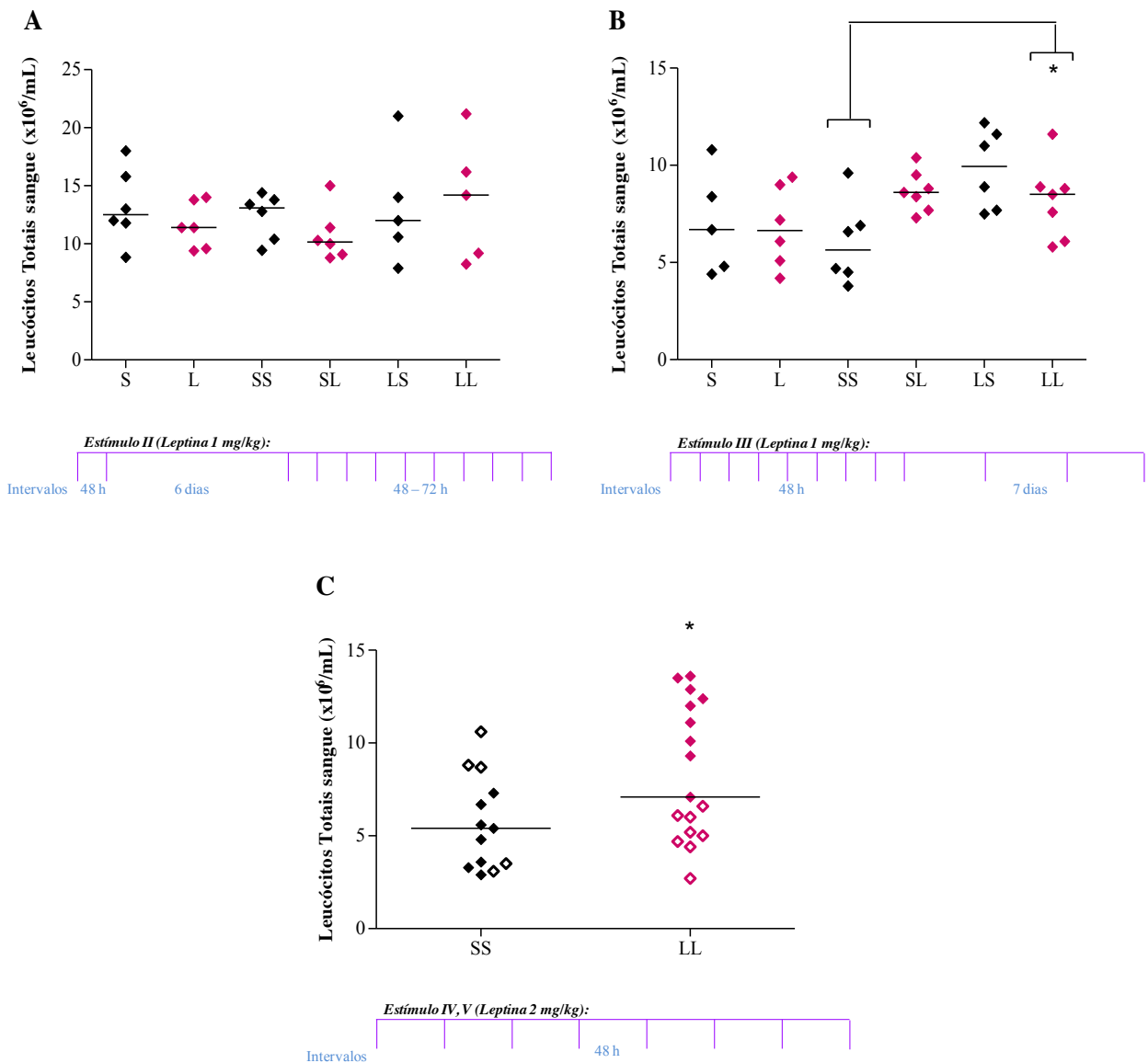


Figura 4.14. Contagem de leucócitos totais circulantes. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** Animais submetidos ao estímulo II (1 mg/kg). **B:** Animais submetidos ao estímulo III (1mg/kg). **C:** Administração intraperitoneal crônica de leptina 2 mg/kg ($\blacklozenge/\blacklozenge$). Como controle administrou-se solução salina estéril e aprotinina ($\blacklozenge/\blacklozenge$), os dados contidos no gráfico referem-se a dois experimentos independentes. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

Ao realizarmos o estímulo com a mesma concentração de leptina (2 mg/kg) por outra via de administração (subcutânea), as alterações observadas tornaram-se ainda mais evidentes, sendo observada uma elevação no número de leucócitos totais independente do reestímulo empregado, e uma distribuição mais homogênea dos efeitos observados dentro de um mesmo grupo (Figura 4.15).

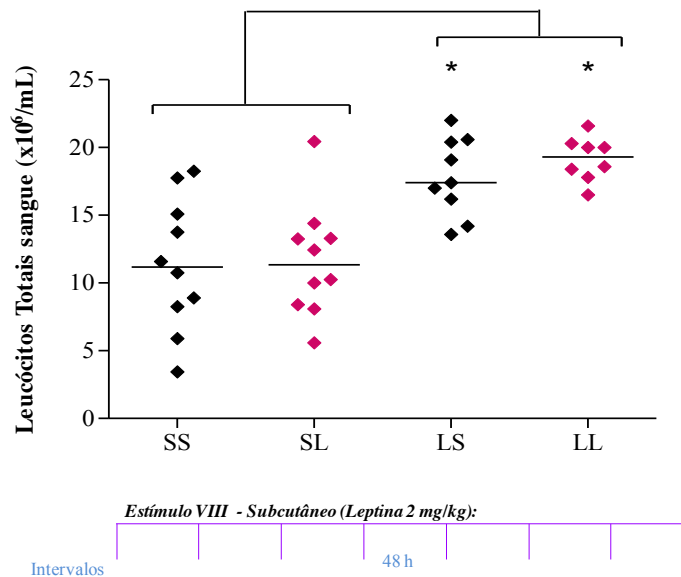


Figura 4.15. Efeitos da administração recorrente subcutânea de leptina a 2 mg/kg sobre a contagem de leucócitos totais circulantes. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

Tendo em vista os efeitos da leptina sobre ativação de células imunes, e sua capacidade em promover o aumento no número de leucócitos totais presentes na circulação sanguínea, o próximo passo foi avaliar sua influência sobre diferentes populações destas células. Nós verificamos que embora diferenças tenham sido encontradas em relação ao número total de leucócitos quando um espaçamento maior no intervalo entre as injeções intraperitoneais em etapas mais tardias do tratamento foi realizado, o mesmo não foi observado ao avaliarmos as populações leucocitárias individualmente com o emprego do estímulo crônico com 1 mg/kg de leptina, conforme apresentado na Figura 4.16.

Contudo, ao avaliarmos os efeitos da administração intraperitoneal recorrente de leptina a 2 mg/kg foi observada uma elevação no número absoluto de células mononucleares e neutrófilos em animais reestimulados com leptina (Figura 4.17). No entanto, animais estimulados cronicamente com leptina e submetidos a uma administração de solução salina não apresentaram tal elevação na população de leucócitos, indicando que a modulação exercida sobre a população leucocitária presente na corrente sanguínea ocorre de maneira dependente do reestímulo, sendo os níveis basais de leucócitos restaurados quando períodos superiores a 24 horas da administração de leptina são realizados.

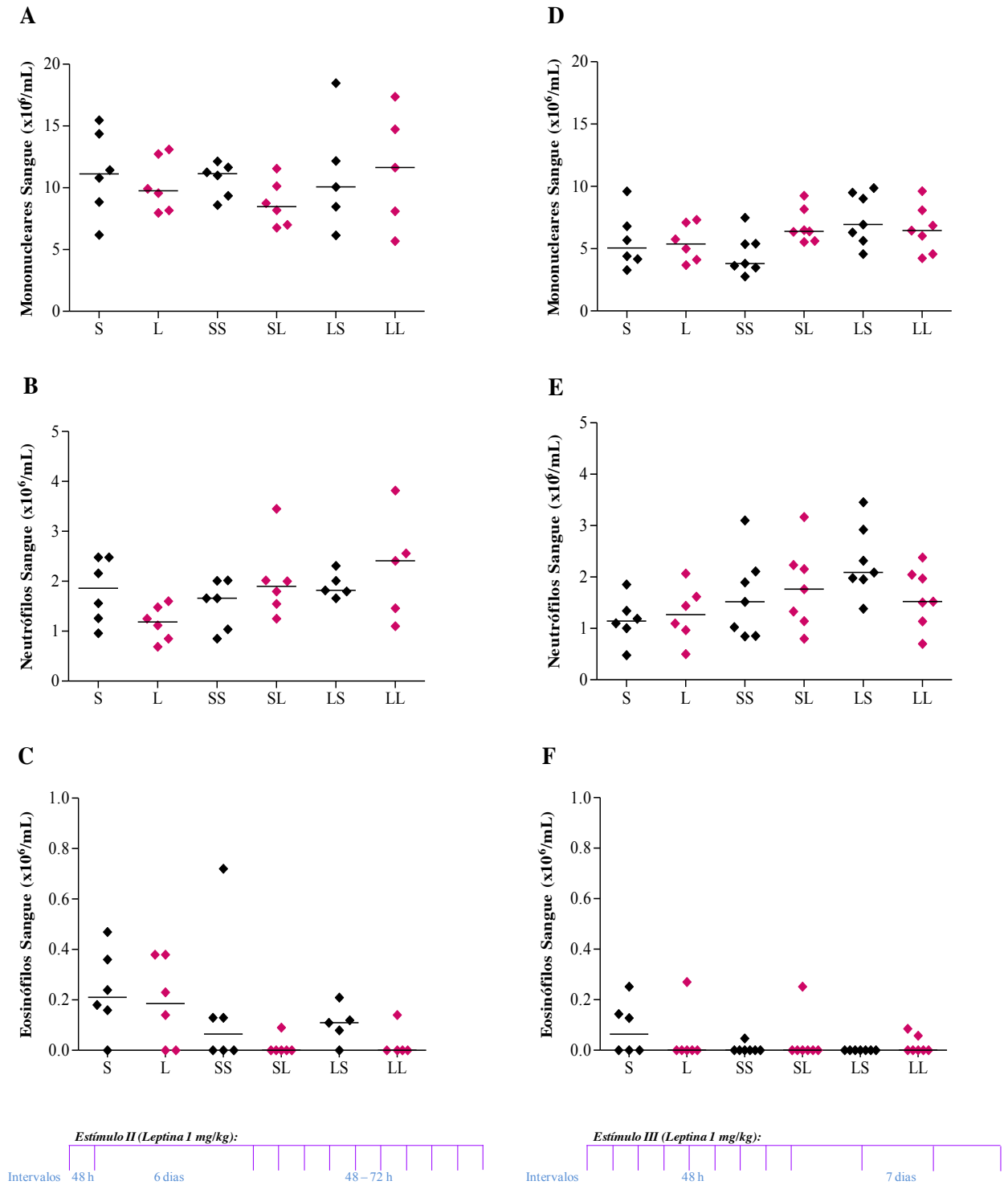


Figura 4.16. Contagem diferencial de leucócitos circulantes em animais estimulados com leptina 1 mg/kg pela via intraperitoneal. O grupo de animais estimulados cronicamente com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A-C:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico II. **D-F:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico III. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-7 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

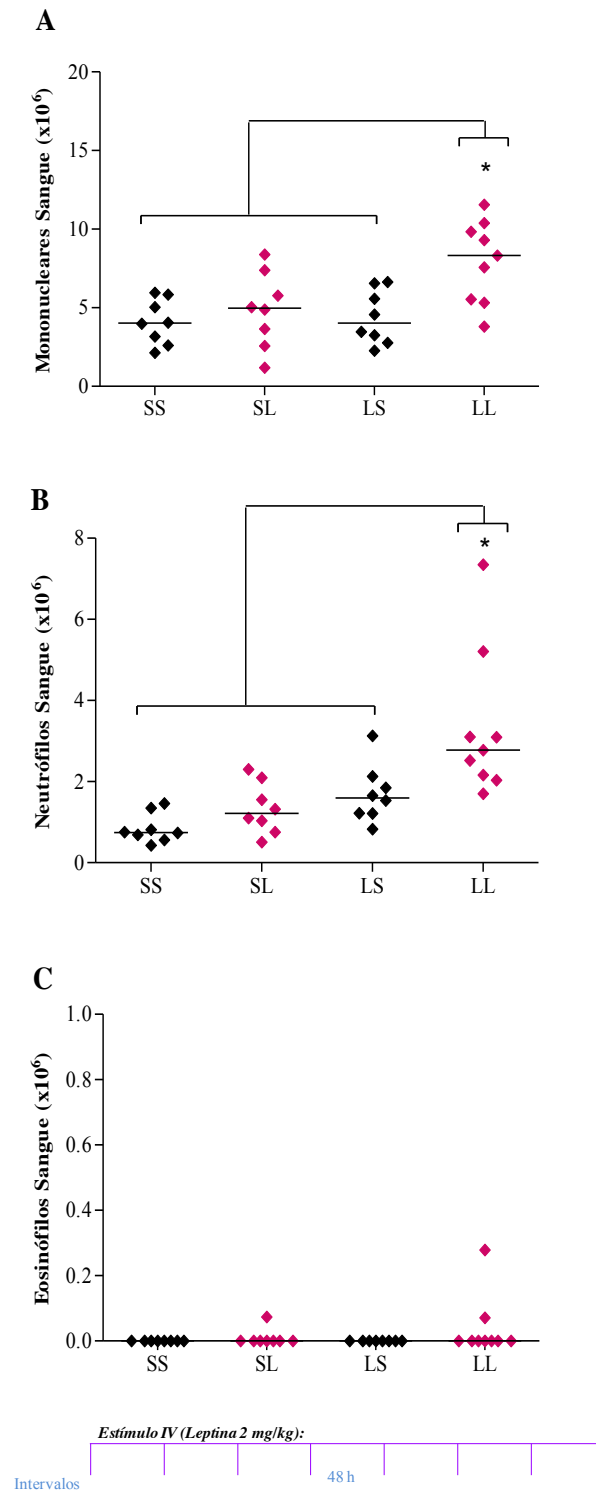


Figura 4.17. Contagem diferencial de leucócitos circulantes em animais estimulados com leptina 2 mg/kg pela via intraperitoneal. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** População de células mononucleares. **B:** População de neutrófilos. **C:** População de eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 8 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação (*) corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

A administração de leptina a 2 mg/kg pela via subcutânea revelou um aumento no número de células mononucleares circulantes em resposta ao estímulo crônico (Figura 4.18A), que, ao contrário dos efeitos observados quando o estímulo foi realizado somente pela via intraperitoneal, ocorreu de maneira independente ao estímulo empregado nas 24 horas que antecederam a eutanásia dos animais. Além disso, não foram verificadas alterações sobre a população de neutrófilos circulantes (Figura 4.18B). Isto indica uma importante participação da via de administração e os efeitos de leptina sobre a população de neutrófilos, a qual não parece atuar como um fator limitante sobre a população de eosinófilos, uma vez que a população circulante deste tipo leucocitário não sofreu alterações independente do esquema de tratamento, concentração ou via de administração utilizada (Figura 4.18C).

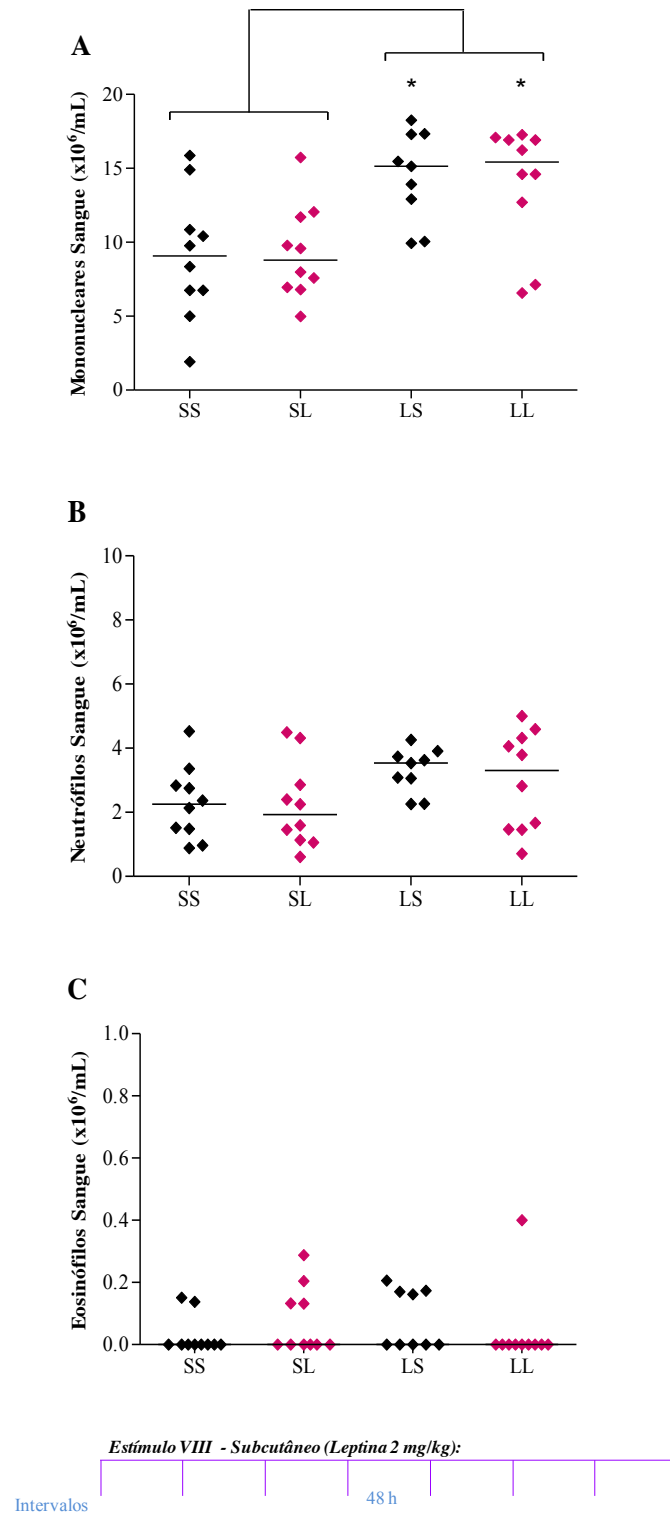


Figura 4.18. Contagem diferencial de leucócitos circulantes em animais estimulados pela via subcutânea com leptina 2 mg/kg. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulados com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** População de células mononucleares. **B:** População de neutrófilos. **C:** População de eosinófilos. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação (*) corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

4.5. Efeitos do estímulo crônico com leptina sobre a população leucocitária de órgãos imunes primários e secundários

Para avaliar se alterações encontradas na cavidade peritoneal poderiam ser provenientes de mudanças no perfil de celularidade presente na medula óssea, a contagem do número total de células foi realizada, seguida da diferenciação dos tipos celulares presentes nesta região. Contudo, alterações no número total de leucócitos ou em tipos leucocitários específicos presentes nesse sítio não foram observadas, independente do espaçamento empregado entre as injeções de leptina, conforme pode ser observado na figura 4.19.

Por se tratar de uma adipocina com ações pleiotrópicas, a verificação dos efeitos de leptina sobre baço e linfonodos também foi realizada, não sendo observada nenhuma alteração no que diz respeito ao número total de células presentes nestes órgãos (Figura 4.20). Contudo, um estudo mais aprofundado se faz necessário para avaliação de demais efeitos que possam ser desencadeados pela administração crônica de leptina em órgãos imunes.

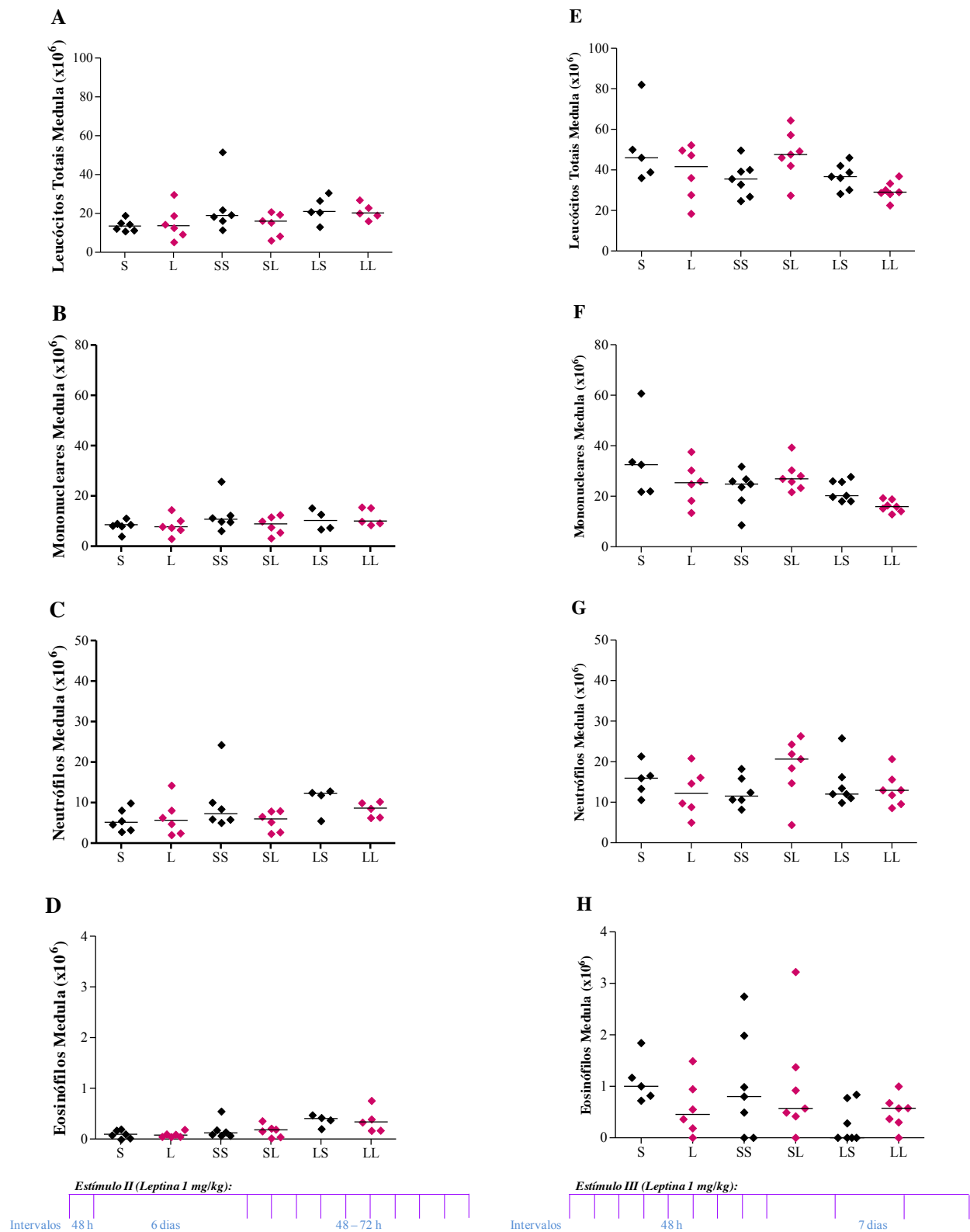


Figura 4.19. Contagem total e diferencial de leucócitos na medula óssea de animais estimulados com leptina 1 mg/kg intraperitoneal. O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulado com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A-D:** Animais submetidos ao estímulo II. **E-H:** Animais submetidos ao estímulo III. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-7 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

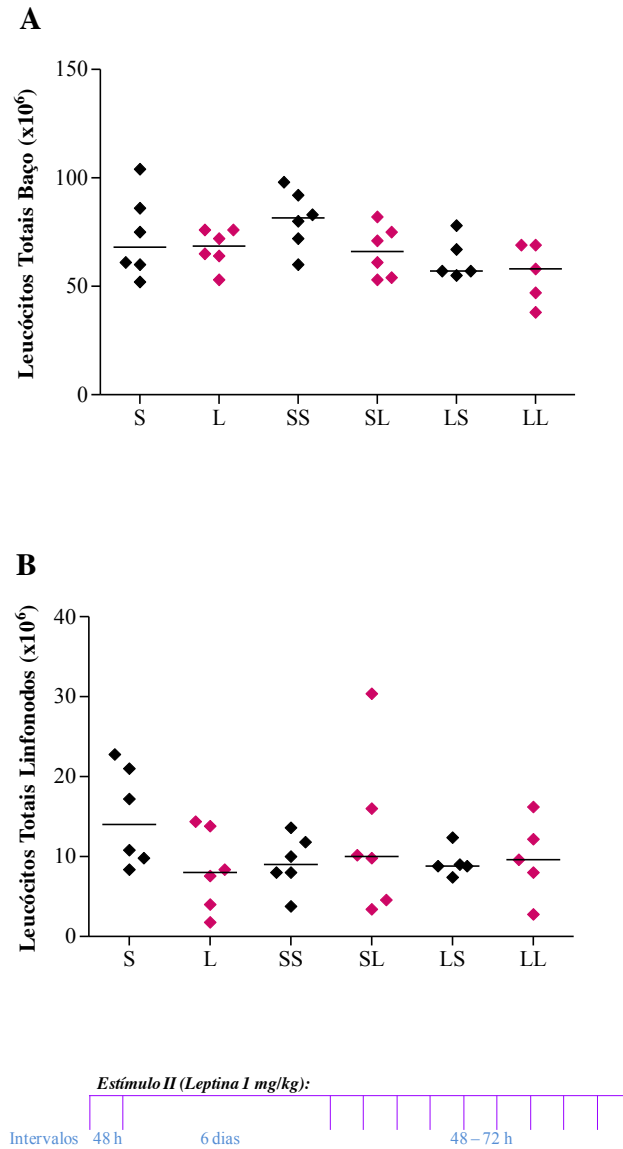


Figura 4.20. Contagem de leucócitos totais obtidos de baço (A) e linfonodos (B) de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina. O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulado com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-6 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM

4.6. Avaliação do efeito de leptina sobre a biogênese de CLs

Foi realizada a avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos em células obtidas a partir do lavado peritoneal com *Oil Red O* (*ORO*). Esta análise permitiu a verificação de um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos em células mononucleares provenientes de animais estimulados com leptina, sendo este efeito ainda mais acentuado quando o estímulo crônico com a adipocina foi empregado, indicando uma maior ativação de macrófagos em resposta ao estímulo recorrente de leptina.

Através de análises realizadas com o *software Image J* para determinar a área marcada pelo corante foi possível observar que o aumento de corpúsculos lipídicos nos grupos estimulados cronicamente com leptina ocorre de modo independente do espaçamento realizado entre as administrações do hormônio, conforme apresentado nas imagens de microscopia de campo claro e gráfico de quantificação de *ORO* (Figuras 4.21 – 4.22).

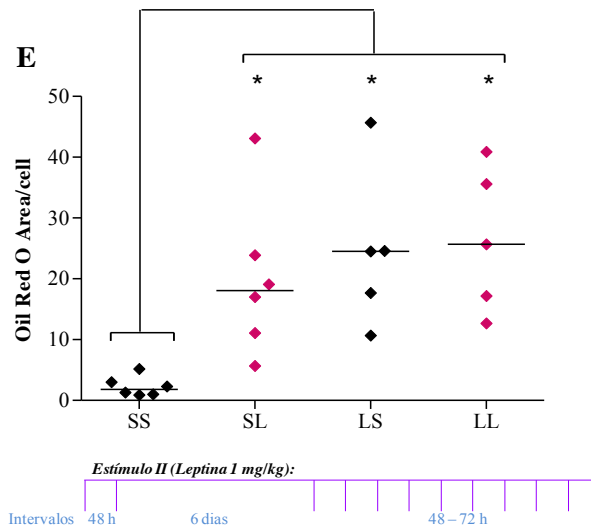
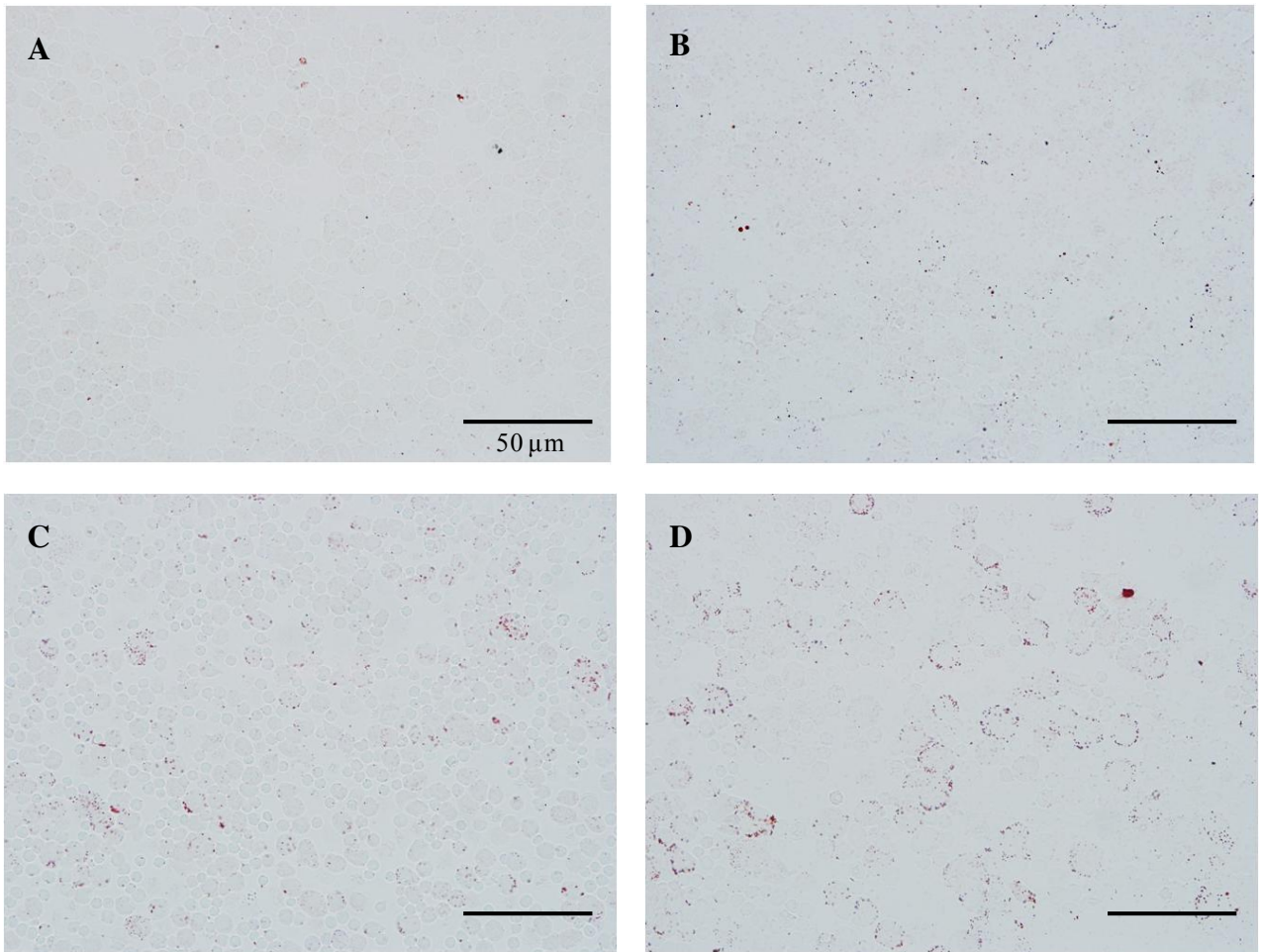


Figura 4.21. Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos após estímulo crônico com leptina 1 mg/kg. Imagens de microscopia de campo claro evidenciando a marcação de corpúsculos lipídicos com *Oil Red O* em aumento de 60x. **A:** Animais do grupo SS. **B:** Animais do grupo SL. **C:** Animais do grupo LS. **D:** Animais do grupo LL. A determinação do número de células presentes em cada campo foi realizada através de marcação de núcleos com Dapi. As imagens foram obtidas através de microscopia de fluorescência. Todas as imagens foram capturadas empregando software de captura de imagens Cell F. **E:** Quantificação de CLs marcados por ORO, em animais estimulados com leptina (♦) e animais estimulados com solução salina estéril (◆). Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-6 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo ± SEM. A marcação (*) corresponde a valores sendo $p < 0,05$.

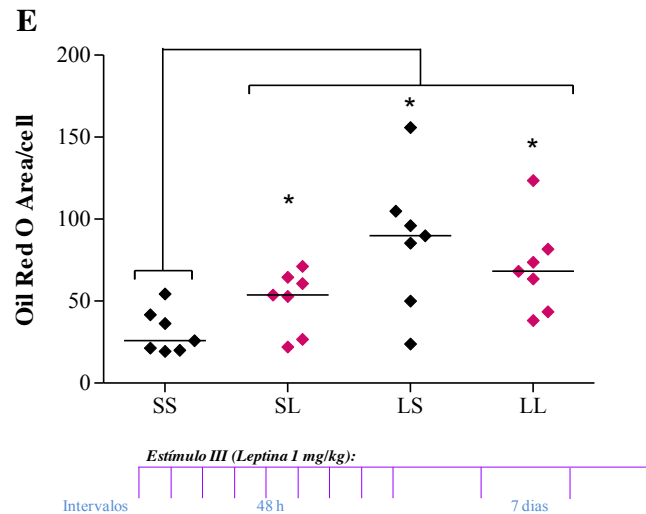
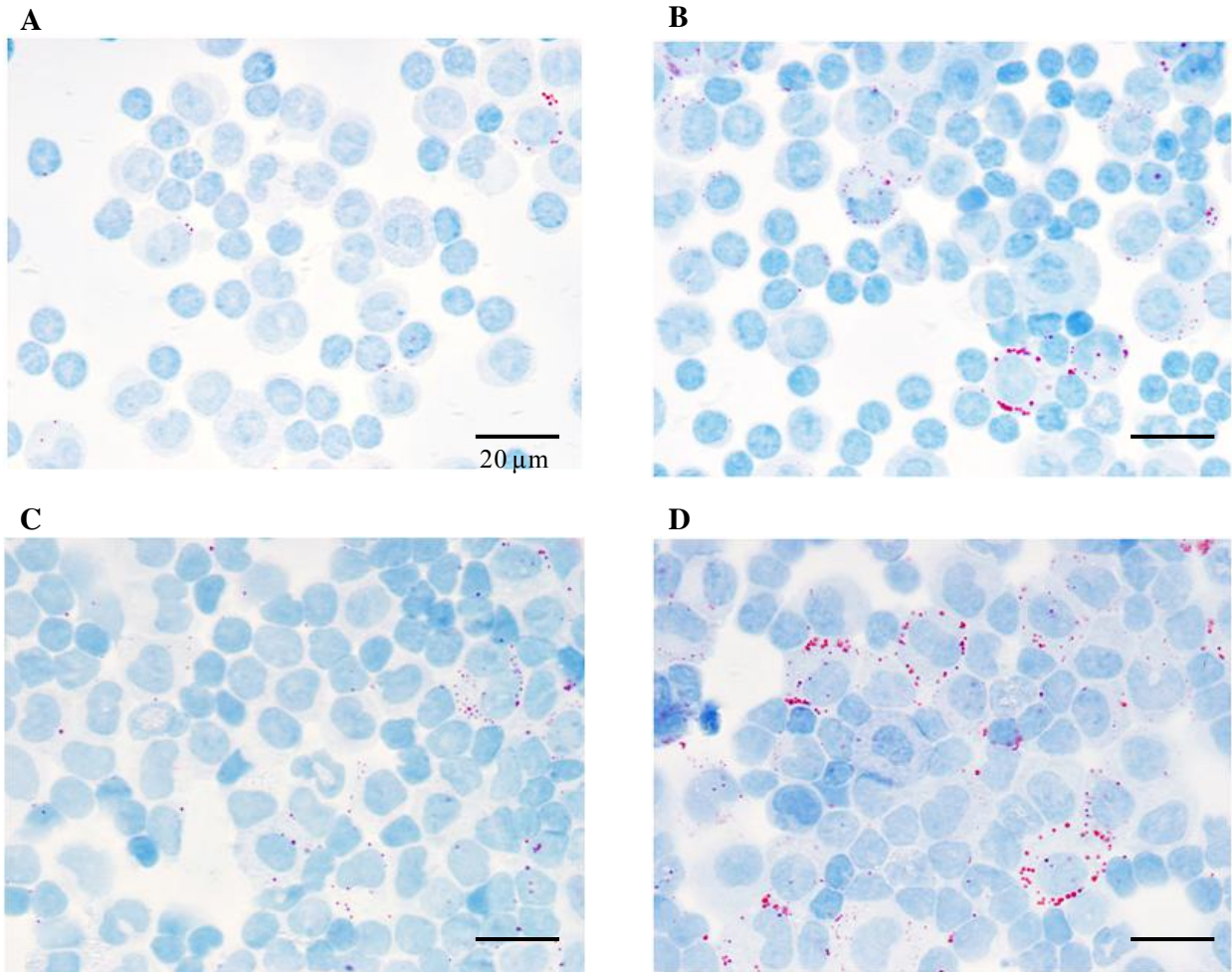


Figura 4.22. Avaliação da biogênese de corpúsculos lipídicos após estímulo crônico com leptina 1 mg/kg. Imagens de microscopia de campo claro evidenciando a marcação de corpúsculos lipídicos com *Oil Red O* em aumento de 100x. **A:** Animais do grupo SS. **B:** Animais do grupo SL. **C:** Animais do grupo LS. **D:** Animais do grupo LL. A determinação do número de células presentes em cada campo foi realizada através de marcação de núcleos com Dapi. As imagens foram obtidas através de microscopia de fluorescência. Todas as imagens foram capturadas empregando software de captura de imagens Cell F. **E:** Quantificação de CLs marcados por ORO, em animais estimulados com leptina (♦) e animais estimulados com solução salina estéril (◆). Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 6-7 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação (*) corresponde a valores sendo $p < 0,05$.

4.7. Avaliação da expressão de ADRP em resposta ao estímulo crônico com leptina

A expressão da proteína estrutural ADRP (*adipose differentiation-related protein*), a principal proteína associada com corpúsculos lipídicos, foi verificada em células provenientes do lavado peritoneal através da realização de *western blotting*. Os dados apresentados na figura 4.23 não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados, tais análises permitiram identificar a importância da realização de outros testes para melhor separação dos tipos celulares presentes na cavidade peritoneal, uma vez que a heterogeneidade celular deste meio pode ser o principal interferente na visualização de efeitos sobre proteínas associadas a corpúsculos lipídicos em macrófagos, o que pode ser melhor suportado pelas observações anteriormente destacadas pelas análises de microscopia.

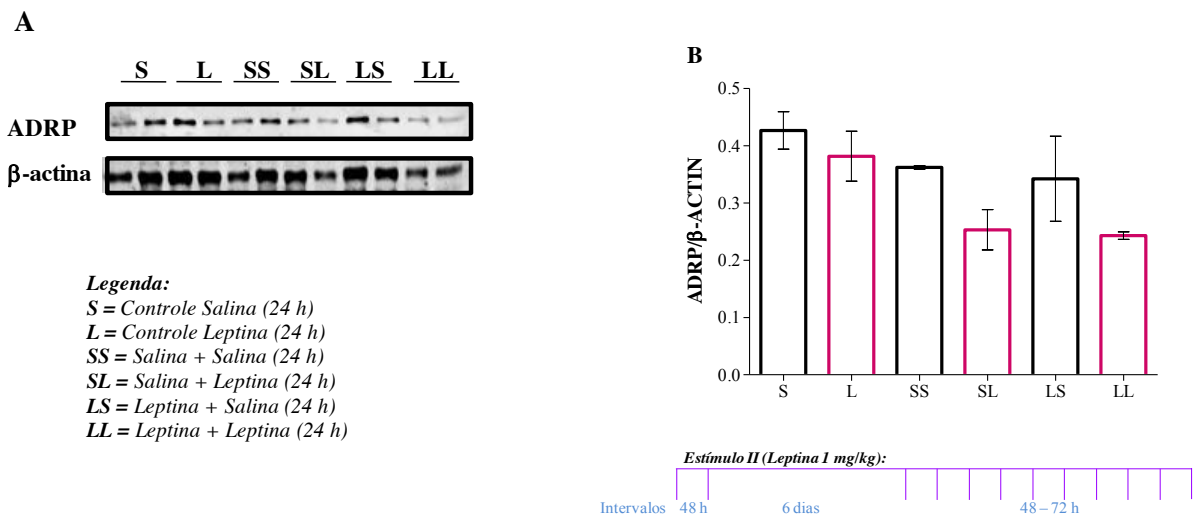


Figura 4.23. *Western Blotting* de células obtidas de lavado peritoneal de camundongos estimulados com 1 mg/kg de leptina administrada via intraperitoneal. **A:** Imagens da revelação de membrana obtidas através do Odyssey. **B:** Densitometria das bandas apresentadas, onde os níveis de expressão de ADRP foram normalizados pela expressão de β -actina da amostra correspondente. Barras rosas representam grupo de animais que receberam leptina. Barras pretas representam o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril. Dados apresentados no gráfico referem-se à média de amostras 2 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

4.8. Citometria de Fluxo

A fim de verificar se as alterações observadas no número de células mononucleares eram decorrentes do aumento da migração de macrófagos, foi realizada citometria de fluxo com marcação para CD11b e F4/80. Foi verificado um aumento no número de células mononucleares CD11b⁺F4/80⁺, em animais estimulados cronicamente com leptina em relação à animais que receberam salina. Este resultado indica uma maior presença de macrófagos na cavidade peritoneal quando o estímulo crônico com leptina é realizado. Esse aumento parece ocorrer de maneira independente ao estímulo empregado nas 24 horas que antecedem a eutanásia dos animais (Figura 4.26).

Tendo em vista as alterações encontradas na população de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺, foi verificado se o estímulo crônico com leptina poderia promover diferenças no perfil de ativação destas células visto pela indução da biogênese de CLs, para isso, realizou-se a análise de células CD11b⁺F4/80⁺ positivamente marcadas por *Bodipy*.

Conforme demonstrado na figura 4.27, as análises de citometria de fluxo revelaram que o reestímulo com leptina nas 24 horas que antecederam a eutanásia foi capaz de levar a população de macrófagos a um maior estado de ativação. Ao passo que a ausência de um reestímulo com a adipocina na cavidade peritoneal conduziu a população de macrófagos ao nível de ativação similar ao encontrado em animais não estimulados cronicamente com leptina.

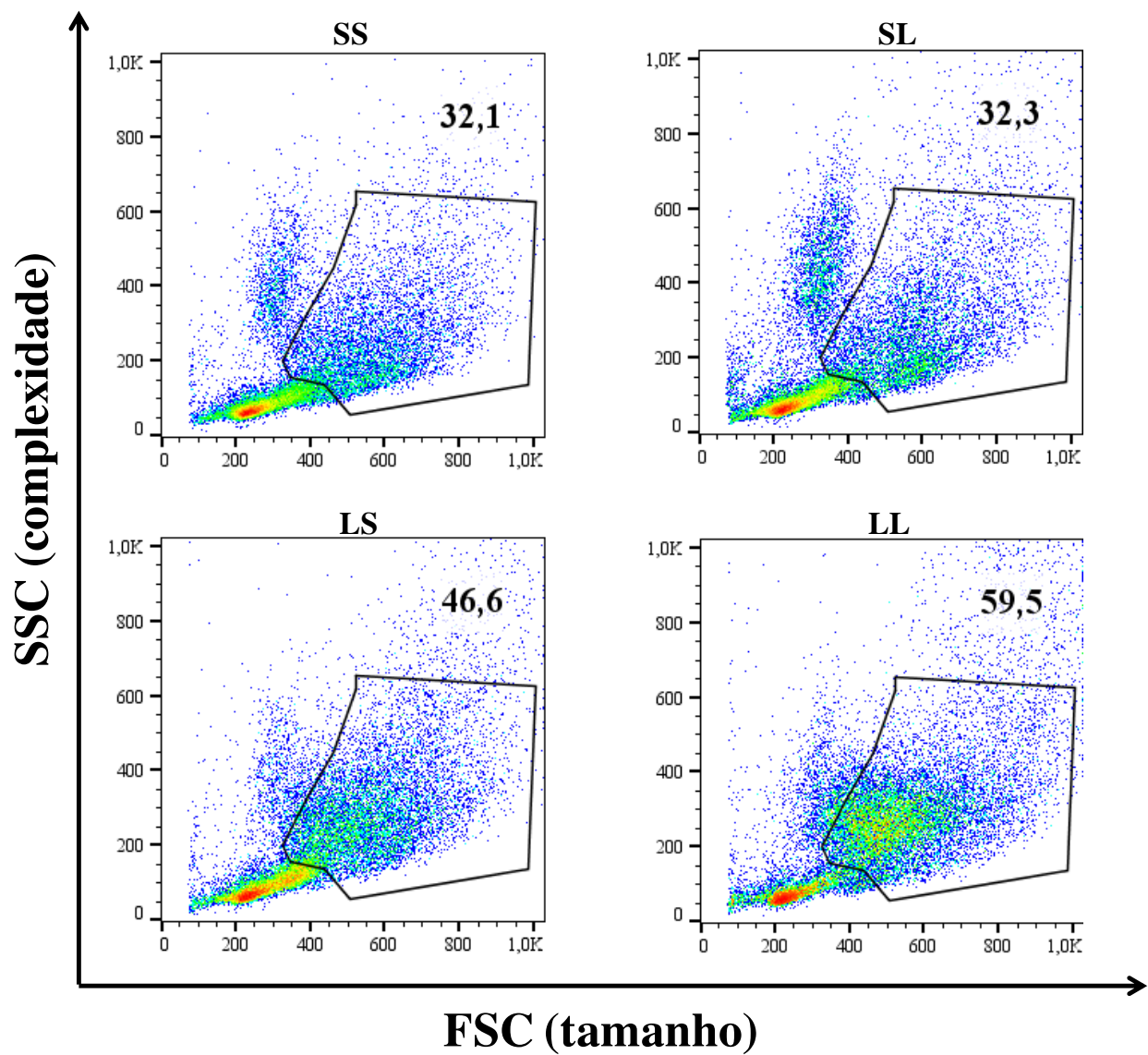


Figura 4.24. Análises de citometria de fluxo em células peritoneais de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina, empregando marcação de CD11b-APC e F4/80-PE. A área marcada representa a região determinada em tamanho (FSC) *versus* complexidade (SSC).

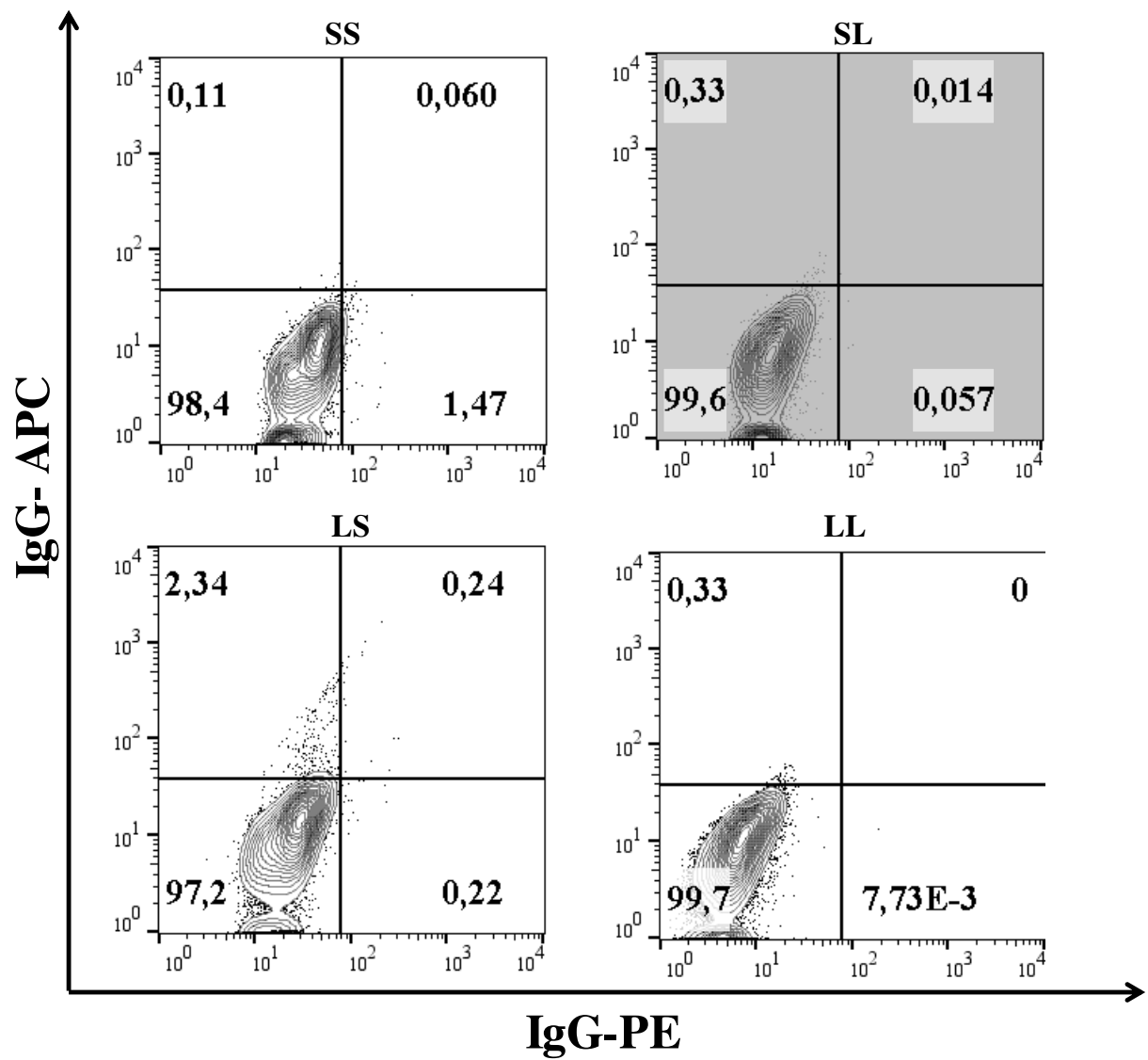


Figura 4.25. Controle isotípico IgG da região determinada em tamanho (FSC) *versus* complexidade (SSC) empregando marcação de CD11b-APC e F4/80-PE.

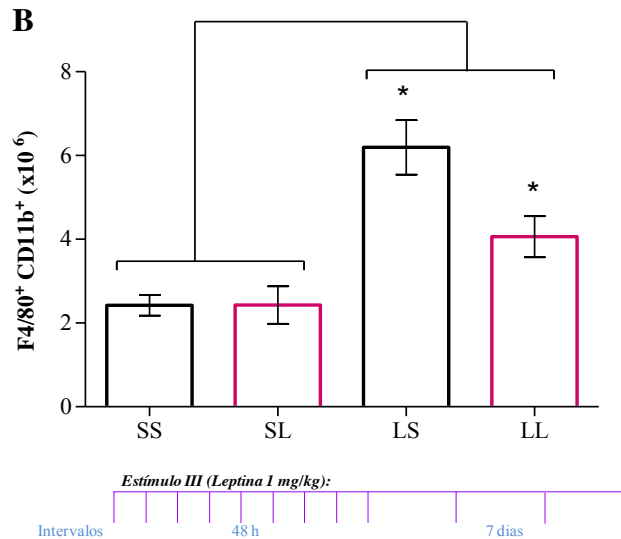
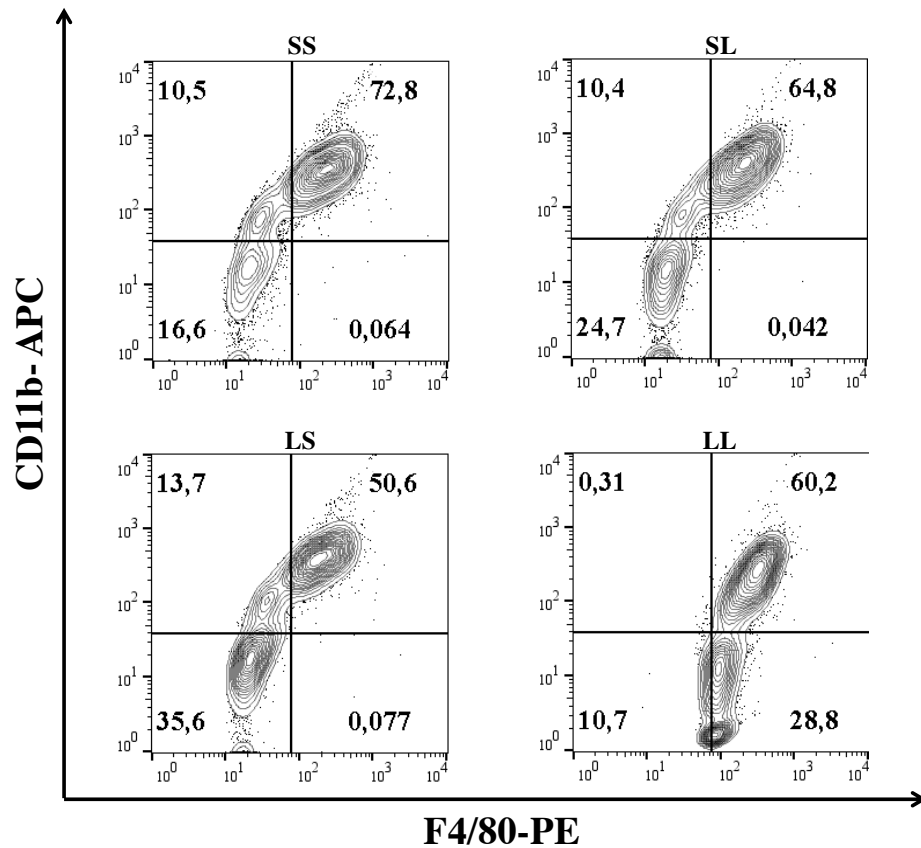


Figura 4.26. Análises de citometria de fluxo em células peritoneais de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina, empregando marcação de CD11b-APC e F4/80-PE **A:** Contour plots representativos da região definida a partir do gate realizado em tamanho (FSC) *versus* complexidade (SSC) denominada macrófagos. **B:** Representação gráfica de células F4/80⁺CD11b⁺. Barras rosas representam grupo de animais estimulado com leptina. Barras pretas representam o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril. Dados apresentados no gráfico referem-se à média das amostras de 3 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A marcação (*) corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes em relação ao grupo SS e SL, sendo $p < 0,05$.

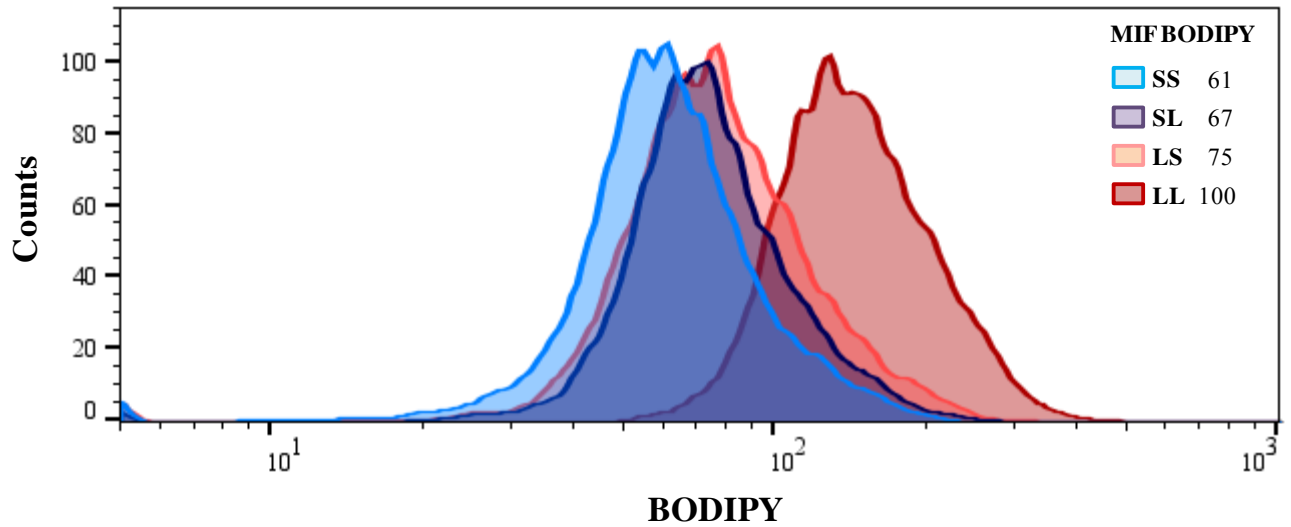
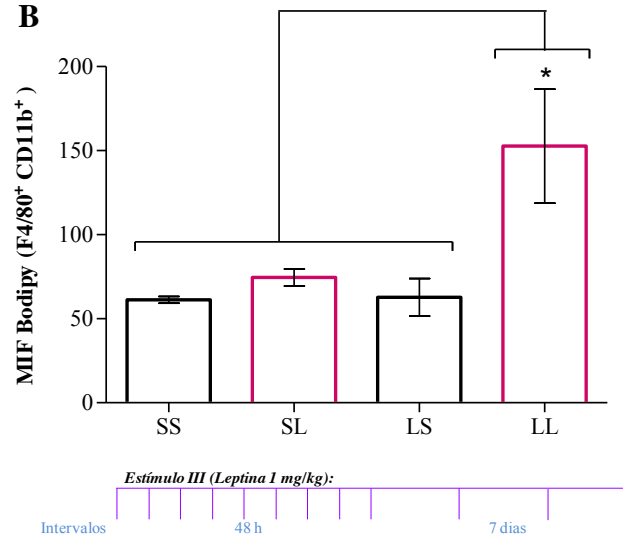
A**B**

Figura 4.27. Histograma representativo de um experimento obtido através do gate de células F4/80⁺CD11b⁺. **A:** Análises de citometria de fluxo em células peritoneais de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina, empregando marcação de CD11b-APC, F4/80-PE e Bodipy na região definida a partir de gate realizado em tamanho (FSC) *versus* complexidade (SSC) denominada macrófagos. **B:** Representação gráfica da média de intensidade de fluorescência (MIF) em células com marcação duplo-positiva (F4/80⁺CD11b⁺), positivamente marcadas para *Bodipy*. Barras rosas representam grupo de animais estimulados com leptina. Barras pretas representam o grupo de animais submetidos à administração de solução salina estéril. Dados apresentados no gráfico referem-se à média das amostras de 3 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A marcação (*) corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes em relação ao grupo SS e SL, sendo $p < 0,05$.

4.9. Avaliação de mediadores inflamatórios em resposta ao estímulo crônico com leptina

A quantificação de diferentes mediadores foi realizada a fim de verificar se as alterações encontradas sobre a migração de leucócitos em resposta ao estímulo crônico com leptina poderiam ser decorrentes de mudanças na secreção de mediadores inflamatórios.

Em um primeiro momento, fez-se necessário avaliar se alterações nos níveis de leptina poderiam ocorrer em resposta à administração recorrente da adipocina. Diferenças significativas nos níveis plasmáticos de leptina não foram encontradas (Figura 4.28A), contudo, a administração de 1 mg/kg do hormônio foi capaz de promover um aumento nos níveis desta adipocina na cavidade peritoneal desde sua primeira administração (Figura 4.28B).

Da mesma forma, a administração de 2 mg/kg de leptina não induziu alterações nos níveis séricos da adipocina (Figura 4.28C), ao passo que na cavidade peritoneal foi verificada uma redução nos níveis de leptina em relação aos animais pertencentes ao grupo controle (Figura 4.28D), indicando uma possível alteração no metabolismo de leptina em decorrência da administração das doses mais elevadas do hormônio. Interessantemente alterações nos níveis de leptina circulantes e presentes na cavidade peritoneal não foram observadas quando a adipocina foi administrada na mesma concentração de modo recorrente através da via subcutânea (Figuras 4.28E-F).

A avaliação de eotaxina, fator quimioatraente para eosinófilos também foi realizada, sendo observada elevação nos níveis desta quimiocina tanto no plasma quanto na cavidade peritoneal quando a administração recorrente com 1 mg/kg de leptina foi realizada. O mesmo efeito não foi observado com apenas uma dose da adipocina (Figura 4.29A-B). Ao avaliar este mesmo parâmetro em animais estimulados com leptina a 2 mg/kg não foram observadas alterações nos níveis séricos de eotaxina, conforme apresentado na figura 4.29C. A avaliação dos níveis plasmáticos do eicosanoide PGD₂ também foi realizada, não sendo, no entanto, encontradas alterações independente do estímulo empregado (Figura 4.29D).

Embora uma elevação no número absoluto de células mononucleares tenha sido observada, a avaliação de mediadores inflamatórios frequentemente secretados por macrófagos ativados como TNF- α , MCP-1 e IL-1 β , não se mostrou alterada independente do estímulo utilizado (Figura 4.30).

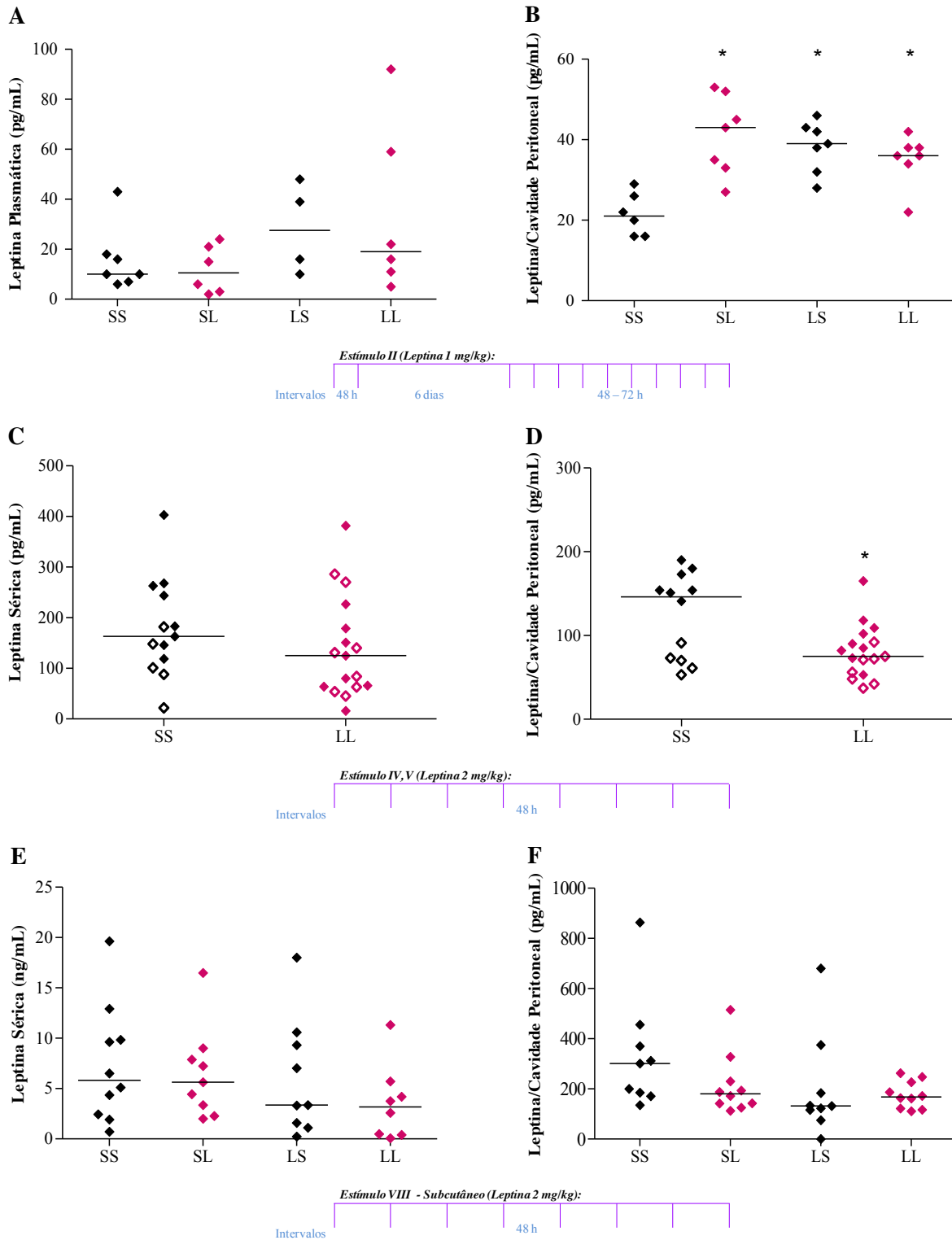


Figura 4.28. Quantificação dos níveis de leptina circulantes e na cavidade peritoneal através da técnica de ELISA. O grupo de animais estimulado com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulado com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A-B:** Animais submetidos ao esquema de estímulo crônico II (1 mg/kg). **C-D:** Animais submetidos ao esquema de estímulo intraperitoneal com leptina 2 mg/kg ($\blacklozenge/\blacklozenge$). Como controle administrou-se solução salina estéril e apirogênica ($\blacklozenge/\blacklozenge$), os dados contidos no gráfico referem-se a dois experimentos independentes. **E-F:** Efeitos da administração subcutânea recorrente de leptina a 2 mg/kg. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

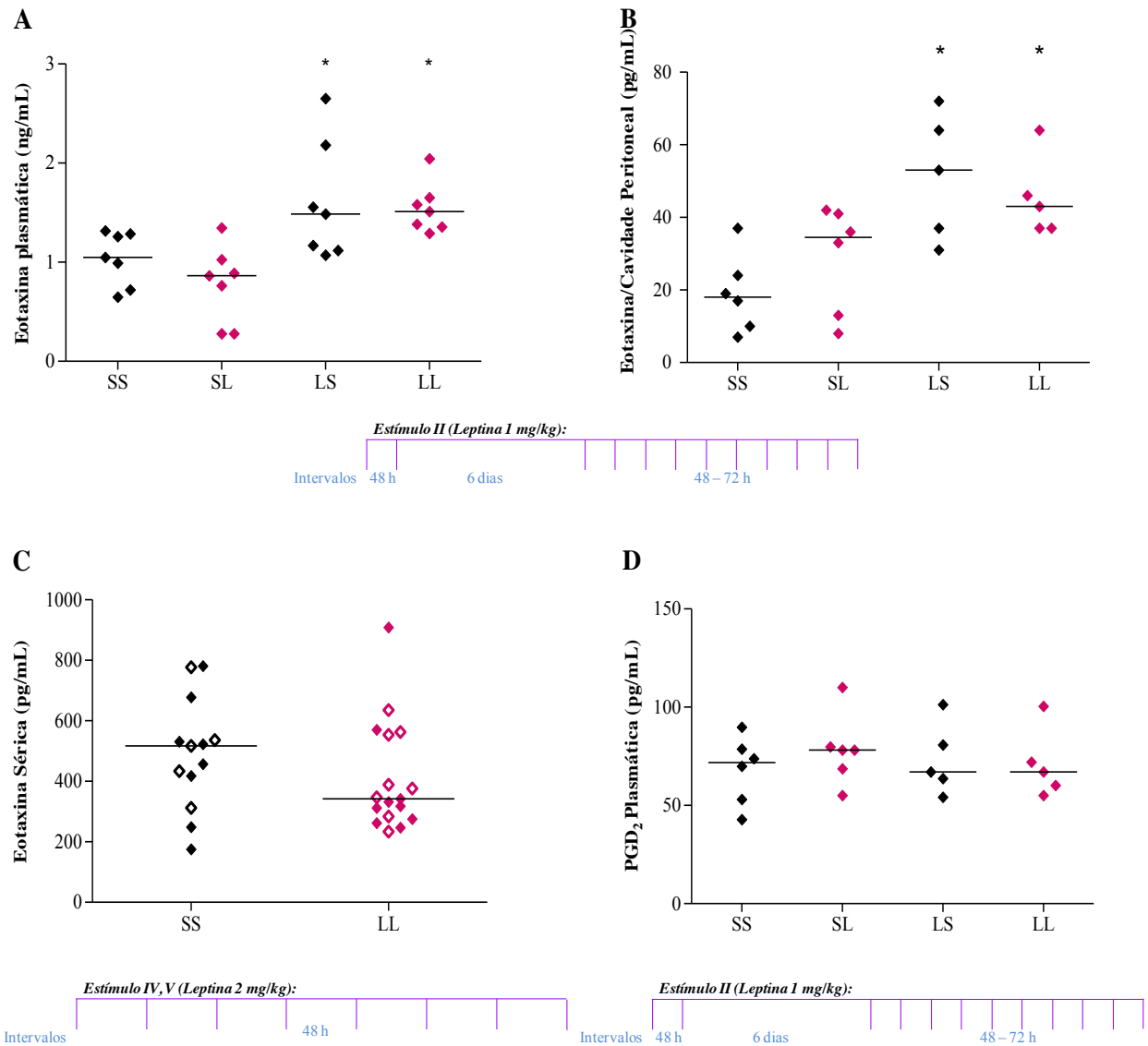


Figura 4.29. Quantificação dos níveis de eotaxina circulantes e na cavidade peritoneal através da técnica de ELISA. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulados com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A-B:** Animais submetidos ao estímulo crônico II (1 mg/kg). **C:** Animais submetidos ao estímulo intraperitoneal com leptina 2 mg/kg ($\blacklozenge/\blacklozenge$). Como controle administrou-se solução salina estéril e apirogênica ($\blacklozenge/\blacklozenge$), os dados contidos no gráfico referem-se a dois experimentos independentes. **D:** Avaliação dos níveis de PGD₂ na cavidade peritoneal de animais submetidos ao estímulo com 1 mg/kg de leptina. Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-10 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM. A marcação * corresponde ao grupo de animais com valores significativamente diferentes, sendo $p < 0,05$.

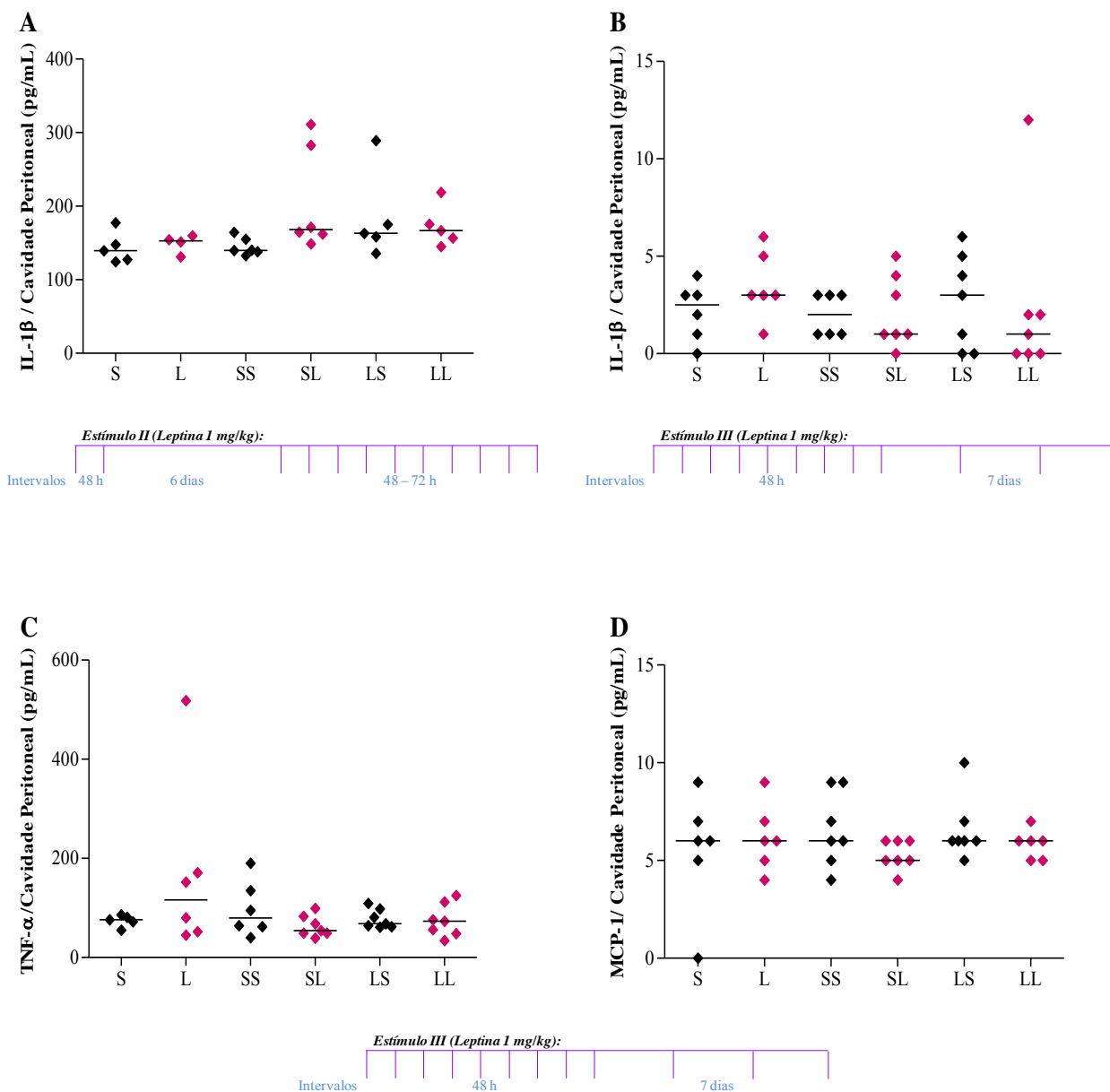


Figura 4.30. Dosagem de citocinas presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com 1 mg/kg de leptina através da técnica de ELISA. O grupo de animais estimulados com leptina está representado por \blacklozenge , o grupo de animais estimulados com solução salina estéril está representado por \blacklozenge . **A:** Dosagem de IL-1 β de animais submetidos ao estímulo crônico II (1 mg/kg). **B:** Dosagem de IL-1 β de animais submetidos ao estímulo crônico III (1 mg/kg). **C:** Dosagem de TNF- α de animais submetidos ao estímulo crônico III (1 mg/kg). **D:** Dosagem de MCP-1 de animais submetidos ao estímulo crônico III (1 mg/kg). Dados apresentados no gráfico referem-se à mediana de 5-7 animais empregados em cada grupo avaliado no estudo \pm SEM.

5. DISCUSSÃO

A descoberta da leptina no ano de 1994 surgiu como uma esperança para o tratamento da epidemia global de obesidade e, embora atualmente seja conhecido que a proposta de leptina como um novo fármaco anti-obesidade tenha ocorrido de maneira equivocada (Roujeau *et al.*, 2014), suas ações sobre sistema nervoso central e sua possível aplicação terapêutica vêm sendo cada vez mais estudada (Farr *et al.*, 2015).

A aplicação clínica de leptina sobre o tratamento de distúrbios de origens distintas, caracterizadas pelos baixos níveis plasmáticos da adipocina, como amenorréia hipotalâmica e lipodistrofia, têm sido discutida por diversos autores (Oral *et al.*, 2002; Welt *et al.*, 2004; Javor *et al.*, 2005; Blüher *et al.*, 2009; Chou *et al.*, 2011). Além disso, a recente aprovação pelo FDA de uma forma recombinante de leptina humana *metreleptin* (Myalept® - Aegerion Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA) para o tratamento de lipodistrofias não associadas ao HIV reforça a importância da realização de estudos que visem compreender os efeitos de sua utilização recorrente sobre os mais variados sistemas (Rodriguez *et al.*, 2015). Sendo assim, com intuito de avaliar os efeitos promovidos unicamente pela elevação a longo prazo dos níveis de leptina na ausência da condição de obesidade, no presente estudo foram desenvolvidos diferentes esquemas de tratamento empregando a administração recorrente de leptina.

Embora a descoberta da leptina tenha ocorrido há mais de vinte anos, pouco se sabe ao que se refere à sua atuação quando administrada cronicamente. No entanto, é sabido que o uso da adipocina a longo prazo pode acarretar aos indivíduos o desenvolvimento de linfomas, além de induzir a secreção de anticorpos contra a leptina, não estando completamente elucidadas as demais consequências que seu uso pode acarretar a estes indivíduos, enfatizando a necessidade de estudos mais aprofundados de seus efeitos sobre a ativação de células do sistema imune (Chan *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2015).

Tendo em vista o papel da leptina no que se refere ao controle do gasto energético e ingestão calórica, fez-se necessária a avaliação de seus efeitos sobre tais parâmetros. Similar aos achados publicados por Pelleymounter e colaboradores (1995), nossos dados revelaram que a administração crônica de leptina nas concentrações utilizadas foi capaz de induzir uma sutil redução na ingestão alimentar e peso corporal dos animais, sendo observada uma tendência ao menor ganho de peso em animais estimulados cronicamente com a adipocina, embora diferenças estatísticas entre os grupos estudados não tenham sido encontradas independente da via de administração (Figuras 4.1-4.6). Tais resultados são consistentes com dados da literatura, nos

quais a visualização de efeitos pronunciados sobre estes parâmetros em animais não obesos somente foi possível quando doses suprafisiológicas de leptina foram administradas (Halaas *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1997).

No entanto, ao avaliarmos o impacto de sua administração sobre os índices glicêmicos, foi possível observar que os efeitos promovidos pela leptina ocorrem de um modo dose dependente. Os dados apresentados na figura 4.7 sustentam tal afirmação uma vez que a realização do estímulo com 1 mg/kg de leptina não foi capaz de promover alterações sobre este parâmetro, ao passo que a administração de 2mg/kg foi capaz de induzir uma redução de cerca de 30 % sobre a glicemia dos animais, o que ocorreu de maneira independente da via de administração utilizada. Esta redução nos índices glicêmicos pode ser atribuída a uma maior utilização da glicose pelo músculo esquelético e menor gliconeogênese induzida pela adipocina, além de uma maior sensibilização dos receptores à ação da insulina, uma vez que diversas vias de sinalização são passíveis de tornarem-se ativas em resposta ao estímulo promovido pela ação de leptina ou insulina o que têm sido amplamente demonstrado por diversos autores (Kamohara *et al.*, 1997; Frühbeck e Salvador, 2000; Koch *et al.*, 2010; Denroche *et al.*, 2012; Mantzoros, 2012; Fernandez-Formoso *et al.*, 2015). Também tem sido sugerido para a leptina um possível efeito sobre a regulação da glicemia de maneira independente de insulina, ou ainda na redução dos níveis de glucagon tornando seu emprego no tratamento de distúrbios como diabetes tipo I, algo extremamente promissor. No entanto estudos mais aprofundados abordando tal aplicação terapêutica fazem-se necessários (Cummings *et al.*, 2011; Münzberg e Morrison, 2015).

Uma vez que a obesidade conduz à hiperleptinemia, e está frequentemente associada a um quadro inflamatório crônico, entender os efeitos de seu aumento crônico sobre a resposta imune é um ponto de extrema relevância, principalmente ao considerarmos os diversos efeitos da leptina como citocina e suas ações sobre as respostas contra patógenos e ativação de células imunes (Matarese *et al.*, 2005; Farr *et al.*, 2015).

Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo revelaram o aumento na população de neutrófilos em lavado peritoneal de camundongos estimulados com uma única administração intraperitoneal de leptina, no entanto, sem induzir alterações significativas no número total de células presentes na cavidade peritoneal dos animais (Souza-Almeida *et al.*, manuscrito em preparação). Estes resultados nos permitiram questionar se a migração de neutrófilos ocorreria em resposta à administração de leptina ou se poderiam ocorrer devido a uma somatória dos efeitos da administração de leptina exógena associada a leptina endógena e outras alterações inflamatórias promovidas pela obesidade (Klein *et al.*, 1996; Sainz *et al.*, 2015; Lackey e

Olefsky, 2016). Estes dados sustentam a necessidade da realização de estudos que busquem compreender os efeitos desencadeados exclusivamente pelo aumento crônico de leptina sobre a migração de leucócitos na ausência de obesidade (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Assim, a resposta de células imunes frente ao constante estímulo com leptina foi verificada. Ao contrário dos dados encontrados por Souza-Almeida e colaboradores (manuscrito em preparação) em estudos envolvendo somente uma administração de leptina, a administração intraperitoneal crônica da adipocina promoveu um aumento no número total de leucócitos na cavidade peritoneal, sendo este efeito observado independente do intervalo e concentração de leptina administrada (Figura 4.8A-C). No entanto, quando a via subcutânea foi empregada durante o período de estímulo crônico, as alterações no número de leucócitos totais foram dependentes de um reestímulo pela via intraperitoneal com leptina nas 24 horas que antecederam a eutanásia (Figura 4.8D). Esses resultados reforçam a capacidade da leptina em atuar como um potente fator quimioatraente sítio-específico para diversos tipos leucocitários, conforme reportado por Fernandez-Riejos e colaboradores (2010).

Com intuito de verificar quais populações de células leucocitárias poderiam estar alteradas e contribuindo para o aumento dos leucócitos totais na cavidade peritoneal, a avaliação dos efeitos do estímulo crônico com leptina sobre as diferentes populações de leucócitos foi realizada. Conforme descrito por Matarese e colaboradores (2005), a leptina exerce um importante papel sobre células da imunidade inata e adaptativa, destacando sua capacidade em atuar sobre monócitos/macrófagos. Tal efeito pode ser observado nas figuras 4.9A e 4.9D, nas quais uma elevação no número de células mononucleares é encontrada em animais submetidos ao estímulo crônico com leptina em intervalos distintos.

De maneira interessante, ao contrário dos efeitos promovidos pela DIO, na qual uma redução da população de eosinófilos envolvidos na homeostase tecidual é frequentemente observada (Johnson *et al.*, 2015), a administração crônica de leptina promoveu uma maior migração de eosinófilos na cavidade peritoneal, a qual parece ocorrer de maneira independente do intervalo realizado entre as administrações e do reestímulo utilizado no período anterior a eutanásia (Figura 4.9C e 4.9F). Esses dados indicam que as alterações promovidas pela obesidade sobre esta população de leucócitos devem-se não somente à hiperleptinemia ocasionada por essa condição, mas que também são decorrentes das várias modificações desencadeadas por esta alteração metabólica, a qual frequentemente conduz a um quadro inflamatório (Saucillo *et al.*, 2014; Naylor e Petri Jr., 2016).

Em adição aos efeitos promovidos pela administração de leptina a 1 mg/kg, foi verificado que a realização do estímulo crônico intraperitoneal com o dobro da concentração da adipocina (2 mg/kg) também foi capaz de induzir o aumento na população de células mononucleares e eosinófilos (Figuras 4.10A e 4.10C). No entanto, embora tenha sido observada uma maior consistência na distribuição dos dados, esta indução não ocorreu de forma mais pronunciada em resposta ao aumento da dose administrada.

Outra observação importante se deve à maior presença de neutrófilos na cavidade peritoneal quando 2 mg/kg foram administrados via intraperitoneal de forma crônica (Figura 4.10B), a qual não foi observada nos demais esquemas de tratamento empregando 1 mg/kg da adipocina. Esta migração de neutrófilos pode ser atribuída à redução nos níveis de cortisol promovida pela infusão intraperitoneal de leptina a 2 mg/kg, conforme demonstrado nos estudos realizados por Harris e colaboradores (1998), o qual sabidamente encontra-se elevado em condições de estresse, podendo assim inibir a migração de neutrófilos nestas circunstâncias (Srinivasan *et al.*, 2016).

Com intuito de avaliar se a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal depende de múltiplas administrações da adipocina, os animais foram submetidos ao estímulo com duas injeções de leptina. Tal modelo experimental nos permitiu identificar um sutil aumento no número de eosinófilos na cavidade peritoneal (Figura 4.11C), sugerindo que a administração recorrente de leptina seja capaz de promover alterações sobre esta população de células desde um segundo contato com a adipocina, tornando-se ainda mais evidente quando um maior número de administrações é realizado. É importante destacar que embora tenha sido previamente reportada que a administração i.p. de volumes elevados de solução salina apresente a capacidade de induzir a migração de eosinófilos para cavidade peritoneal (Oliveira *et al.*, 1994), nós não verificamos tal efeito com a administração recorrente desta solução, indicando que a migração de eosinófilos encontrada pode ser atribuída ao estímulo recorrente com leptina, não sendo resultado de alguma resposta induzida pela solução salina utilizada como veículo, independente do intervalo ou número de administrações realizadas.

Conforme reportado por Maya-Monteiro e colaboradores (2008), a administração i.p. de leptina a 1 mg/kg em animais não manipulados previamente foi capaz de induzir uma elevação no número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal 24 horas após o estímulo, a qual não é continuada nas 48 horas que seguiram após a administração da adipocina (Figura 4.12C). Além disso, a ausência de migração de eosinófilos nos permite descartar a possibilidade de que o aumento no número dessa população de células possa ser de algum modo atribuído a um efeito

tardio em resposta à primeira dose de leptina administrada, sustentando nossa hipótese de que a elevação no número de eosinófilos pode ser atribuída ao estímulo recorrente de leptina.

No entanto, conforme apresentado na figura 4.13A-B, ao realizar a administração crônica da mesma concentração de leptina (2 mg/kg) pela via subcutânea não foram observadas alterações na população de células mononucleares e neutrófilos indicando que não somente a concentração administrada pode impactar na resposta de células imunes, mas uma importante participação do sítio de administração pode ser verificada no que se refere a proliferação e indução de quimiotaxia de células envolvidas na resposta fagocítica.

Interessantemente, quando analisados os efeitos do estímulo crônico pela via subcutânea sobre a população de eosinófilos essa ausência de migração para cavidade peritoneal não foi verificada, sugerindo que a migração deste tipo celular específico ocorre de maneira independente a via de administração utilizada, sendo dependente de um estímulo agudo com leptina no sítio onde este parâmetro será avaliado para que a indução da quimiotaxia de eosinófilos ocorra (Figura 4.13C).

Para verificar se os efeitos encontrados na cavidade peritoneal poderiam ser decorrentes de alterações sobre a população de leucócitos presentes na circulação sanguínea a análise de leucócitos circulantes foi realizada, sendo observada uma pequena influência dos intervalos realizados entre as injeções sobre o número total de leucócitos (Figura 4.14A-B). Este efeito torna-se mais evidente apenas quando 2 mg/kg de leptina foi utilizada para a realização do estímulo crônico independente da via de administração, conforme pode ser observado na figura 4.14C e 4.15, indicando que do mesmo modo que alterações no metabolismo energético de camundongos podem ocorrer de maneiras distintas em resposta a diferentes vias de administração (Friedman, 1998), as manifestações induzidas por leptina sobre a população de leucócitos circulantes também são passíveis de ocorrer de maneira distinta de acordo com o sítio onde a adipocina é administrada. Uma vez que este discreto aumento no número de leucócitos totais poderiam ser provenientes do aumento de uma população leucocitária específica, nós avaliamos os efeitos da administração crônica de leptina a 1mg/kg sobre diferentes populações de leucócitos. A contagem diferencial de leucócitos não revelou mudanças significativas no perfil de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos presentes na circulação sanguínea (Figura 4.16). Estes resultados sugerem que mesmo com a realização de diferentes esquemas de injeção, a leptina pode alterar de forma discreta todas as populações leucocitárias. Tais resultados são consistentes com dados na literatura nos quais são mostrados a capacidade da leptina em

promover o aumento da proliferação de diferentes tipos celulares (La Cava e Matarese, 2004; Fazolini *et al.*, 2015)

Quando realizamos a administração de leptina a 2 mg/kg pela via intraperitoneal, foi possível observar uma elevação significativa na população de células mononucleares e neutrófilos somente em resposta ao reestímulo com leptina 24 horas antes da eutanásia (Figura 4.17A-B). Quando a via subcutânea foi utilizada para a administração recorrente da mesma concentração de leptina (2 mg/kg), somente o aumento na população de células mononucleares foi observado, o que ocorreu independente do reestímulo empregado (Figura 4.18). Estes resultados indicam que as alterações desencadeadas em resposta ao estímulo crônico com a adipocina observadas sobre a população de leucócitos também podem ser influenciadas pela via de administração. A indução da migração de neutrófilos promovida pela leptina ocorre de maneira indireta (Souza-Almeida *et al.*, manuscrito em preparação), assim, podemos sugerir que a migração de neutrófilos ocorre de forma aguda e dependente da via de administração, uma vez que o aumento de neutrófilos somente foi observado quando a via i.p. foi utilizada. Outra possibilidade é de que ocorra uma maior migração de neutrófilos para o sítio em que a adipocina foi administrada, o que conduziria à uma redução da população de neutrófilos circulantes.

Além disso, a resposta de células mononucleares parece ser passível de se prolongar de acordo com a via de administração empregada. Estes resultados são consistentes com diversos estudos encontrados na literatura que têm demonstrado a atuação distinta de leptina sobre os diferentes tipos celulares envolvidos na resposta imune, destacando-se sua capacidade em promover a proliferação e ativação de fagócitos além de seu potencial efeito anti-apoptótico sobre a população de linfócitos, suportando assim o aumento de células mononucleares encontrado (Matarese, 2000; La Cava e Matarese, 2004; Lord 2006; Vadacca *et al.*, 2011).

Uma vez que a leptina apresenta ações pleiotrópicas sobre os mais variados sistemas (Yang e Barouch, 2007), fez-se necessário avaliar se o estímulo crônico com leptina poderia conduzir a alterações em células provenientes da medula óssea dos animais, não sendo observadas alterações sobre os leucócitos presentes neste sítio independente do esquema de tratamento realizado (Figura 4.19). Estes dados nos permitem levantar a hipótese de que embora a leptina exerça um importante papel na hematopoese (Sainz *et al.*, 2015), o aumento observado sobre a população de células residentes da cavidade peritoneal não se deve a modificações nesse processo, podendo ser atribuída a uma maior proliferação das células imunes em resposta à adipocina (Ouchi *et al.*, 2011).

Da mesma forma, tendo em vista a ampla distribuição tecidual do receptor de leptina (Lord, 2006), a verificação de possíveis alterações no número total de leucócitos presentes no baço e linfonodos foi realizada, não sendo observadas diferenças significativas entre grupos estudados (Figura 4.20). Tais resultados nos reportam a imaginar que os efeitos sobre a população leucocitária em resposta ao estímulo crônico ocorre de forma mais pronunciada no sítio de administração do hormônio, não impactando diretamente sobre órgãos imunes primários e secundários.

Embora a resposta de macrófagos frente ao estímulo promovido pela administração de leptina exógena esteja bem estabelecida (Lord, 2006), o impacto que a administração recorrente da adipocina pode promover sobre a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos ainda é um ponto a ser explorado. Estudos publicados por nosso grupo revelaram que uma única administração intraperitoneal de leptina a 1 mg/kg é capaz de promover a ativação de macrófagos, induzindo a biogênese de corpúsculos lipídicos e o aumento de ADRP (*adipose differentiation-related protein*), que corresponde à principal proteína associada com corpúsculos lipídicos em diversos tipos celulares (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Interessantemente, conforme apresentado nas figuras 4.21-4.22, a indução de corpúsculos lipídicos em resposta a administração de leptina não se tornou mais evidente em resposta ao maior número de administrações da adipocina independente do esquema de tratamento realizado. Além disso, as análises de *Western Blotting* para detecção de ADRP não revelaram alterações no padrão de expressão da proteína em animais estimulados com leptina (Figura 4.23), isso possivelmente pode ser atribuído a uma “diluição” dos efeitos promovido pela presença do grande número de células pertencentes populações mistas de leucócitos em que a biogênese de CLs mediada por leptina não é verificada, sendo necessária a utilização de metodologias que permitam uma melhor separação de macrófagos para que se possa avaliar os efeitos do estímulo crônico especificamente sobre esta população celular.

Sendo assim, análises de citometria de fluxo nos permitiram verificar que o aumento na população de células mononucleares encontrado durante a contagem diferencial de leucócitos deve-se a uma maior presença de macrófagos positivamente marcados para CD11b e F4/80 nos animais pertencentes ao grupo estimulado cronicamente com leptina (Figura 4.26). No entanto, ao avaliarmos a presença de CLs nesta população de células observamos o aumento da intensidade de fluorescência de *Bodipy* somente quando o grupo estimulado cronicamente com leptina foi submetido a uma nova administração da adipocina nas 24 horas que antecederam a eutanásia, sugerindo um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos e, portanto, uma maior

ativação de macrófagos presentes na cavidade peritoneal dos animais (Figura 4.27) (Maya-Monteiro *et al.*, 2008).

Assim como reportado por Harris e colaboradores (1998), a administração intraperitoneal de leptina a 1 ou 2 mg/kg não promoveu alterações nos níveis circulantes de leptina. No entanto, a avaliação dos níveis de leptina presentes na cavidade peritoneal mostrou sofrer grande influência da concentração administrada durante o estímulo crônico, uma vez que animais estimulados com 1 mg/kg da adipocina apresentaram aumento de leptina intraperitoneal, ao passo que animais estimulados com o dobro da dose (2 mg/kg) apresentaram redução neste mesmo parâmetro quando comparados com animais controle (Figura 4.28). Tal observação poderia ser atribuída a uma metabolização mais eficiente da leptina exógena desencadeada pelo estímulo com doses superiores a 1 mg/kg associada a sua curta meia vida plasmática, ou ainda a uma redução na secreção de leptina endógena em resposta a constante presença da proteína recombinante (Klein *et al.*, 1996; Friedman e Halaas, 1998; Harris *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 1998; Ahren *et al.*, 2000). No entanto, a administração de leptina pela via subcutânea não induziu alterações nesse parâmetro (Figura 4.28E-F), indicando uma importante participação do sítio de administração neste contexto.

A avaliação de fatores solúveis quimioatraentes de leucócitos como a CCL11/eotaxina também foi realizada com intuito de verificar se os efeitos observados sobre a migração de eosinófilos para cavidade peritoneal poderiam ser provenientes de uma ação direta de leptina sobre esta população ou em decorrência de alterações nos índices de fatores quimioatraentes desencadeadas pelo estímulo crônico com a adipocina. A figura 4.29A-B, mostra uma elevação nos níveis de eotaxina circulantes, bem como na cavidade peritoneal de animais estimulados cronicamente com 1 mg/kg de leptina. Tal fato é extremamente relevante, uma vez que o acúmulo de eosinófilos depende da presença de fatores quimioatraentes, sendo a eotaxina um dos principais responsáveis por promover o rápido recrutamento e acúmulo de eosinófilos no sítio anatômico que se faça necessário (Menzies-Gow *et al.*, 2002). No entanto, quando o dobro da concentração foi de leptina foi administrada alterações nos níveis de eotaxina sérica não foram observadas, indicando uma possível ação direta de leptina sobre o aumento da população eosinófilos na cavidade peritoneal quando doses recorrentes da adipocina superiores a 1 mg/kg são administradas. É importante destacar que têm sido demonstrada uma atividade anti-apoptótica da leptina sobre eosinófilos (Takeda *et al.*, 2012), reforçando sua participação no que se refere ao aumento desta população leucocitária na cavidade peritoneal.

A avaliação dos efeitos da administração crônica de leptina sobre outras citocinas pró-inflamatórias passíveis de ser moduladas por ação da adipocina, como IL-1 β , TNF- α (La Cava e Matarese, 2004; Paz-Filho *et al.*, 2012) e *monocyte chemoattractant protein-1* (CCL2/MCP-1), a qual está frequentemente envolvida na quimiotaxia de monócitos e macrófagos (Deshmane *et al.*, 2009), também foi realizada (Figura 4.30), não sendo encontradas alterações nos níveis destas citocinas na cavidade peritoneal. No entanto, uma vez que a limitação de amostras impossibilitou a realização da dosagens destas citocinas na circulação sanguínea dos animais submetidos ao tratamento, possíveis alterações neste parâmetro não podem ser descartadas.

Além disso, em estudos para melhor entendimento da sinalização desempenhada pela eotaxina, Menzies-Gow e colaboradores (2002) demonstraram a capacidade desta quimiocina em promover alterações na população de neutrófilos e macrófagos *in vivo*, isso nos permite sugerir que a modulação dos níveis desta quimiocina promovida em resposta à administração crônica de leptina pode contribuir de algum modo para o aumento de células mononucleares na cavidade peritoneal.

Embora muitos estudos tenham sido realizados com intuito de avaliar a atuação da leptina sobre o sistema nervoso central, os efeitos de seu aumento a longo prazo sobre o sistema imune é um ponto que ainda precisa ser melhor explorado. O estudo visando compreender de quais maneiras a adipocina pode afetar a resposta leucocitária nos mais variados sítios pode fornecer informações valiosas sobre o impacto que seu aumento crônico pode promover sobre as respostas imunes de indivíduos submetidos ao tratamento com a proteína recombinante ou indivíduos obesos.

Torna-se ainda mais evidente que muito ainda precisa ser feito com o intuito de compreender a maneira pela qual os efeitos sistêmicos promovidos pela leptina podem contribuir para a promoção de alterações na resposta imune sobre os mais variados aspectos. É importante destacar que diferentes efeitos podem ser desencadeados quando vias de administrações distintas são empregadas, fazendo-se necessária a realização de uma análise com maior detalhamento de aspectos moleculares como a determinação de alterações na expressão de receptores Ob-R além do impacto promovido sobre polarização de linfócitos e macrófagos, quando a hiperleptinemia é decorrente de sua administração contínua ou ainda em resposta a obesidade.

6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos foi possível concluir que a administração recorrente de leptina é capaz de promover alterações importantes sobre a migração de células imunes para a cavidade peritoneal. Ainda, foi verificada uma resposta diferenciada destas células em resposta a adipocina quando concentrações ou vias de administração distintas foram empregadas durante o estímulo crônico.

A administração recorrente de leptina promove um aumento de eosinófilos na cavidade peritoneal, sem entretanto promover alterações significativas na população deste tipo celular presente na circulação sanguínea ou medula óssea.

A realização do estímulo crônico com 2 mg/kg de leptina pela via intraperitoneal promove o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a qual não é observada quando a via subcutânea é utilizada como sítio de administração da adipocina.

O estímulo recorrente com doses superiores a 1 mg/kg de leptina promove redução significativa nos índices glicêmicos, sendo este um efeito observado independente da via pela qual o estímulo foi realizado.

O emprego do estímulo com leptina é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos, e portanto induzir células mononucleares presentes na cavidade peritoneal a um maior estado de ativação.

A utilização de 1 mg/kg nos estímulos recorrentes conduzem ao aumento nos índices de eotaxina, não sendo este efeito observado em resposta a administração 2 mg/kg da adipocina.

A realização da administração intraperitoneal de leptina na concentração de 2 mg/kg promove alterações na concentração de leptina, levando a uma redução dos índices desta adipocina na cavidade peritoneal, a qual não é observada quando a mesma concentração é administrada pela via subcutânea.

EFEITOS DO ESTÍMULO CRÔNICO COM LEPTINA

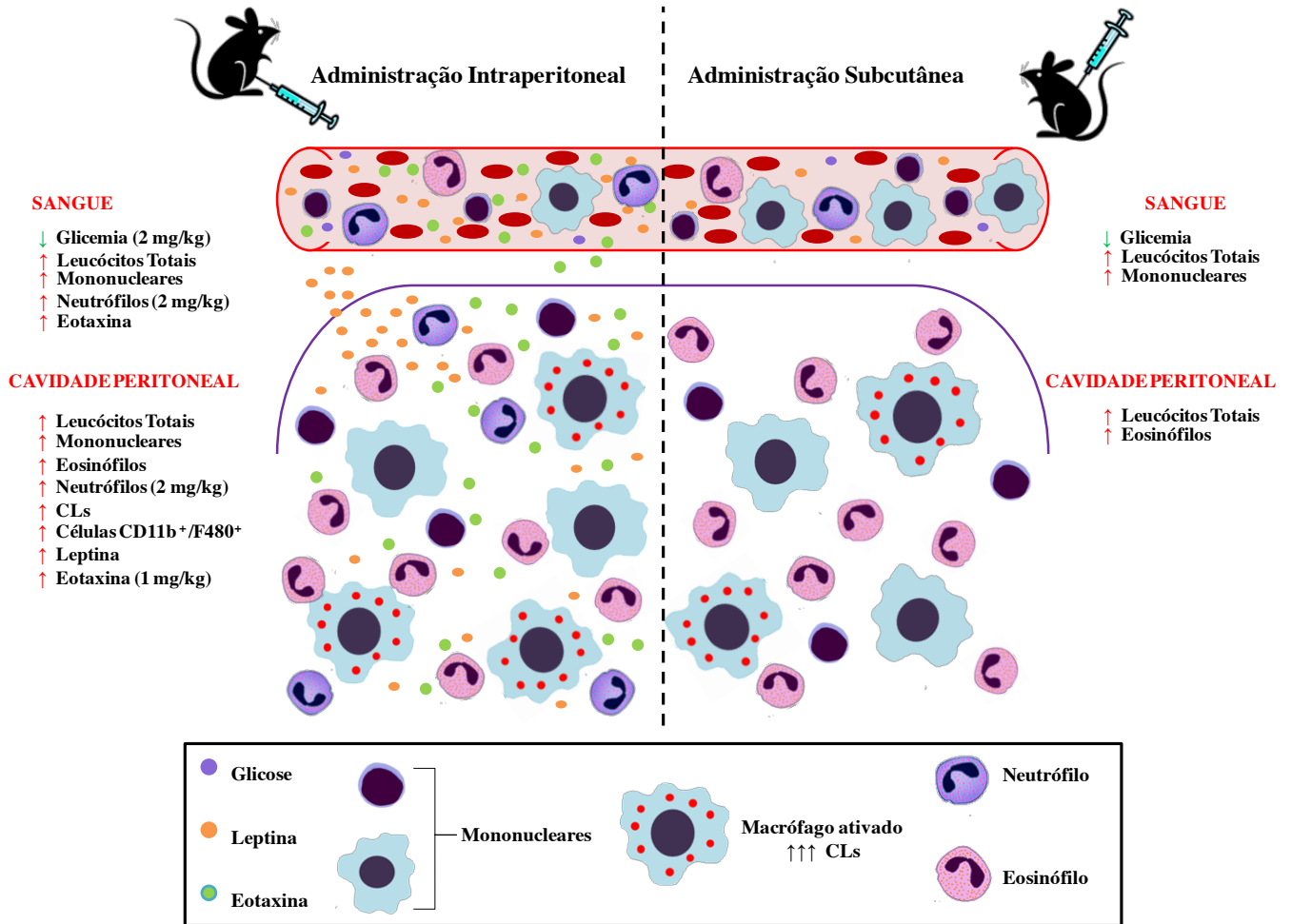


Figura 6.1. Representação esquemática dos efeitos observados em resposta ao estímulo crônico com leptina. Painel esquerdo: efeitos da administração intraperitoneal. Painel direito: efeitos da administração de leptina subcutânea.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *The Journal of Clinical Investigation*. 118: 2380–2383, 2008.
- AHIMA, R.S.; OSEI, S.Y. Leptin signaling. *Physiology & Behavior*. 81: 223–241, 2004.
- AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. Role of Leptin in the Neuroendocrine Response to Fasting. *Nature*, 382(6588):250-2,1996.
- AHREN, B.; BALDWIN, R.M.; HAVEL, P.J. Pharmacokinetics of Human Leptin in Mice and Rhesus Monkeys. *International Journal of Obesity*, 24, 1579-1585, 2000.
- AKASAKA, Y.; TSUNODA, M.; OGATA, T.; IDE, T.; MURAKAMI, K. Direct evidence for leptin-induced lipid oxidation independent of long-form leptin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1801: 1115–1122, 2010.
- AMITANI, M.; ASAKAWA, A.; AMITANI, H.; INUI, A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Frontiers in Neuroscience*. 7: 51, 2013.
- ANDÒ, S.; CATALANO, S. *Nature Reviews in Endocrinology*. 8: 263–275, 2012.
- ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J.P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism*. 34: 2–11, 2008.
- BALLAND, E.; COWLEY, M.A. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 39: 59–65, 2015.
- BARINAGA, M. “Obese” Protein slims mice. *Science*. 269: 475-476, 1995.
- BERNOTIENE, E.; PALMER, G.; GABAY, C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Research & Therapy*. 8:217, 2006.
- BJØRBÆK, C. Central Leptin Receptor Action and Resistance in Obesity. *J Investig Med*. 57(7): 789–794, 2009.
- BJØRBÆK, C.; KAHN, B.B. Leptin Signaling in the Central Nervous System and the Periphery. *Recent Prog Horm Res*. 59: 305-331, 2004.
- BLÜHER, S.; SHAH, S.; MANTZOROS, C.S. Leptin deficiency: clinical implications and opportunities for therapeutic interventions. *J Investig Med*. 57(7): 784–788, 2009.
- BOZZA, P.T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100(Suppl. I): 113-120, 2005.

BOZZA, P.T.; MAGALHÃES, K.G.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 540–551, 2009.

BOZZA, P.T.; MELO, R.C.N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & Therapeutics*. 113: 30–49, 2007.

BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P.B. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 82: 243–250, 2010.

BOZZA, P.T.; WELLER, P.F. Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 64: 227–230, 2001.

BRASAEMLE, D.L.; DOLIOS, G.; SHAPIRO, L.; WANG, R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem*. 279: 46835–46842, 2004.

BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev*. 59: 719–790, 1979.

BUSSO, N.; SO, A.; CHOBAZ-PÉCLAT, V.; MORARD, C.; MARTINEZ-SORIA, E.; TALABOT-AYER, D.; GABAY, C. Leptin Signaling Deficiency Impairs Humoral and Cellular Immune Responses and Attenuates Experimental Arthritis. *J Immunol*. 168: 875–882, 2002.

CAMMISOTTO, P.G.; BUKOWIECK, L.J. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283: C244–C250, 2002.

CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*. 269: 546–549, 1995.

CEDDIA, R.B. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *International Journal of Obesity*. 29: 1175–1183, 2005.

CHAN, J.L.; LUTZ, K.; COCHRAN, E.; HUANG, W.; PETERS, Y.; WEYER, C.; GORDEN, P. Clinical effects of long-term metreleptin treatment in patients with lipodystrophy. *Endocr Pract*. 17(6): 922–932, 2011.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L.A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S.J.; LAKEY, N.D.; CULPEPPER, J.; MORE, K.J.; BREITBART, R.E.; DUYK, G.M.; TEPPER, R.I.; MORGENSTERN, J.P. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in *db/db* Mice. *Cell*. 84: 491–495, 1996.

CHOU, S.H.; CHAMBERLAND, J.P.; LIU, X.; MATARESE, G.; GAO, C.; STEFANAKIS, R. BRINKOETTER, M.T.; GONG, H.; ARAMPATZI, K.; MANTZOROS, C.S. Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (16): 6585–6590, 2011.

COHEN, S.L.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M.; CHAIT, B.T. Human leptin characterization. *Nature*. 382:589, 1996.

COLEMAN, D.L. A historical perspective on leptin. *Nature Medicine*. 16 (10): 1097-1099, 2010.

COLEMAN, D.L. Effects of Parabiosis of Obese with Diabetes and Normal Mice. *Diabetologia*. 9:294–298, 1973.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R.; OHANNESIAN, J.P.; MARCO, C.C.; MCKEE, L.J.; BAUER, T.L.; CARO, J.F. SERUM IMMUNOREACTIVE-LEPTIN CONCENTRATIONS in NORMAL-WEIGHT and OBESE HUMANS. *The New England Journal of Medicine*. 334:292-295, 1996.

CONUS, S.; BRUNO, A.; SIMON, H.U. Leptin is an eosinophil survival factor. *J Allergy Clin Immunol*. 116: 1228-1234, 2005.

COPPARI, R.; BJØRBÆK, C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*. 11: 692-708, 2012.

CRUJEIRAS, A.B.; CARREIRA, M.C.; CABIA, B.; ANDRADE, S.; AMIL, M.; CASANUEVA, F.F. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sciences*. 140: 57-63, 2015.

CUMMINGS, B.P.; BETTAIEB, A.; GRAHAM, J.L.; STANHOPE, K.L.; DILL, R.; MORTON, G.J.; HAJ, F.G.; HAVEL, P.J. Subcutaneous administration of leptin normalizes fasting plasma glucose in obese type 2 diabetic UCD-T2DM rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (35): 14670-14675, 2011.

D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; BOZZA, P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*. 8: 1308–1315, 2008.

D'AVILA, H.; MELO, R.C.; PARREIRA, G.G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol*. 176(5): 3087–3097, 2006.

DAM, J.; JOCKERS, R. Hunting for the functions of short leptin receptor isoforms. *Molecular Metabolism*. 2: 327–328, 2013.

DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology*. 5: 570, 2014.

DENROCHE, H.C.; HUYNH, F.K.; KIEFFER, T.J. The role of leptin in glucose homeostasis. *Journal of Diabetes Investigation*. 3 (2): 115-129, 2012.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 29 (6): 313–326, 2009.

- DONG, H.; CZAJA, M.J. Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22 (6): 234-240, 2011.
- ECKEL, R.H.; KAHN, S.E.; FERRANNINI, E.; GOLDFINE, A.B.; NATHAN, D.M.; SCHWARTZ, M.W.; SMITH, S.R. Obesity and type 2 diabetes: What can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care*. 34: 1424-1430, 2011.
- FAGGIONI, R.; FANTUZZI, G.; FULLER, J.; DINARELLO, C.A.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. *Am. J. Physiol.* 274 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 43): R204–R208, 1998.
- FAGGIONI, R.; FANTUZZI, G.; GABAY, C.; MOSER, A.; DINARELLO, C.A.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am. J. Physiol.* 276: R136, 1999.
- FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.* 15: 2565–2571, 2001.
- FAIRBRIDGE, N.A.; SOUTHALL T.M.; AYRE, D.C.; KOMATSU, Y.; RAQUET, P.I.; BROWN, R.J.; RANDELL, E.; KOVACS, C.S.; CHRISTIAN, S.L. Loss of CD24 in Mice Leads to Metabolic Dysfunctions and a Reduction in White Adipocyte Tissue. *PLoS ONE*. 10(11): e0141966, 2015.
- FARR, O.M.; GAVRIELI, A.; MANTZOROS, C.S. Leptin Applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 22 (5):353-359, 2015.
- FAZOLINI, N.P.B.; CRUZ, A.L.S.; WERNECK, M.B.F.; VIOLA, J.P.B.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; BOZZA, P.T. Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle*. 14: 2667-2676, 2015.
- FEI, W.; DU, X.; YANG, H. Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22 (6): 204-210, 2011
- FERNÁNDEZ-FORMOSO, G.; PEREZ-SIEIRA, S.; GONZÁLEZ-TOUCEDA, D.; DIEGUEZ, C.; TOVAR, S. Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis. *Life Sciences*. 140: 4–9, 2015.
- FERNANDEZ-RIEJOS, P.; NAJIB, S.; SANTOS-ALVAREZ, J.; MARTIN-ROMERO, C.; PEREZ-PEREZ, A.; GONZALEZ-YANES, C.; SANCHEZ-MARGALET, V. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators of Inflammation*, 2010:568343, 2010.
- FREDERICH, R.C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*. 1(12): 1311-1314, 1995.
- FRIEDMAN, J.M. A tale of two hormones. *Nature Medicine*. 16 (10): 1100-1106, 2010.

FRIEDMAN, J.M. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutrition Reviews*. 56 (2): S38-S46, 1998.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395: 763-770, 1998.

FRÜHBECK, G.; SALVADOR, J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*. 43: 3-12, 2000.

FUJIMOTO, T.; PARTON, R.G. Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3: a004838, 2011.

FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; SAKAI, J.; MAKITA, M.; NODA, J.; MORI, M.; HIGASHI, Y.; KOJIMA, S.; TAKANO, T. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta*. 1644: 47-59, 2004.

FUJITA, Y.; MURAKAMI, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; TANAKA, M.; OZAKI, S.; NAKAO, K.; MIMORI, T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol*. 128, 21-26, 2002.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 316: 129-139, 2010.

GARG, A. Lipodystrophies. *Am J Med*. 108:143-152, 2000.

GARG, A.; AGARWAL, A.K. Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 507-513, 2009.

GIORDANO, A.; FRONTINI, A.; CINTI, S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nature Reviews Drug Discovery*. 15: 405-424, 2016.

GREENBERG, A.S.; COLEMAN, R.A. Expanding roles for lipid droplets. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22 (6): 195-196, 2011.

HALAAS, J.L.; BOOZER, C.; BLAIR-WEST, J.; FIDAHUSEIN, N.; DENTON, D.A.; FRIEDMAN, J.M. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8878-8883, 1997.

HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M. Leptin and its receptor. *Journal of Endocrinology*. 155: 215-216, 1997.

HALAAS, J.L.; GAJIWALA, K.S.; MAFFEI, M.; COHEN, S.L.; CHAIT, B.T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R.L.; BURLEY, S.K.; FRIEDMAN, J.M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science*. 269: 543-546, 1995.

HAQUE, W.A.; SHIMOMURA, I.; MATSUZAWA, Y.; GARG, A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 87: 2395-2398, 2002.

HARRIS, R.B.; ZHOU, J.; REDMANN JR, S.M.; SMAGIN, G.N.; SMITH, S.R.; RODGERS, E.; ZACHWIEJA, J.J. A Leptin Dose-Response Study in Obese (*ob/ob*) and Lean (*/?*) Mice. *Endocrinology*. 139 (1): 8-19, 1998.

HARWOOD JR., H.J. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology*. 63: 57-75, 2012.

HASSAN, M.,; LATIF, N.; YACOUB, M. Adipose tissue: friend or foe? *Nature Reviews Cardiology*. 9: 689–702, 2012.

HILL, R.A.; MARGETIC, S.; PEGG, G.G.; GAZZOLA, C. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 22 (8):765-770, 1998.

HUKSHORN, C.J.; VAN DIELEN, F.M.H.; BUURMAN, W.A.; WESTERTERPLANTENGA, M.S.; CAMPFIELD, L.A.; SARIS, W.H.M. The effect of pegylated recombinant human leptin (PEG-OB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *International Journal of Obesity*. 26, 504 – 509, 2002.

HUSSAIN, I.; GARG, A. Lipodystrophy Syndromes. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 45: 783–797, 2016.

INGALLS, A.M.; DICKIE, M.M.; SNELL, G.D. OBESE, a NEW MUTATION IN THE HOUSE MOUSE. *The Journal of Heredity*. 1950.

IOFFE, E.; MOON, B.; CONNOLLY, E.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 11852–11857, 1998.

JAUME FOLCH, J.; PATRACA, I.; MARTÍNEZ, N.; PEDRÓS, I.; PETROV, D.; ETTCHETO, M.; ABAD, S.; MARIN, M.; BEAS-ZARATE, C.; CAMINS, A. The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life Sciences*. 140: 19–28, 2015.

JAVOR, E.D.; GHANY, M.G.; COCHRAN, E.K.; ORAL, E.A.; DEPAOLI, A.M.; PREMKUMAR, A.; KLEINER, D.E.; GORDEN, P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 41(4): 753–760, 2005.

JOHNSON, A.M.F.; COSTANZO, A.; GAREAU, M.G.; ARMANDO, A.M.; QUEHENBERGER, O.; JAMESON, J.M.; OLEFSKY, J.M. High Fat Diet Causes Depletion of Intestinal Eosinophils Associated with Intestinal Permeability. *PLoS ONE*. 10 (4): e0122195, 2015.

KALUPAHANA, N.S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K.J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*. 33: 26–34, 2012.

KAMOHARA, S.; BURCELIN, R.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M.; CHARRON, M.J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*. 389: 374-377, 1997.

KANNEGANTI, T.D.; DIXIT, V.D. Immunological complications of obesity. *Nature Immunology*. 13 (8): 707-712, 2012.

KATO, H.; UEKI, S.; KAMADA, R.; KIHARA, J.; YAMAUCHI, Y.; SUZUKI, T.; TAKEDA, M.; ITOGA, M.; CHIHARA, M.; ITO, M.; KAYABA, H.; CHIHARA, J. Leptin Has a Priming Effect on Eotaxin- Induced Human Eosinophil Chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol.* 155:335–344, 2011.

KIMMEL, A.R.; BRASAEMLE, D.L.; MCANDREWS-HILL, M.; SZTALRYD, C.; LONDOS, C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J. Lipid Res.* 51:468–471, 2010.

KLEIN, S.; COPPACK, S.W.; MOHAMED-ALI, V.; LANDT, M. Adipose Tissue Leptin Production and Plasma Leptin Kinetics in Humans. *Diabetes*, 45(7):984-7, 1996.

KOCH, C.; AUGUSTINE, R.A.; STEGER, J.; GANJAM, G.K.; BENZLER, J.; PRACHT, C.; LOWE, C.; SCHWARTZ, M.W.; SHEPHERD, P.R.; ANDERSON, G.M.; GRATTAN, D.R.; TUPS, A. Leptin Rapidly Improves Glucose Homeostasis in Obese Mice by Increasing Hypothalamic Insulin Sensitivity. *The Journal of Neuroscience.* 30 (48):16180 –16187, 2010.

KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic.* 9:338–352, 2008.

KUSMINSKI, C.M.; BICKEL, P.E.; SCHERER, P.E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery.* 15: 639-660, 2016

LA CAVA, A.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology.* 4: 371-379, 2004.

LACKEY, D.E.; OLEFSKY, J.M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology.* 12: 15-28, 2016.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 24 (6), 2003.

LAM, Q.L.K.; LU, L. Role of Leptin in Immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 4(1):1-13, 2007.

LAMMERT, A.; KIESS, W.; BOTTNER, A.; GLASOW, A.; KRATZSCH, J. Soluble Leptin Receptor Represents the Main Leptin Binding Activity in Human Blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 283: 982–988, 2001.

LEE, G.H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.M.; CARROLL, K.M.; DARVISHZADEH, J.G.; LEE, J.I.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in *diabetic* mice. *Nature.* 379: 632-635, 1996.

- LI, C.; IOFFE, E.; FIDAHUSEIN, N.; CONNOLLY, E.; FRIEDMAN, J.M. Absence of Soluble Leptin Receptor in Plasma from db^{pas}/db^{pas} and Other db/db Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (16): 10078-10082, 1998.
- LI, M.D. Leptin and Beyond: An odyssey to the central control of Body Weight. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 84: 1-7, 2011.
- LI, Z.; CECCARINI, G.; EISENSTEIN, M.; TAN, K.; FRIEDMAN, J.M. Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Molecular Metabolism*. 2: 364-375, 2013.
- LORD, G. Role of Leptin in Immunology. *Nutrition Reviews*, 60(10 Pt 2):S35-8; discussion S68-84: 85-87, 2002.
- LORD, G.M. Leptin as a Proinflammatory Cytokine. *Obesity and the Kidney. Contrib Nephrol. Basel*. 151: 151-164, 2006.
- LORD, G.M.; MATARESE, G.; HOWARD, J.K.; BAKER, R.J.; BLOOM, S.R.; LECHLER, R.I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 394: 897-901, 1998.
- LOVELL JOHNS. *World obesity map*. Disponível em: <<http://www.lovelljohns.com/world-obesity-map/>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2017.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (1): 265-275, 1951.
- MAFFEI, M.; FEI, H.; LEE, G.H.; DANI, C.; LEROY, P.; ZHANG, Y.; PROENCA, R.; NEGREL, R.; AILHAUD, G.; FRIEDMAN, J.M. (Maffei *et al.*, 1995a). Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA - PNAS*. 92: 6957-6960, 1995.
- MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; KERN, P.A.; FRIEDMAN, J.M (Maffei *et al.*, 1995b). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*. 1 (11): 1155-1161, 1995.
- MANTZOROS, C.S. Leptin in relation to the lipodystrophy-associated metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolism Journal*. 36(3): 181-189, 2012.
- MARGETIC, S.; GAZZOLA, C.; PEGG, G.G.; HILL, R.A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*. 26, 1407 – 1433, 2002.
- MARTIN, S.; PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7:373-378, 2006.
- MATARESE, G. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *European Cytokine Network*. 11 (1): 7-14, 2000.

- MATARESE, G.; CARRIERI, P.B.; MONTELLA, S.; ROSA, V.; LA CAVA, A. (Matarese *et al.*, 2010a). Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 6: 455–461, 2010.
- MATARESE, G.; MOSCHOS, S.; MANTZOROS, C. S. Leptin in Immunology. *Journal of Immunology*, 174, 3137-3142, 2005.
- MATARESE, G.; PROCACCINI, C.; ROSA, V.; HORVATH, T.L.; LA CAVA, A. (Matarese *et al.*, 2010b). Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. *Trends in Molecular Medicine*. 16 (6): 247–256, 2010.
- MAURY, E.; BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 314: 1–16, 2010.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; ALMEIDA, P.E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A.S.; REZENDE, A.P.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; BOZZA, P.T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 283(4):2203-2210, 2008.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; BOZZA, P.T. Leptin and mTOR Partners in Metabolism and Inflammation. *Cell Cycle*. 7:12, 1713-1717, 2008.
- MCARDLE, M.A.; FINUCANE, O.M.; CONNAUGHTON, R.M.; MCMORROW, A.M.; ROCHE, H.M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology*. 4:52, 2013.
- MCNELIS, J.C.; OLEFSKY, J.M. Macrophages, immunity, and metabolic diseases. *Immunity*. 41 (1): 36-48, 2014.
- MELO, R.C.N.; D'ÁVILA, H.; WAN, H.C.; BOZZA, P.T.; DVORAK, A.M.; WELLER, P. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 59(5): 540–556, 2011.
- MENZIES-GOW, A.; YING, S.; SABROE, I.; STUBBS, V.L.; SOLER, D.; WILLIAMS, T.J.; KAY, A.B. Eotaxin (CCL11) and Eotaxin-2 (CCL24) Induce Recruitment of Eosinophils, Basophils, Neutrophils, and Macrophages As Well As Features of Early- and Late-Phase Allergic Reactions Following Cutaneous Injection in Human Atopic and Nonatopic Volunteers. *The Journal of Immunology*, 169:2712-2718, 2002.
- MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.B.; PERONI, O.D.; FRYER, L.G.D.; MÜLLER, C.; CARLING, D.; KAHN, B.B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 415: 339-343, 2002.
- MORTON, G.J.; CUMMINGS, D.E.; BASKIN, D.G.; BARSH, G.S.; SCHWARTZ, M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443: 289-295, 2006.
- MORTON, G.J.; SCHWARTZ, M.W. Leptin and the CNS Control of Glucose Metabolism. *Physiol. Rev*. 91 (2): 389–411, 2011.

- MÜNZBERG, H.; BJÖRNHOLM, M.; BATES, S. H.; MYERS JR., M. G. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 642–652, 2005.
- MÜNZBERG, H.; MORRISON, C.D. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism Clinical and Experimental.* 64: 13–23, 2015.
- MÜNZBERG, H.; MYERS JR., M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience.* 8 (5): 566-570, 2005.
- MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 40:325–438, 2001.
- MURPHY, D.J.; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences.* 24 (3): 109-115,1999.
- NASCIMENTO, C.M.O.; RIBEIRO, E.B.; OYAMA, L.M. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 81(3): 453-466, 2009.
- NAYLOR, C.; PETRI Jr., W.A. Leptin Regulation of Immune Responses. *Cell Press - Trends in Molecular Medicine.* 22 (2): 88-98, 2016.
- OLIVEIRA, S.H.P.; FACCIOLI, L.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Role of Resident Peritoneal Cells in Eosinophil Migration Induced by Saline. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104: 323-331, 1994.
- OLOFSSON, S.O.; BOSTROM, P.; ANDERSSON, L.; RUTBERG, M.; PERMAN, J.; BOREN, J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 448–458, 2009.
- ORAL, E.A.; SIMHA, V.; RUIZ, E.; ANDEWELT, A.; PREMKUMAR, A.; SNELL, P.; WAGNER, A.J.; DEPAOLI, A.M.; REITMAN, M.L.; TAYLOR, S.I.; GORDEN, P.; GARG, A. LEPTIN-REPLACEMENT THERAPY for LIPODYSTROPHY. *The New England Journal of Medicine.* 342: 570-578, 2002.
- OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews in Immunology.* 11: 85-97, 2011.
- PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Genetics of Leptin and Obesity: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology.* 162 (2): 101-114, 2005.
- PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C.; FRANCO, C.B.; WANG, K.B.; WONG, M.L.; LICINIO, J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56(9): 597-607, 2012.
- PEELMAN, F.; ZABEAU, L.; MOHARANA, K.; SAVVIDES, S.N.; TAVERNIER, J. Insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *Journal of Endocrinology.* 223 (1): T9-T23, 2014.

PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science*. 269: 540-543, 1995.

PETERSEN, K.F.; ORAL, E.A.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; ARIYAN, C.; YU, C.; CLINE, G.W.; DEPAOLI, A.M.; TAYLOR, S.I.; GORDEN, P.; SHULMAN, G.I. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 109:1345–1350, 2002.

PROCACCINI, C.; JIRILLO, E.; MATARESE, G. Leptin as an immunomodulator. *Molecular Aspects of Medicine*. 33: 35–45, 2012.

QUIROGA, A.D.; LEHNER, R. Role of endoplasmic reticulum neutral lipid hydrolases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22 (6): 218-225, 2011.

RABHI, S.; RABHI, I.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GOYARD, S.; LANG, T.; DESCOTEAUX, A.; ENNINGA, J.; GUIZANI-TABBANE, L. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *PLoS ONE* 11(2): e0148640, 2016.

REN, J. Leptin and hyperleptinemia – from friend to foe for cardiovascular function. *Journal of Endocrinology*. 181: 1–10, 2004.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M.J.; TROYER, D.; SEVERS, N.J. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci*. 119(Pt 20):4215–4224, 2006.

RODRIGUEZ, A.J.; MASTRONARDI, C.A.; PAZ-FILHO, G.J. New advances in the treatment of generalized lipodystrophy: role of metreleptin. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 11: 1391–1400, 2015.

ROSA, V.; PROCACCINI, C.; CALI, G.; PIROZZI, G.; FONTANA, S.; ZAPPACOSTA, S.; LA CAVA, A.; MATARESE, G. A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell Proliferation. *Immunity*. 26: 241–255, 2007.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*. 156(0): 20–44, 2014.

ROSENBAUM, M.; SY, M.; PAVLOVICH, K.; LEIBEL, R.L.; HIRSCH, J. Leptin reverses weight loss–induced changes in regional neural activity responses to visual food stimuli. *J. Clin. Invest.* 118:2583–2591, 2008.

ROUJEAU, C.; JOCKERS, R.; DAM, J. New pharmacological perspectives for the leptin receptor in the treatment of obesity. *Frontiers in Endocrinology*. 5: 167, 2014.

SAHU, A. Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase- Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway. *Neuroendocrinology*. 93: 201–210, 2011.

- SAINZ, N.; BARRENETXE, J.; MORENO-ALIAGA, M.J.; MARTÍNEZ, J.A. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism Clinical and Experimental*. 64: 35-46, 2015.
- SAKA, H.A.; VALDIVIA, R. Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 411–437, 2012.
- SAUCILLO, D.C.; GERRIETS, V.A.; SHENG, J.; RATHMELL, J.C.; MACIVER, N.J. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation To Link Nutrition and Immunity. *The Journal of Immunology*. 192: 136–144, 2014.
- SAVAGE, D.B.; O’RAHILLY, S. Leptin: a novel therapeutic role in lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 109:1285–1286, 2002.
- SCHAAB, M.; KRATZSCH, J. The soluble leptin receptor. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 29: 661-670, 2015.
- SCHRATL, P.; STURM, E.M.; ROYER, J.F.; STURM, G.J.; LIPPE, I.T.; PESKAR, B.A.; HEINEMANN, A. Hierarchy of eosinophil chemoattractants: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Eur. J. Immunol.* 36: 2401–2409, 2006.
- SCHULZ, L.C.; WIDMAIER, E.P. Leptin Receptors. In: CASTRACANE, V.D.; HENSON, M.C (Org.). *Leptin*. Endocrinology update series, Springer, Heidelberg, pp. 11-31, 2007.
- SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE Jr., D.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404: 661-671, 2000.
- SCOTECE, M.; MOBASHERI, A. Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*. 140: 75–78, 2015.
- SILVA, B.A.; BJØRBÆK, C.; UOTANI, S.; FLIER, J.S. Functional Properties of Leptin Receptor Isoforms Containing the Gln3Pro Extracellular Domain Mutation of the Fatty Rat. *Endocrinology*. 139: 3681–3690, 1998.
- SOBHANI, I; BADO, A.; VISSUZAINÉ, C.; BUYSE, M.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J-P.; ATTOUB, S.; LEHY, T.; HENIN, D.; MIGNON, M.; LEWIN, M.J.M. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*. 47:178–183, 2000.
- SOMERS, W.; STAHL, M.; SEEHRA, J.S. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *The EMBO Journal*. 16 (5): 989-997, 1997.
- SPEAKMAN, J.R.; KEIJER, J. Not so hot: optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Molecular Metabolism*. 2: 5-9, 2013.
- SRINIVASAN, S.; LOGANATHAN, S.; WANKHAR, W.; RATHINASAMY, S.; RAJAN, R. Stress effect on humoral and cell mediated immune response: Indispensable part of corticosterone and cytokine in neutrophil function. *Trials in Vaccinology*. 5: 61–70, 2016.

TAKAHASHI, N., WAELPUT, W.; GUISEZ, Y. Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 189:207, 1999.

TAKEDA, M.; UEKI, S.; KATO, H.; KONNO, Y.; CHIHARA, M.; ITOGA, M.; KOBAYASHI, Y.; MORITOKI, Y.; ITO, W.; KAYABA, H.; CHIHARA, J. Obesity and Eosinophilic Inflammation: Does Leptin Play a Role? *International Archives of Allergy and Immunology*, 158(suppl 1):87-91, 2012.

TAKEDA, M.; UEKI, S.; KATO, H.; KONNO, Y.; CHIHARA, M.; ITOGA, M.; KOBAYASHI, Y.; MORITOKI, Y.; ITO, W.; KAYABA, H.; CHIHARA, J. Obesity and Eosinophilic Inflammation: Does Leptin Play a Role? *International Archives of Allergy and Immunology*, 158 (suppl 1): 87-91, 2012.

TARTAGLIA, L.A. The Leptin Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (10): 6093–6096, 1997.

TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOLF, E.A.; MONROE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell*. 83: 1263-1271, 1995.

THIAM, A.R.; FARESE Jr., R.V.; WALTHER, T.C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14: 775-786, 2013.

THON, M.; HOSOI, T.; OZAWA, K. Possible integrative Actions of Leptin and insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*. 7: 138, 2016.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 6: 772-783, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76(9): 4350–4354, 1979.

UNER, A.G.; SULU, N. *In vivo* effects of leptin on lymphocyte subpopulations in mice. *Immunobiology*. 217: 882-888, 2012.

VADACCA, M.; MARGIOTTA, D.P.; NAVARINI, L.; AFELTRA, A. Leptin in Immuno-Rheumatological Diseases. *Cellular and Molecular Immunology*. 8 (3): 203-212, 2011.

VÁZQUEZ-VELA, M.E.F.; TORRES, N.; TOVAR, A.R. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*. 39: 715-728, 2008.

VILA, R.; ADAN, C.; RAFECAS, I.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.A.; REMESAR, X.; ALEMANY, M. Plasma Leptin Turnover Rates in Lean and Obese Zucker Rats. *Endocrinology*, 139 (11): 4466-4469, 1998.

- WAN, H.C.; MELO, R.C.; JIN, Z.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies, *FASEB J.* 21: 167–178, 2007.
- WANG, H.; SZTALRYD, C. Oxidative tissue: perilipin 5 links storage with the furnace. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 22 (6): 197-203, 2011.
- WANG, M.Y.; ZHOU, Y.T.; NEWGARD, C.B.; UNGER, R.H. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Letters.* 392: 87-90, 1996.
- WONG, C.K.; CHEUNG, P.F.Y.; LAM, C.W.K. Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: Implications for immunopathophysiology of allergic inflammation. *Eur. J. Immunol.* 37: 2337–2348, 2007.
- WEAVER, J.U. Classical Endocrine Diseases Causing Obesity. Korbonits M (ed): Obesity and Metabolism. *Front Horm Res. Basel.* Karger, vol. 36, pp 212–228, 2008.
- WELT, C.K.; CHAN, J.L.; BULLEN, J.; MURPHY, R.; SMITH, P.; DEPAOLI, A.M.; KARALIS, A.; MANTZOROS, C.S. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *The New England Journal of Medicine.* 351(10): 987–997, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (Who, 2016). Obesity and Overweight. Disponível em <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 05 de dezembro de 2016.
- YANG, R.; BAROUCH, L.A. Leptin Signaling and Obesity - Cardiovascular Consequences. *Circ Res.* 101: 545-559, 2007.
- ZABEAU, L.; PEELMAN, F.; TAVERNIER, J. Leptin: From structural insights to the design of antagonists. *Life Sciences.* 140: 49–56, 2015.
- ZABOLOTNY, J.M.; BENCE-HANULEC, K.K.; STRICKER-KRONGRAD, A.; HAJ, F.; WANG, Y.; MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.B.; ELMQUIST, J.K.; TARTAGLIA, L.A.; KAHN, B.B.; NEEL, B.G. PTP1B Regulates Leptin Signal Transduction In Vivo. *Developmental Cell.* 2: 489–495, 2002.
- ZHANG, F.; BASINSKI, M.B.; BEALS, J.M.; BRIGGS, S.L.; CHURGAY, L.M.; CLAWSON, D.K.; DIMARCHI, R.D.; FURMAN, T.C.; HALE, J.E.; HSIUNG, H.M.; SCHONER, B.E.; SMITH, D.P.; ZHANG, X.Y.; WERY, J.P.; SCHEVITZ, R.W. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 387: 206-209, 1997.
- ZHANG, F.; CHEN, Y.; HEIMAN, M.; DIMARCHI, R. Leptin: Structure, Function and Biology. *Vitamins and Hormones.* 71: 345-372, 2005.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425-432, 1994.