

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

GLÁUCIA SOUZA DE ALMEIDA

**Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em modelo murino de  
obesidade induzida por dieta**

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

**Orientadora:** Dr. Clarissa Menezes Maya Monteiro

**RIO DE JANEIRO**

Setembro, 2012

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

A447 Almeida, Gláucia Souza de

Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em modelo murinho de obesidade induzida por dieta / Gláucia Souza de Almeida. – Rio de Janeiro, 2012.

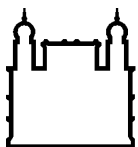
xii, 73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.

Bibliografia: f. 67-73

1. Leptina. 2. Neutrófilos. 3. Obesidade. 4. Obesidade induzida por dieta. I. Título.

CDD 616.398



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Autor: **GLÁUCIA SOUZA DE ALMEIDA**

**Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em modelo murino de  
obesidade induzida por dieta**

**ORIENTADOR: Prof. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro**

**Aprovada em: 24/09/2012**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro - Presidente**

**Prof. Dr. Wilson Savino**

**Prof. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo**

**Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva - Suplente**

**Prof. Dra. Christianne Bandeira de Melo – Revisora e Suplente**

Rio de Janeiro, 24 de setembro de 2012.

Aos meus pais, Rudinei e Ivoneide,  
com amor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro. Muita obrigada, não só pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho, mas pela sua determinação em fazer de mim uma aluna e profissional melhor. Obrigada pela inspiração e alegria que é aprender a fazer ciência com o seu exemplo.

À Dra. Patrícia Torres Bozza, por ter me recebido em seu laboratório, pelo apoio e sugestões preciosas para o andamento deste projeto.

A Marlede, Sally, Lohanna e Narayana, pela imensa ajuda, apoio e companheirismo. Não tenho palavras para agradecer o quanto foi fundamental ter vocês ao meu lado para desenvolver este trabalho. Muito obrigada de coração.

A Dra. Christianne Bandeira e Dra. Tatiana Luna pela generosa contribuição e colaboração.

Aos pesquisadores Dra. Adriana Vallochi e Dra. Cecília Jacques pelas sugestões e críticas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos Dra. Roberta, Dr. Alan, Dra. Andréia Surrage, Diogo, Alessandra, André, Isacláudia, Juliana, Rafael, Marina, Bia, Gisele e Carol. Obrigada pelos momentos de descontração. Trabalhar com vocês torna tudo tão mais fácil!

Aos queridos Edson e Rose. Poder contar com a ajuda de vocês é inestimável pra mim.

Em especial, a Dra. Adriana Ribeiro Silva, Dra. Rachel Novaes, Dra. Patrícia Reis, Dr. Valber Frutuoso e Dr. Hugo Caire.

Aos demais membros do Laboratório de Imunofarmacologia pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos órgãos de apoio científico Capes, CNPq, FIOCRUZ, FAPERJ, INCT-CÂNCER.

Aos meus pais, por me amarem e jamais medirem seus esforços por mim. Pai, obrigada por me incentivar a viver os meus sonhos. Mãe, obrigada pela sua dedicação e por sempre ter lutado pela minha educação.

À Natália, amiga querida, por estar sempre ao meu lado, dentro e fora do laboratório. Obrigada pelo imenso apoio e inúmeras broncas! Sua amizade é preciosa pra mim.

À Prisciliana. É uma surpresa muito agradável que os nossos caminhos tenham se cruzado! Obrigada pelo grande incentivo.

Às amigas Silvia e Maria. A distância e o tempo não mudam nada! Obrigada por serem parte da minha vida. O apoio de vocês me faz mais forte.

Ao Guilherme, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão. Obrigada pela paciência, por me ajudar a crescer e por estar sempre ao meu lado. É um privilégio ter você na minha vida.

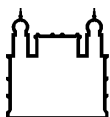
A Deus, por tudo.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	xi
SUMÁRIO DE TABELAS E ESQUEMAS.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Obesidade.....	2
1.2. Leptina.....	4
1.2.1. Sinalização da leptina.....	5
1.3. Efeitos da leptina no sistema imune.....	8
1.3.1. Leptina e macrófagos.....	12
1.3.2. Leptina e neutrófilos.....	13
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Materiais e métodos.....	18
3.1. Animais.....	19
3.2. Tratamento.....	19
3.2.1. Leptina.....	19
3.2.2. Rapamicina.....	20
3.2.3. Zileuton.....	20
3.2.4. U-75302.....	20
3.2.5. Anticorpos anti-KC.....	20
3.3. Obtenção do lavado peritoneal.....	21
3.4. Contagem diferencial.....	21
3.5. Quantificação de corpúsculos lipídicos.....	21
3.6. Plasma.....	22
3.7. Quantificação de KC, TNF- $\alpha$ e leptina.....	22
3.8. <i>Eicosacell</i> .....	22
3.9. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica:.....	23
3.10. Análise estatística.....	24
4. Resultados.....	25

5. Discussão .....	54
6. Conclusão.....	63
7. Referências bibliográficas .....	66





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em modelo murino de obesidade induzida por dieta

#### RESUMO

Leptina é um hormônio/citocina produzido pelo tecido adiposo que inibe a ingestão alimentar e o metabolismo lipídico. É altamente expressa na obesidade, sem no entanto intensificar seu efeito de inibição do apetite. Dentre outras funções, regula a imunidade inata e adaptativa. Sabe-se que a leptina ativa macrófagos, induzindo a produção de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e LTB<sub>4</sub>. A leptina parece ainda regular a participação de neutrófilos em respostas inflamatórias. No entanto, não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais a leptina seria capaz de regular migração ou ativação de neutrófilos, uma vez que estes não apresentam o principal receptor funcional de leptina, ObRb. Estudos *in vitro* não são conclusivos quanto aos efeitos serem diretos ou indiretos, enquanto estudos *in vivo* não se detêm a estudar efeitos quimiotáticos de leptina sobre neutrófilos. O objetivo deste trabalho é investigar a sinalização por leptina envolvida na migração de neutrófilos. Para isso, foi realizada estimulação de animais C57Bl/6, bem como *knockout* de TNFR1<sup>-/-</sup>, MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, 5-LO<sup>-/-</sup>, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, machos, com leptina i.p. por 1, 6 e 24 h para avaliação do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal e quantificação de mediadores inflamatórios no sobrenadante de lavado peritoneal e plasma. Também foram realizados tratamentos com rapamicina, para inibição de mTOR, Zileuton e U-75302, para inibir a sinalização por LTB<sub>4</sub>, bem como anticorpos anti-KC. Foi observado que macrófagos incubados com leptina 20 nM *in vitro* produzem KC e TNF- $\alpha$ , mediadores que recrutam neutrófilos. *In vivo*, foi observado que a migração de neutrófilos por leptina é dependente de TNF- $\alpha$ , KC e PI3K $\gamma$ , e independente de 5-LO/LTB<sub>4</sub>, MIP-1 $\alpha$  e mTOR. Para avaliar o efeito de hiperleptinemia crônica na imunidade inata, foi estabelecido um modelo murino de obesidade induzida por dieta. Animais do grupo obeso foram alimentados com dieta hiperlipídica com 60% de teor calórico proveniente de gordura, enquanto a dieta controle possui 10% de teor calórico proveniente de gordura. Animais obesos apresentaram hiperglicemia e hiperleptinemia. A dieta hiperlipídica predispôs a ativação de macrófagos peritoneais por leptina, incrementando a produção de corpúsculos lipídicos. Os níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de lavado peritoneal foram maiores em animais obesos não estimulados com leptina i.p., sendo a estimulação com leptina i.p. capaz de induzir recrutamento de neutrófilos em animais obesos. Tais eventos sugerem que a dieta hiperlipídica induziu *background* inflamatório, que, no entanto, não interferiu na capacidade da leptina induzir recrutamento neutrofilico. Tais dados sugerem que leptina promove recrutamento de neutrófilos por meio da ativação de macrófagos e produção de mediadores. Além disso, a obesidade experimental promove ativação subclínica de macrófagos, sem alterar o recrutamento de neutrófilos. Com este trabalho, espera-se contribuir para o melhor entendimento da participação da leptina na regulação do sistema imune inato.

## Leptin-induced neutrophil recruitment in diet-induced obese murine model

### ABSTRACT

Leptin is an adipose tissue-produced hormone/cytokine which inhibits food intake and lipid metabolism. It is highly expressed in obesity without appetite inhibition enhancement. Also regulates innate and adaptive immunity. It is known that leptin activates macrophages inducing the production of inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and LTB<sub>4</sub>. Leptin regulates neutrophil functions in inflammatory responses. However, mechanisms by which leptin could induce neutrophils migration and activation are not elucidated, since they do not show the main functional leptin receptor, ObRb. *In vitro* studies are inconclusive about direct or indirect effects, while *in vivo* studies usually do not focus on leptin effects on neutrophil chemotaxis. This study aims to investigate leptin signaling involved in neutrophil migration. C57BL/6 and knockout TNFR1<sup>-/-</sup>, MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, 5-LO<sup>-/-</sup>, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> male mice were stimulated with leptin ip for 1, 6 or 24 h for evaluation of neutrophil influx into peritoneal cavity and quantification of inflammatory mediators in the supernatant of peritoneal fluid and plasma. It was also performed treatments with rapamycin, for inhibition of mTOR, Zileuton and U-75302 for inhibition of LTB<sub>4</sub> signaling, and anti-KC antibodies. Macrophages incubated with 20 nM leptin *in vitro* produce KC and TNF- $\alpha$ , neutrophil recruitment mediators. *In vivo*, neutrophil migration induced by leptin is dependent on TNF- $\alpha$ , KC and PI3K $\gamma$ , and independent on 5-LO/LTB<sub>4</sub>, MIP-1 $\alpha$  and mTOR. To evaluate the effect of chronic hyperleptinemia in innate immunity, we established a murine model of diet induced obesity. The obese animals were fed with high fat diet with 60% calories from fat content, while the control diet had 10% of caloric content derived from fat. Obese animals showed hyperglycemia and hyperleptinemia. The fat diet predisposed the activation of peritoneal macrophages by leptin, increasing the lipid bodies formation. The levels of TNF- $\alpha$  in the supernatant of peritoneal fluid were higher in obese animals, not stimulated with leptin ip; leptin ip stimulus induced neutrophil recruitment in obese animals. Such events suggest that the high fat diet induced inflammatory background, which, however, did not affect the ability of leptin to induce neutrophil recruitment. These data suggest that leptin promotes neutrophils recruitment through the activation of macrophages and production of mediators. Furthermore, experimental obesity promotes subclinical activation of macrophages, without changing the recruitment of neutrophils. This thesis is expected to contribute to a better understanding of leptin role in the regulation of innate immune system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO – 5-lipooxigenase

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

$\alpha$ -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*) –  $\alpha$ -hormônio estimulante de melanócitos

BLT1 (*leukotriene B<sub>4</sub> receptor 1*) – receptor 1 de leucotrieno B<sub>4</sub>

CART (*cocaine and amphetamine regulated transcript*) – transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CCL2 (*C-C chemokine ligand 2*) – ligante 2 de quimiocinas C-C

CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) - receptor tipo 2 de quimiocinas C-C

CECAL – centro de experimentação animal

CEUA – comitê de ética de uso de animais

CRH (*Corticotropin-releasing hormone*) – hormônio liberador de corticotropina

CXCL1 (*C-X-C chemokine ligand 1*) – ligante 1 de quimiocina C-X-C

DH – dieta hiperlipídica

DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) – sulfóxido dimetil

DN – dieta normolipídica

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

EDAC [*1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide*] – 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) - ensaio imunossorvente ligado a enzima

fMLP (*N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine*) – N-formil-metionina-leucina-fenilalanina

HDL (*high-density lipoprotein*) – lipoproteína de alta densidade

IFN $\gamma$  – Interferon  $\gamma$

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – interleucina-6

i.p. - intraperitoneal

JAK (*Janus kinase*) – quinase Janus

KC (*Keratinocyte-derived cytokine*) – citocina derivada de queratinócito

LPS - lipopolissacarídeo

LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) – proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) – proteína 1 quimiotática de monócitos

MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein*) – proteína inflamatória de macrófagos-1 $\alpha$

MPO (*myeloperoxidase*) - mieloperoxidase  
mTOR (*mammalian target of rapamycin*) – alvo de rapamicina em mamíferos  
mTORC1/2 (*mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1/2*) – complexo 1/2 do alvo de rapamicina em mamíferos  
NPY – neuropeptídeo Y  
OVA - ovalbumina  
ObR – receptor do produto do gene *ob*  
PBS – tampão fosfato tamponado  
PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) - fosfatidil inositol 3 quinase  
RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)  
SNC – sistema nervoso central  
STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) – transdutor de sinal e ativador de transcrição  
Th1/2 – T *helper* 1/2  
TNF (*Tumor necrosis factor*) - $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$   
Treg – T regulatório

## SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1.1 – Isoformas do receptor de leptina, ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf. ....	5
Figura 1.2 – Vias de sinalização ativadas pelo receptor de leptina, ObRb.....	7
Figura 1.3 – Efeitos da leptina na imunidade inata e adaptativa. ....	11
Figura 4.1 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por diferentes doses de leptina.....	27
Figura 4.2 – Cinética da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais estimulados com leptina. ....	28
Figura 4.3 – Produção de TNF- $\alpha$ <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . ....	29
Figura 4.4 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais TNFR1 <sup>-/-</sup> . .	31
Figura 4.5 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> . ....	32
Figura 4.6 – Produção de KC <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	34
Figura 4.7 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos anti-KC e estimulados com leptina (24 h). ....	35
Figura 4.8 - Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos anti-KC e estimulados com leptina (3:30 h). ....	36
Figura 4.9 – Produção de LTB <sub>4</sub> <i>in vivo</i> .....	38
Figura 4.10 – Detecção de LTB <sub>4</sub> intracelular por <i>Eicosacell</i> . ....	39
Figura 4.11 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais com sinalização por LTB <sub>4</sub> inibida. ....	41
Figura 4.12 - Recrutamento de neutrófilos em animais MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> . ....	43
Figura 4.13 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com rapamicina e estimulados com leptina.....	44
Figura 4.14 – Aumento de peso, glicemia e adiposidade induzidas por dieta hiperlipídica. ...	46
Figura 4.15 – Ingesta calórica e leptinemia resultantes de dieta hiperlipídica. ....	47
Figura 4.16 –Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de animais obesos e não-obesos estimulados com leptina.....	50
Figura 4.17 – Níveis plasmáticos e intraperitoneais de leptina em animais obesos e não-obesos, estimulados e não-estimulados com leptina. ....	51
Figura 4.18 – Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina para a cavidade peritoneal de animais obesos.....	52
Figura 4.19 – Níveis intraperitoneais de TNF- $\alpha$ em animais obesos estimulados ou não com leptina. ....	53

## SUMÁRIO DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 3.1 – Teor nutricional (porcentagem de Kcal/Kg) .....	23
Tabela 3.2 – Composição .....	24
Esquema 6.1 – Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina .....	65

# **1. Introdução**

## 1.1. Obesidade

Obesidade é uma patologia crescente no mundo. O estilo de vida adotado pela sociedade ocidental desde o século XX, desencadeado pelo desenvolvimento econômico-tecnológico, promoveu mudanças comportamentais na relação entre obtenção de alimentos e consumo energético pelo organismo. O hábito alimentar baseado em alto teor calórico e baixa qualidade nutricional, associado à redução da intensidade de atividades físicas, promove saldo calórico excedente no organismo, que é armazenado no tecido adiposo. O aumento de massa de tecido adiposo a ponto de provocar problemas de saúde e aumentar a mortalidade é o que, em linhas gerais, caracteriza a obesidade (Wells, 2012).

O aumento da incidência de obesidade na população global levou a Organização Mundial de Saúde a iniciar atividades de combate à epidemia de obesidade na década de 1990 (World Health Organization 2000). Em 2008, foi estimado que 1,4 bilhões de pessoas acima de 20 anos de idade estavam acima do peso; destes, cerca de 500 milhões sendo obesos (World Health Organization, 2012). O aumento de incidência de obesidade vem acompanhado de outras patologias, como síndrome metabólica e diabetes tipo 2. A obesidade tanto contribui quanto é influenciada por ambas patologias, de modo que estas são fatores de co-morbidade e não podem ser completamente dissociados da patologia da obesidade.

Síndrome metabólica é um complexo de alterações metabólicas inter-relacionadas que promovem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes. Alberti *et al.* (2009) estabeleceram como critérios de diagnóstico da síndrome metabólica a presença de 3 dentre os 5 seguintes fatores: elevação da glicemia de jejum, hipertensão arterial, elevados níveis plasmáticos de triglicéridios e reduzidos de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) e adiposidade central (aumento da circunferência da cintura). Apesar da relação clínica entre estes fatores ser evidente, a patogênese destas alterações não é completamente esclarecida.

Recentemente, tem sido discutida a participação da resistência à insulina como fator integrador das alterações presentes na síndrome metabólica (Alberti *et al.*, 2009). O diabetes tipo 2 é caracterizado pela incapacidade da insulina induzir absorção tecidual de glicose e redução da glicemia. O aumento gradual crônico dos níveis de insulina é acompanhado de resistência aos seus efeitos em tecidos-alvo, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, de modo que níveis mais altos de insulina são necessários para promover a homeostase. A redução da sensibilidade hepática e periférica à insulina leva a alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, que posteriormente resultam nas características da síndrome metabólica. No entanto, não se pode afirmar que a resistência à



insulina é a única causadora destes efeitos, uma vez que indivíduos não-diabéticos podem apresentar síndrome metabólica ou obesidade.

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. O aumento da massa de tecido adiposo leva à maior liberação de ácidos graxos livres na circulação, assim como a presença de resistência do tecido adiposo à insulina reduz a captação tecidual de ácidos graxos. Ácidos graxos circulantes em níveis aumentados levam ao acúmulo de lipídios no músculo esquelético e no fígado, potencializando a hiperglicemia e a hiperinsulinemia. Assim, por meio da desregulação do metabolismo, especialmente o lipídico, a obesidade contribui para ambas patologias, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Boden, 2008).

O tecido adiposo não é apenas local de armazenamento de gordura, mas atua também como órgão endócrino (Kershaw & Flier, 2004; Siiteri, 1987). O tecido adiposo secreta uma variedade de peptídios bioativos chamados adipocinas ou adipocitocinas, que atuam como citocinas, quimiocinas e hormônios. Assim, o aumento de massa do tecido adiposo apresenta papel fundamental nas alterações metabólicas observadas na obesidade, pois eleva os níveis de adipocinas secretadas, dentre as quais, a leptina. Leptina foi a primeira adipocina descrita pela literatura, sendo de imediato associada à obesidade (Zhang *et al.*, 1994). A leptina é um regulador do estado nutricional do organismo, cujo papel é manter o peso corporal por meio da inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético. Em indivíduos obesos, são observados níveis plasmáticos elevados de leptina; no entanto, a hiperleptinemia não intensifica o efeito hipotalâmico de inibição do apetite, o que caracteriza o quadro de resistência central à leptina (Considine *et al.*, 1996, Frederich *et al.*, 1995). A regulação do metabolismo é observada tanto pela ação no hipotálamo quanto pela ação periférica da leptina em diferentes tecidos, inclusive tecidos-alvo da insulina, como fígado e músculo esquelético (Löllmann *et al.*, 1997). Desta forma, observa-se que a leptina é o mecanismo-chave do controle da ingestão alimentar, mostrando que a obesidade não é um distúrbio de comportamento alimentar de caráter psicológico.

A obesidade é caracterizada por elevação de citocinas pró-inflamatórias na circulação e nos tecidos. O aumento de tecido adiposo resulta em alteração dos níveis circulantes e teciduais de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , que, ao ser produzido pelo tecido adiposo obeso, contribui para a inflamação tecidual e sistêmica. Além disto, a leptina possui atividade reguladora do sistema imune, o que, na obesidade, pode resultar nas alterações nas respostas imunes inata e adaptativa, ainda não completamente esclarecidas (Elks & Francis, 2010). Desta forma, a obesidade é um estado de inflamação subclínica, caracterizada pela ativação crônica do sistema imune inato. Esta condição contribui para a

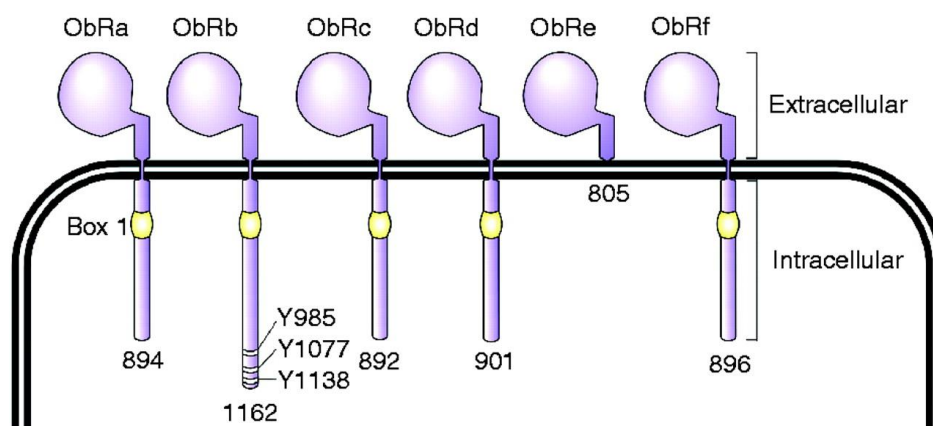
deficiência de resposta imune a agentes infecciosos e aumenta a mortalidade de indivíduos obesos.

## 1.2. Leptina

A descoberta, na década de 1950, de mutações em camundongos que levavam à hiperfagia e obesidade sugeriu a ocorrência de mecanismos fisiológicos relacionados à regulação do peso corporal. Na década de 1970, Coleman (Coleman & Hummel, 1969, Coleman, 1973) postulou a presença de um “fator solúvel” atuando como hormônio, fazendo o elo entre tecido adiposo e hipotálamo para regular o apetite. Assim, o estudo da obesidade e do papel da leptina por meio de modelos murinos contribuiu para a compreensão dos eventos biológicos observados na obesidade humana.

A leptina é uma proteína de 16 kD identificada em 1994 como o produto do gene *ob* (Zhang *et al.*, 1994). Até então, sabia-se que o gene *ob* (de *obese*) era importante para o desenvolvimento da obesidade, uma vez que animais *ob/ob*, com mutação recessiva autossômica deste gene, apresentavam obesidade espontânea, hiperfagia e redução do gasto energético (Ingalls *et al.*, 1950). Em um estudo clássico, experimentos de parabiose com animais *ob/ob* e *db/db* (de *diabetes*) sugeriram que *db/db* expressam leptina mas não possuem seu receptor, reforçando a importância da sinalização por leptina (Coleman & Hummel, 1969, Coleman, 1973). Assim, animais *db/db*, que possuem mutação recessiva autossômica no gene do receptor de leptina, apresentam as mesmas características de obesidade dos animais *ob/ob*, além de severa diabetes (Hummel *et al.*, 1966). Apenas em 1995 foi caracterizado o produto do gene *db*, o receptor de leptina ObR (Chen *et al.*, 1996, Tartaglia *et al.*, 1995).

O receptor de leptina (ObR) possui 6 isoformas descritas até o momento (Figura 1.1), resultantes de *splicing* alternativo. Todas as isoformas ObRa-f possuem a mesma sequência peptídica no domínio extracelular e transmembrana (Tartaglia, 1997), exceto a isoforma solúvel ObRe que, por não possuir a sequência da região transmembrana, é secretado (Löllmann *et al.*, 1997). O receptor ObRb é a isoforma longa, que apresenta domínios intracelulares necessários para a associação a proteínas tirosina-quinases. Os receptores ObRa, ObRc, ObRd e ObRf são chamados de isoformas curtas, por não apresentarem toda a sequência intracitoplasmática. Apesar de não realizarem transdução de sinal como ObRb, os receptores de forma curta estão envolvidos na promoção de alguns efeitos da leptina, por mecanismos de transdução de sinal não completamente esclarecidos. O receptor ObRb é altamente conservado entre espécies de mamíferos, enquanto o receptor ObRf só foi descrito até o momento em ratos (Porzionato *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 1996).



**Figura 1.1 – Isoformas do receptor de leptina, ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf.**

Fonte: Marroqui et al. J Mol Endocrinol, 2012.

ObRb é o receptor responsável pelos principais efeitos da leptina. É por meio desta isoforma que a leptina promove a inibição da ingestão alimentar, uma vez que este é altamente expresso no hipotálamo. Após ser produzida pelo tecido adiposo, a leptina é liberada na circulação, alcançando diferentes tecidos. Para promover inibição do apetite, sua função biológica primordial, a leptina é transportada pela barreira hemato-encefálica, alcançando o sistema nervoso central. A leptina sinaliza em neurônios hipotalâmicos: sua ligação ao receptor ObRb ativa neurônios anorexigênicos, que aumentam a expressão dos chamados peptídeos anorexigênicos, como  $\alpha$ -MSH, CRH, CART, que levam à sensação de saciedade; sua ligação a ObRb em neurônios orexigênicos inibe-os, diminuindo a expressão gênica de peptídeos orexigênicos que aumentam a fome, como o neuropeptídeo Y (NPY). Em conjunto, esta mudança no balanço de peptídeos resulta na inibição do apetite (Friedman & Halaas, 1998).

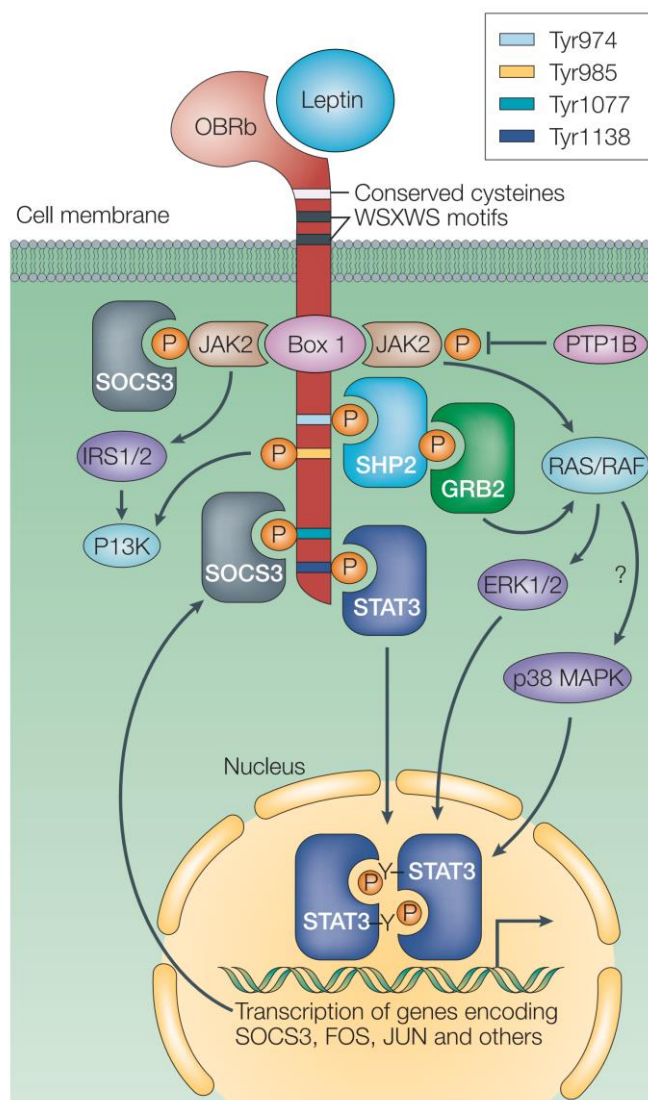
### 1.2.1. Sinalização da leptina

A leptina comanda o metabolismo não só através do sistema nervoso central, mas também pelo contato direto com tecidos-alvo periféricos, como tecido adiposo, células beta-pancreáticas, fígado e músculo esquelético, que expressam o receptor ObRb em menor intensidade que o hipotálamo. Como outros receptores da superfamília classe I de receptores de citocinas, ObRb promove transdução de sinal pela associação às proteínas tirosina-

quinases JAK e STAT. Como observado na Figura 1.2, a porção citoplasmática do receptor ObRb possui domínios de acoplamento de JAK (BOX1 e BOX2) e domínios necessários para a sinalização de STAT3, como BOX2 e sequência consenso YXXQ (ou motivo STAT).

Assim, a ligação de leptina a ObRb promove uma mudança conformacional na porção citoplasmática do receptor, que permite o acoplamento de JAKs. A ativação de JAK2 ocorre por transfosforilação e subsequente fosforilação de resíduos de tirosina na porção citoplasmática do receptor. Os resíduos fosforilados permitem então a associação de diferentes substratos, o que determina a capacidade da leptina ativar múltiplas vias de transdução de sinal. Assim, ObRb promove ativação de vias como JAK2/STAT3, PI3K/Akt/mTOR e SHP2/MAPK, dentre outras. No hipotálamo, após a associação de STAT3 ao receptor, este dissocia-se formando dímeros ativos, que são translocados para o núcleo, onde promovem regulação da expressão gênica (Bahrenberg *et al.*, 2002).

Em paralelo à via JAK2/STAT3, a leptina ativa PI3K/mTOR em diferentes tipos celulares. mTOR atua como um sensor do estado nutricional/enérgico intracelular e sistêmico, sinalizando ambiente rico em nutrientes capaz de suprir as demandas de síntese proteica, metabolismo e crescimento celular. A leptina sinaliza via mTOR não apenas no hipotálamo, mas em outros tecidos, inclusive leucócitos (Cota *et al.*, 2006, Galgani *et al.*, 2010, Maya-Monteiro *et al.*, 2008, Mezey *et al.*, 2005). A atuação de mTOR se contrapõe à de AMPK, que é ativada quando há aumento de AMPc intracelular, indicando redução nutricional/energético. Assim, a via de AMPK também participa da sinalização da leptina, podendo ser inibida em paralelo à ativação de mTOR, como ocorre no hipotálamo ou ativada, como ocorre em tecido muscular esquelético (Bjørbaek & Kahn, 2004).



**Figura 1.2 – Vias de sinalização ativadas pelo receptor de leptina, ObRb.**

A figura ilustra algumas das vias de sinalização ativadas por ObRb, inclusive as vias JAK2/STAT3 PI3K, descritas no corpo do texto.

Fonte: La Cava A. & Matarese G. Nature Reviews Immunology, 2004.

Já as isoformas curtas do receptor de leptina, especialmente ObRa, são expressas de forma ubíqua e em maior quantidade do que ObRb, exceto no hipotálamo. Estas isoformas apresentam o domínio BOX1, permitindo a associação de JAK2, sem no entanto ativar STAT3, uma vez que não há presença dos demais domínios necessários. Foram descritas até o momento a participação dos receptores de forma curta em atividades de transporte de leptina por transcitose em células endoteliais da membrana hemato-encefálica (Tu *et al.*, 2010) e endocitose de leptina (Tu *et al.*, 2007), contribuindo para a captura de leptina circulante (Uotani *et al.*, 1999). Já ObRe, sendo uma isoforma solúvel, atua imobilizando a leptina circulante, o que regula a disponibilidade de leptina e sua permeabilidade pela barreira hemato-encefálica (Ge *et al.*, 2002, Löllmann *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 2008). Estes trabalhos mostram efeitos celulares da leptina por meio de isoformas curtas, apesar de não terem sido demonstradas a ativação e sinalização por estes receptores. Assim, a variedade de isoformas do receptor de leptina, bem como a expressão tecido-específica dos mesmos, resultam em diferentes efeitos biológicos da leptina e demonstram seu efeito pleiotrópico.

### **1.3. Efeitos da leptina no sistema imune**

A leptina atua no sistema imune tanto por modular o eixo neuro-imuno-endócrino, quanto sinalizando diretamente sobre leucócitos. Em modelo murino de sepse, por exemplo, a deficiência de leptina promove resposta imune deficiente e mortalidade aumentada, principalmente por resposta neutrofílica prejudicada, sendo a resposta imune e a sobrevivência restauradas pelo tratamento intracerebroventricular com leptina (Tschöp *et al.*, 2010). Também por meio do SNC, a leptina é capaz de regular a função de macrófagos, promovendo infiltração destas células em modelo murino de lesão renal crônica (Tanaka *et al.*, 2010). Como as condições de jejum e subnutrição diminuem os níveis plasmáticos de leptina, a reposição de leptina no SNC promove recuperação do desenvolvimento de linfócitos B, prejudicado em animais submetidos a jejum prolongado (Tanaka *et al.*, 2011). Estes estudos demonstram que a atuação da leptina sobre o sistema nervoso central tem a capacidade de regular o sistema imune, promovendo seu bom desempenho.

A participação da leptina sobre o sistema imune também é demonstrada por meio de efeitos diretos sobre os leucócitos que apresentam ObRb, como células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos B cells, e monócitos/macrófagos (Papathanassoglou & El-Haschimi, 2006). Ao comparar o efeito da leptina sobre a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, foi demonstrado que, além do efeito via SNC, existe um efeito preferencial da leptina sobre linfócitos T CD4<sup>+</sup> por estes apresentarem maior expressão de receptores ObRb do que as

células T CD8 (Kim *et al.*, 2010, Lord *et al.*, 1998). Além disso, a leptina promove proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas *in vitro* por meio de seu receptor funcional (Gainsford *et al.*, 1996).

O envolvimento da leptina na resposta imune inata é constatado também pela observação de que níveis inadequados de leptina resultam em resposta imune prejudicada. Em modelo de infecção pulmonar com animais submetidos a jejum agudo, há menor *clearance* bacteriano devido à menor migração de neutrófilos e reduzida capacidade fagocítica de macrófagos; o tratamento com leptina corrige tais defeitos (Mancuso *et al.*, 2006). A ausência da sinalização por leptina, desta vez em animais obesos diabéticos *db/db*, os predispõem à infecção de pata (Park *et al.*, 2009).

De um modo geral, processos inflamatórios regulados de maneira adequada favorecem a sobrevivência e o retorno do organismo à homeostase. Apesar de muitas vezes a leptina ser considerada como facilitadora da resposta imune, favorecendo a sobrevivência, patologias de diferentes etiologias podem ser atenuadas ou agravadas dependendo do efeito regulatório da leptina sobre a resposta inflamatória. Em modelo de sepse, por exemplo, o processo inflamatório exacerbado causa morbidade e mortalidade, enquanto a resposta inflamatória moderada, mas não amena, favorece a sobrevivência (Matsuda *et al.*, 2012). O trabalho de Shapiro *et al.* (2010) mostra que leptina é capaz de aumentar a mortalidade, aparentemente contradizendo o trabalho de Tschöp *et al.* (2010), citado anteriormente. Além disso, Strandberg *et al.* (2009) demonstram que animais obesos por dieta hiperlipídica apresentam mortalidade aumentada em modelo de sepse. Modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica reproduzem hiperleptinemia e resistência à leptina observadas na obesidade humana. Assim, estes trabalhos sugerem, em conjunto, mecanismos de ação diferentes, sendo a ação central da leptina favorável à sobrevivência, enquanto níveis aumentados de leptina circulante e/ou no sítio inflamatório são prejudiciais neste modelo.

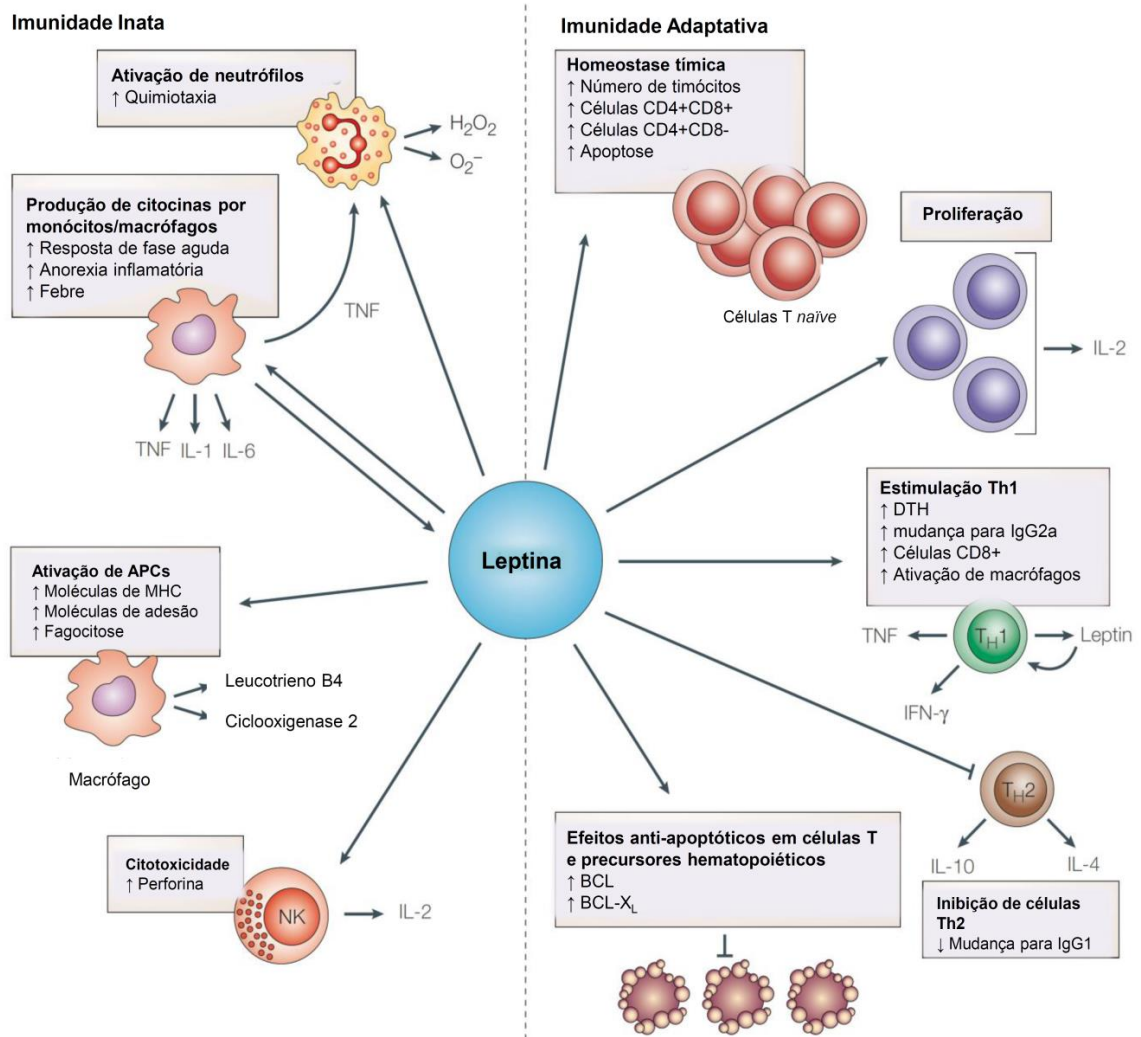
A importância da leptina no sítio inflamatório é evidente em modelos de inflamação pulmonar, tanto infecciosos quanto não-infecciosos. A presença aumentada de leptina no tecido e no lavado pulmonar modula o processo inflamatório induzido por fumaça de cigarro, bem como melhora a remoção de bactérias do pulmão (Bellmeyer *et al.*, 2007, Bruno *et al.*, 2011, Lemos *et al.*, 2011, Mancuso, 2012). Indivíduos obesos e asmáticos apresentam maior presença de leptina no lavado pulmonar do que indivíduos obesos ou asmáticos, sugerindo uma relação entre ambas patologias, ainda não completamente esclarecida (Lugogo *et al.*, 2012).

O efeito da leptina sobre o sistema imune adaptativo é complexo. A literatura tem indicado seu envolvimento na regulação de subpopulações de células T. Sabe-se que a

ausência de leptina na subnutrição inibe a expansão clonal de células T *helper* (Th), promovendo aumento na razão de células Treg:Th, mecanismo este que resulta em menor eficiência da imunidade adaptativa no combate a agentes infecciosos. Já na obesidade, a leptina parece promover a replicação de células Th enquanto inibe populações de células Treg, o que resulta em resposta inflamatória Th1 mais intensa devido à maior dificuldade de retorno à homeostase. A alteração na razão de subpopulações de células T associa a leptina à predisposição de indivíduos obesos a doenças auto-imunes, devido à manutenção de células T auto-reativas (La Cava & Matarese, 2004, Galgani *et al.*, 2010, Lord *et al.*, 1998, Mattioli *et al.*, 2005, Procaccini *et al.*, 2011). Esta desregulação também permite o estabelecimento de atopias, uma vez que existem relatos de favorecimento de respostas de fenótipo Th2, de maneira ainda não plenamente compreendida. De fato, a incidência de doenças auto-imunes e alérgicas em países desenvolvidos têm aumentado, concomitantemente ao aumento da incidência de obesidade, enquanto que países subdesenvolvidos apresentam incidência baixa e constante nas últimas décadas. Têm-se discutido a possibilidade de fatores ambientais, como a ingestão alimentar hipercalórica e rica em lipídios, a menor exposição a infecções na infância (“hipótese da higiene”) e alteração da microbiota intestinal em ambientes urbanos de países desenvolvidos favorecerem respostas imunes de perfil Th2 em detrimento de respostas Th1. No entanto, a maneira como leptina e obesidade estão envolvidas no desenvolvimento destes distúrbios do sistema imune não está completamente estabelecido, não sendo suficiente para explicar tais eventos epidemiológicos (Black, 2001, Fernandes, 1994, Yazdanbakhsh *et al.*, 2001).

A figura 1.2 resume as diferentes atividades da leptina nas células do sistema imune. Como podemos observar, na imunidade adaptativa, a leptina afeta a geração, maturação e sobrevivência de células T: a leptina aumenta a proliferação de células T *naïve*; promove a indução de respostas Th1 por células T de memória; e apresenta efeitos anti-apoptóticos em precursores hematopoiéticos e células T maduras. No sistema imune inato, a leptina pode ativar tanto macrófagos quanto neutrófilos direta ou indiretamente, o que será discutido a seguir.





**Figura 1.3 – Efeitos da leptina na imunidade inata e adaptativa.**

Adaptado de: La Cava A. & Matarese G. Nature Reviews Immunology, 2004.

### 1.3.1. Leptina e macrófagos

Macrófagos são as primeiras células do sistema imune inato a serem acionadas por “sinais de perigo”, isto é, estímulos patogênicos ou fisiológicos que indicam potencial de infecção ou lesão tecidual. Ao contato com LPS (lipopolissacarídeo), componente de parede de bactérias gram-negativas, um típico indutor de ativação pró-inflamatória, macrófagos secretam citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, dentre outros mediadores, bem como apresentam potencial fagocítico e bactericida. Além disso, macrófagos também são responsivos ao microambiente tecidual em que se encontram, e por isso podem apresentar alterações quando submetidos às condições de obesidade (Shapiro *et al.*, 2011).

Na obesidade, o tecido adiposo não só se apresenta inflamado como também induz uma ativação crônica do sistema imune inato. Com o ganho de massa, adipócitos secretam citocinas, como MCP-1 (CCL2), que recrutam macrófagos para o tecido adiposo. Além disso, a leptina contribui para o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo, uma vez que aumenta a expressão de receptores de CC-quimiocinas, como CCR2, receptor de MCP-1, contribuindo para o influxo de macrófagos no tecido adiposo (Kanda *et al.*, 2006, Kiguchi *et al.*, 2009). Apesar da leptina exercer efeito quimiotático sobre monócitos e macrófagos (Gruen *et al.*, 2007), não é responsável pelo recrutamento para o tecido adiposo (Gutierrez & Hasty, 2011). Estes macrófagos, então em contato com adipócitos, secretam TNF- $\alpha$  e IL-6, contribuem para a promoção de um estado inflamatório brando ou subclínico (Li & Renier, 2007).

A biologia de macrófagos na obesidade tem sido estudada não só por sua infiltração do tecido adiposo, mas também pela participação em lesões ateroscleróticas e por ser uma das células da resposta imune reguladas por leptina por meio do receptor ObRb. Leptina regula o metabolismo de colesterol em macrófagos, além de promover seu acúmulo intracelular via JAK2 e PI3K (Hongo *et al.*, 2009, O'Rourke *et al.*, 2001, 2002). Nosso grupo vem estudando o metabolismo lipídico de macrófagos em condições de estimulação patogênica e/ou pró-inflamatória. Recentemente, demonstramos que o acúmulo lipídico induzido por leptina favorece a produção de LTB<sub>4</sub> após o estímulo com ionóforo de cálcio (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Como o acúmulo lipídico em macrófagos muitas vezes está associado à seu estado de ativação, sugerimos então que este é um dos mecanismos pelos quais a leptina promove resposta inflamatória. De fato, a leptina ativa macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , além de incrementar o efeito inflamatório de LPS (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001).

Assim, tem sido investigado o papel da leptina sobre as funções biológicas de macrófagos, tais como regulação do metabolismo lipídico, síntese de mediadores inflamatórios lipídicos e proteicos e a capacidade de resposta a agentes patogênicos. Ao mesmo tempo, tem sido observado o papel da leptina na regulação do microambiente no qual os macrófagos estão inseridos, isto é, de características particulares de sítios inflamatórios, microambiente tumoral ou tecido adiposo, que contribuem com o efeito da leptina na modulação de macrófagos.

### **1.3.2. Leptina e neutrófilos**

Neutrófilos são células do sistema imune inato que prontamente deixam a circulação e migram para o sítio inflamatório em resposta aos primeiros sinais de invasão por microorganismos ou de lesão tecidual, tais como partículas microbianas, como LPS e fMLP, bem como mediadores pró-inflamatórios secretados por macrófagos residentes ativados. Mediadores como TNF- $\alpha$ , CXCL1/KC e LTB<sub>4</sub> promovem o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. No local, sua função primária é eliminar microorganismos, sofrendo apoptose em curto período de tempo, evento que contribui para a resolução da resposta inflamatória e retorno à homeostase. Assim, neutrófilos participam tradicionalmente da fase aguda do processo inflamatório.

Os efeitos da leptina sobre leucócitos têm sido atribuídos à presença de ObRb nestas células. No entanto, a literatura descreve até o momento que neutrófilos humanos e de roedores apresentam apenas isoformas curtas, mas não ObRb. Ainda assim, alguns trabalhos têm sugerido efeitos diretos da leptina ao demonstrarem sua capacidade de induzir produção de espécies reativas de oxigênio e retardar apoptose em neutrófilos humanos isolados de sangue periférico, bem como estimular a capacidade fagocítica de neutrófilos murinos *in vitro* (Bruno *et al.*, 2005, Caldefie-Chezet *et al.*, 2001, 2003, Moore *et al.*, 2003). Além disso, a literatura tem demonstrado que a regulação de funções biológicas de neutrófilos é um dos mecanismos pelos quais a leptina coordena a resposta imune. Animais submetidos a jejum apresentam recuperação na migração de neutrófilos para o pulmão após tratamento com leptina (Mancuso *et al.*, 2006). O tratamento de animais *ob/ob* com leptina melhora a eliminação bacteriana e aumenta a sobrevivência em modelo de infecção pulmonar, por meio da recuperação da produção de peróxido de hidrogênio e eliminação bacteriana por neutrófilos (Hsu *et al.*, 2007).

A expressão pulmonar de leptina é aumentada em fumantes com DPOC, bem como assintomáticos (Vernooy *et al.*, 2009). Além disso, leptina modula o recrutamento de

leucócitos/neutrófilos para o pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro (Vernooy *et al.*, 2010). O processo inflamatório pulmonar e sistêmico em indivíduos ex-fumantes com quadro de DPOC é agravado em indivíduos que apresentam maior presença de leptina e seu receptor no parênquima, pois estes apresentam também maior infiltração neutrofílica (Bruno *et al.*, 2011).

Estes estudos demonstram que, tanto em patologias de etiologia patogênica e não-patogênica, a leptina modula o recrutamento e a capacidade de eliminar patógenos. De fato, a obesidade mórbida promove um estado de ativação contínua do sistema imune inato, em que neutrófilos circulantes destes indivíduos estão mais ativados do que em não-obesos, apresentando mais MPO, calprotectina e maior expressão de CD66b, que atua na adesão e recrutamento (Nijhuis *et al.*, 2009). Além disso, modelo de hiperleptinemia associada à estresse em ratos demonstra maior produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (Caldefie-Chézet *et al.*, 2006).

Os trabalhos mais expressivos quanto à capacidade da leptina apresentar ação quimiotática de neutrófilos são conflitantes. Estudos de Caldefie-Chezet *et al.* (2001, 2003) demonstraram que leptina é capaz de induzir quimiotaxia em neutrófilos humanos (Caldefie-Chezet *et al.*, 2001, 2003). Os estudos de Ottonello *et al.* (2004) e Montecucco, Bianchi, Gnerre *et al.* (2006) mostraram que leptina por si só é quimioatraente para neutrófilos circulantes humanos, por meio da ativação de p38 e Src quinases, conhecidas por participarem da locomoção de neutrófilos pela polimerização de F-actina (Montecucco, Bianchi, Gnerre, *et al.*, 2006, Ottonello, 2004). Dados parcialmente contraditórios a estes demonstram que a leptina é capaz de induzir a ativação de neutrófilos *in vitro*, tal como a indução de expressão de CD11b, via TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos, não sendo capaz de exercer efeito direto (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2004).

Efeitos indiretos da leptina sobre a ativação neutrófilos, por meio do envolvimento de TNF- $\alpha$ , sugerem que também a capacidade quimiotática possa ocorrer de forma indireta (Rafail *et al.*, 2008). Considerando que mediadores quimiotáticos são produzidos por estímulo de leptina, é possível que estes também participem do recrutamento de neutrófilos em resposta à leptina. Apesar de muitos trabalhos demonstrarem que a leptina é capaz de interferir no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, não existe evidência de que leptina *per se* seja capaz de induzir migração de neutrófilos *in vivo*. Assim, este trabalho propõe o estudo dos efeitos da leptina enquanto estímulo pró-inflamatório agudo, indutor de recrutamento neutrofílico em camundongos.

Apesar da crescente incidência de obesidade na população mundial nas últimas décadas e do aumento do interesse da comunidade científica acerca da patologia da obesidade,

não há consenso na literatura sobre o efeito da elevação crônica dos níveis de leptina sobre leucócitos. A investigação dos mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos peritoneais, bem como a caracterização do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, implicam na descrição da sinalização pro-inflamatória *in vivo* de leptina sobre leucócitos. Tal conhecimento se torna um parâmetro sem o qual não se pode determinar como a leptina é capaz de participar de sinalização cruzada com outros agentes quimiotáticos, inibindo-os e prejudicando o funcionamento da resposta imune inata. Desta maneira, com este trabalho espera-se contribuir para o melhor entendimento da participação da leptina nas funções imunológicas relacionadas à obesidade e, por associação, à síndrome metabólica e diabetes.

## **2. Objetivos**

## **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar *in vivo* o recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.

## **2.2. Objetivos específicos**

i) Avaliar a participação dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , KC, LTB<sub>4</sub> e MIP-1 $\alpha$  no recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.

ii) Avaliar a participação de PI3K $\gamma$  e mTOR na sinalização intracelular envolvida no recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.

iii) Avaliar o recrutamento de neutrófilos por leptina em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

### **3.Materiais e métodos**



### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 e camundongos geneticamente modificados *knockout* TNFR1<sup>-/-</sup>, MIP-1α<sup>-/-</sup> e 5-LO<sup>-/-</sup> (*background* C57Bl/6) provenientes do Centro de Experimentação Animal (CECAL) da FIOCRUZ, bem como animais PI3Kγ<sup>-/-</sup> (*background* C57Bl/6 x sv129), cedidos pelo Dr. Mauro Teixeira (Instituto de Ciências Biológicas UFMG). Os animais pesavam cerca de 20-25g e foram mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28°C, ciclo de luz de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e livre acesso à ração e água, no biotério do Pavilhão Osório de Almeida, bem como do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira. Os animais foram vermifugados com Ivomec (uso tópico) e Ptzi Plus (20 mL/animal via oral), sendo os experimentos iniciados uma semana após a vermifugação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA (Licenças L002/08 e LW 36/10).

### 3.2. Tratamento

#### 3.2.1. Leptina

***In vivo:*** Após jejum *overnight* (18 h) para redução dos níveis basais circulantes de leptina, foi feita injeção intraperitoneal (i.p.) com 100-200 μL de 0,5 mg/Kg, 1 mg/Kg, 1,5 mg/Kg ou 2 mg/Kg de leptina, sendo salina estéril apirogênica i.p. em igual volume como controle. Todos os ensaios foram realizados com leptina murina recombinante (Peprotech Inc.), diluída em água apirogênica estéril para armazenamento de alíquotas em freezer -20°C, conforme instruções do fabricante. Para o uso, as alíquotas foram diluídas no dia do experimento em salina 0,9% apirogênica estéril para ajuste do volume e dose. Após a injeção, os animais foram mantidos em jejum por 1, 6 ou 24 h e livre acesso à água. Após este período, foram realizadas a medição de glicemia (One Touch Ultra, Johnson & Johnson Medical) nos ensaios pertinentes, e a eutanásia, para posterior recolhimento de amostras.

***In vitro:*** Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57Bl/6 *naïve* por meio de lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de HBSS gelado. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram incubadas por 4h com 20 nM de leptina murina recombinante (Peprotech Inc.), em tubos de 1,5 mL (10<sup>6</sup> células/mL), sendo mantidos na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640 com 2% de soro fetal bovino. Ao fim do experimento, o sobrenadante foi recolhido após centrifugação a 1500 rpm por 10

min, a 4°C e armazenado a -20°C para posterior dosagem de KC e TNF- $\alpha$ . A viabilidade celular (> 85%) foi determinada pela exclusão com azul de tripano.

### **3.2.2. Rapamicina**

Os animais receberam 3 injeções i.p. de rapamicina (Sigma) 15  $\mu$ g/Kg, sendo 12 h e 15 min antes e 12 h após a estimulação com leptina. Salina estéril apirogênica contendo DMSO (no máximo 60  $\mu$ L/mL) i.p. em igual volume foi utilizada como controle. O lavado peritoneal foi recolhido 24 h após a injeção de leptina.

### **3.2.3. Zileuton**

Os animais receberam 60  $\mu$ g/animal i.p. de Zileuton (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 15 min antes da injeção de leptina. Zileuton foi diluído em DMSO e, em seguida, em salina 0,9% apirogênica estéril para ajuste do volume e dose. Os controles receberam injeção de DMSO em salina (no máximo 70  $\mu$ L/mL).

### **3.2.4. U-75302**

Os animais foram tratados com 5 mg/Kg de U-75302 (Cayman Chemical), 15 min antes da injeção de leptina. U-75302 foi diluído em DMSO para o preparo da solução estoque, armazenada em alíquotas em freezer -80°C. Para o uso, as alíquotas foram diluídas no dia do experimento em salina 0,9% apirogênica estéril para ajuste do volume e dose. Os controles receberam injeção de DMSO em salina (no máximo 70 $\mu$ L/mL).

### **3.2.5. Anticorpos anti-KC**

O tratamento foi feito com 3 ng/animal i.p. de anticorpos anti-KC murino (Peprotech Inc.), 10 min antes da injeção i.p. de leptina. Como controle da especificidade do anticorpo, foi feita injeção i.p. com isotipo IgG de coelho (Peprotech Inc.), na mesma dose e volume do anticorpo, 10 min antes da injeção de leptina.

### **3.3. Obtenção do lavado peritoneal**

O lavado peritoneal foi feito pela injeção de 3 mL de solução salina 0,9% estéril gelada na cavidade, sendo seu conteúdo recolhido posteriormente. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída na proporção de 1:40 ou 1:20 em solução de Turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise de hemácias e coloração dos leucócitos. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e o resultado expresso em milhões de células por mL. A seguir,  $10^5$  células foram citocentrifugadas a 500 rpm (aparelho Cytospin 3, fabricante Shandon) por 5 min para posterior coloração por May-Grünwald-Giemsa (para contagem diferencial da população da cavidade peritoneal) ou tetróxido de ósmio (para contagem de corpúsculos lipídicos presentes nestas células).

Do lavado peritoneal restante, foi feita centrifugação a 1500 rpm por 10 min, a 4°C, para obtenção do sobrenadante, armazenado a -20°C para posterior quantificação de KC, TNF- $\alpha$  e leptina.

### **3.4. Contagem diferencial**

Após citocentrifugação, células peritoneais depositadas sobre lâminas de vidro foram submersas por 15 min em solução May-Grünwald, para fixação e coloração nuclear, e 1 h em solução Giemsa, para coloração citoplasmática e de grânulos eosinofílicos. As células foram submetidas a contagem diferencial de mononucleares, neutrófilos e eosinófilos, no total de 100 células por animal, por microscopia óptica, no aumento de 100x. Os resultados foram expressos pela média, por grupo experimental, do número absoluto do tipo celular na cavidade peritoneal.

### **3.5. Quantificação de corpúsculos lipídicos**

Corpúsculos lipídicos ficam evidentes em microscopia óptica de imersão quando corados com tetróxido de ósmio, devido à marcação de fosfolipídios que compõem sua hemimembrana. Após a citocentrifugação, as células foram fixadas em formaldeído a 3,7% em PBS (pH 7,4) por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram coradas com tetróxido de ósmio a 1,5% em ácido cacodílico (pH 7,4) por 30 min. Foi feita lavagem em água destilada e incubação com tiocarbohidrazida a 1% em água, por 5 min, para redução de tetróxido de ósmio a ósmio molecular. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e novamente incubadas com tetróxido de ósmio 1,5%, por 3 min. Por fim, as lâminas foram

lavadas em água destilada. Após secas, as lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro, com objetiva de 100x. Foi feita a contagem de corpúsculos lipídicos por célula, em 50 células por animal. Os dados foram expressos pela média do grupo experimental.

### **3.6. Plasma**

Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção cardíaca, realizada imediatamente após a eutanásia dos animais, em seringa de 1 mL, contendo 100 µL de anticoagulante citrato, equivalente a 10% do volume total. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 min, recolhendo-se então o plasma obtido. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer -20°C para posterior quantificação de leptina.

### **3.7. Quantificação de KC, TNF- $\alpha$ , leptina e LTB<sub>4</sub>**

Amostras de plasma foram utilizadas para quantificação de leptina; sobrenadante de lavado peritoneal foi utilizado para dosagem de leptina, TNF- $\alpha$  e KC e LTB<sub>4</sub>; sobrenadante de experimento *in vitro* foi utilizado para dosagem de TNF- $\alpha$  e KC. As dosagens de leptina, TNF- $\alpha$  e KC foram realizadas utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D systems) e de LTB<sub>4</sub> com kit de EIA (Cayman). A leitura da placa foi feita a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa *Soft Max Pro*, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão.

### **3.8. Eicosacell**

Após a estimulação *in vivo*, foi feita a lavagem da cavidade peritoneal com solução EDAC 0,1% em HBSS com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. As células foram incubadas nesta solução por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a citocentrifugação (procedimento idêntico ao item 3.3). As células foram bloqueadas com BSA 1% em HBSS por 30 min em temperatura ambiente, depois incubadas com anticorpo primário por 18 h a 4°C overnight. Após 3 lavagens de 10 min com BSA 1% em HBSS, foi adicionado o anticorpo secundário por 1 h em temperatura ambiente por 1 h, protegido de luz. As lâminas foram lavadas por 10 min, 3 vezes, com BSA 1% em HBSS e cobertas com Vectashield e lamínula. As imagens foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus DX-60 e analisadas no programa CellF. Os anticorpos primários utilizados foram anti-LTB<sub>4</sub> (Cayman, anticorpo utilizado em EIA),

anti-ADRP (Fitzgerald) e respectivos isotipos para controle. Os anticorpos secundários utilizados foram Dy Light 488 (para anti-LTB<sub>4</sub>) e Dy Light 549 (para anti-ADRP).

### **3.9. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica:**

Para indução de obesidade, camundongos C57Bl/6 machos foram alimentados com ração hiperlipídica com teor calórico de 4728 kcal/Kg, das quais 60% são provenientes de gordura. O grupo controle não-obeso foi alimentado com ração controle de 3849 kcal/Kg, com 10% das calorias sendo provenientes de gordura. A ração foi fornecida pela empresa Prag Soluções Ltda (Jaú, SP, Brasil). Os animais foram submetidos à dieta com o peso inicial aproximado de 15-18g (cerca de 4 semanas), sendo mantidos em dieta por cerca de 16 a 18 semanas. Nas tabelas 3.1 e 3.2 podem ser observados, respectivamente, o teor nutricional e a composição da ração hiperlipídica e ração controle.

**Tabela 3.1 – Teor nutricional (porcentagem de kcal/Kg)**

	<b>DN</b>	<b>DH</b>
<b>Tipo de nutriente</b>	<b>% Kcal</b>	<b>% Kcal</b>
Proteínas	13	20
Carboidratos	77	20
Gordura	10	60

**Tabela 3.2 – Composição**

<b>Ingredientes</b>	<b>DN</b>		<b>DH</b>	
	<b>g</b>	<b>Kcal</b>	<b>g</b>	<b>Kcal</b>
Amido milho	510,7	2041	84,8	339
Amido dextrinizado	130	520	116,5	466
Sacarose	80	320	201,4	805
Óleo de soja	40	360	29,1	262
Banha	0	0	206,8	1862
Celulose	50	0	58,3	0
Caseína	140	560	233,1	932
L-cistina	1,8	7	3,5	14
Bitartarato de colina	2,5	0	2,3	0
Mix mineral	35	0	52,5	0
Mix vitamínico	10	40	11,7	47
<b>Total</b>	<b>1000,0</b>	<b>3849</b>	<b>999,9</b>	<b>4728</b>

### 3.10. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente no programa *GraphPad Prism*, através de análise de variância (*One Way Anova*) ou teste *t student*, com significância de  $p < 0,05$ .

## **4.Resultados**

## **Leptina induz recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal**

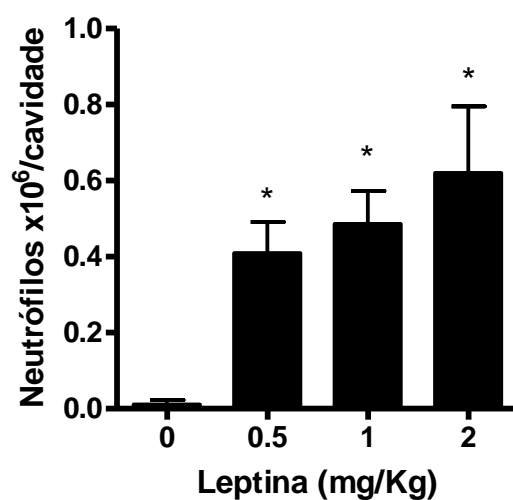
Inicialmente, foi feita a avaliação do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a injeção de diferentes doses de leptina i.p., em diferentes tempos de estimulação. O gráfico da Figura 4.1 mostra o número de células encontrado na cavidade peritoneal após estimulação de leptina i.p. nas doses 0,5, 1 e 2 mg/Kg em 24 h. Como pode ser observado na Figura 4.1, todas as doses de leptina foram capazes de induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

Uma vez averiguada a capacidade da leptina promover recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em 24 h em diferentes doses, foi feita a avaliação da cinética de migração de neutrófilos. Desta forma, animais C57Bl/6 foram estimulados com leptina 1 mg/Kg i.p., sendo a lavagem peritoneal realizada 1, 6 e 24 h após a estimulação. Pode ser observado na Figura 4.2 que leptina é capaz de induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em 1 h, sendo a migração mais intensa em 6 h e se mantendo ainda em 24 h. Em suma, a curva de tempo de migração de neutrófilos mostra uma cinética típica de processo inflamatório agudo, havendo resposta neutrofílica ao estímulo de leptina em curto tempo, resposta que alcança o pico em 6 h e que se mantém significativa até 24 h.

## **TNF- $\alpha$ participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina**

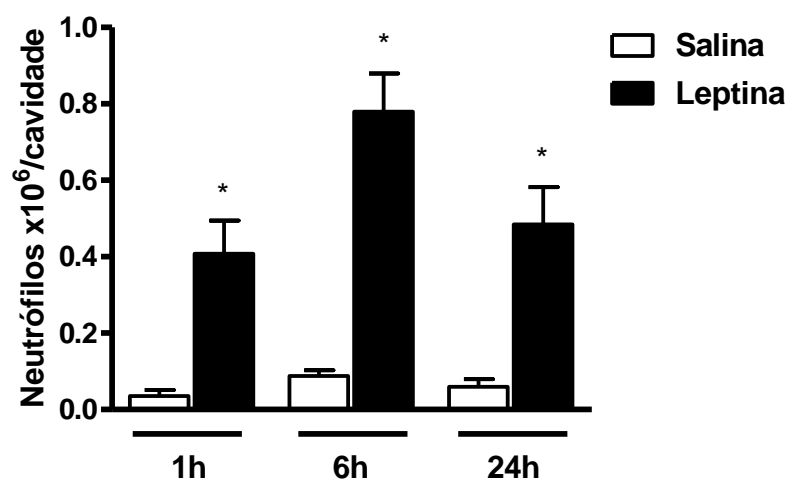
Como neutrófilos não possuem o receptor ObRb, alguns trabalhos têm mostrado que o efeito da leptina sobre neutrófilos parece ser dependente de atividade secundária, sugerindo uma atividade resultante da ativação de macrófagos e secreção de TNF- $\alpha$ . Foi investigada, então, a secreção de TNF- $\alpha$  induzida por leptina em células peritoneais. Para isso, o lavado peritoneal de camundongos foi obtido após 6 h de estímulo com 1mg/Kg i.p. de leptina, sendo o sobrenadante recolhido para a quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA. Como pode ser observado na Figura 4.3A, há presença de TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal após a estimulação com leptina. Foi investigada também a liberação de TNF- $\alpha$  por células peritoneais residentes, a maioria macrófagos, incubadas *in vitro* com leptina. Células peritoneais de camundongos não estimulados foram obtidas por meio de lavagem peritoneal e incubadas *in vitro* com 20 nM de leptina por 4 h. O sobrenadante da incubação foi recolhido e a quantificação de TNF- $\alpha$  foi feita por ELISA. Conforme demonstrado pela Figura 4.3B, macrófagos peritoneais incubados *in vitro* com leptina são capazes de produzir TNF- $\alpha$ .





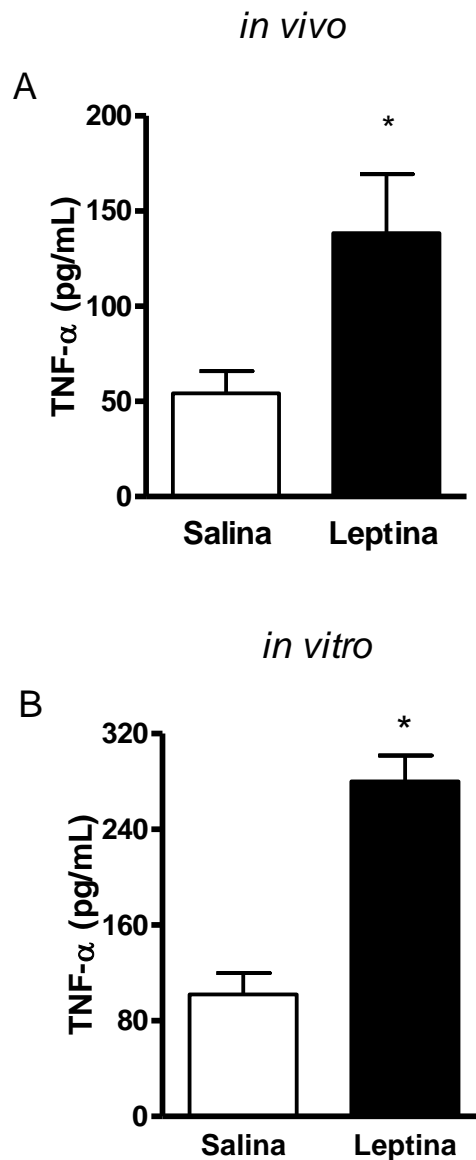
**Figura 4.1 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por diferentes doses de leptina.**

Animais receberam injeção i.p. de salina ou leptina nas doses 0,5 mg/Kg, 1 mg/Kg e 2 mg/Kg, sendo a lavagem da cavidade peritoneal realizada 24 h após a estimulação. Número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais estimulados com diferentes doses de leptina. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , *One Way Anova*) entre os grupos salina e estimulados com leptina. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com  $n = 5$  no mínimo).



**Figura 4.2 – Cinética da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais estimulados com leptina.**

Neutrófilos são encontrados na cavidade peritoneal após 1 h de estimulação com leptina (1 mg/Kg i.p.); a migração é mais intensa em 6 h e é reduzida em 24 h. A migração em animais estimulados com leptina é significativa em relação a animais que receberam salina, em todos os tempos avaliados. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , *One Way Anova*) entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com  $n = 5$  no mínimo).



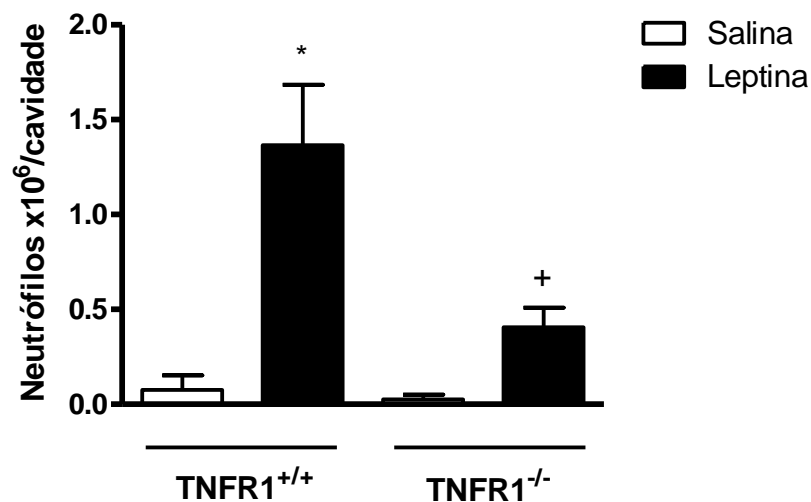
**Figura 4.3 – Produção de TNF- $\alpha$  *in vivo* e *in vitro*.**

A) Dosagem de TNF- $\alpha$  encontrado no sobrenadante de lavado peritoneal de animais estimulados com leptina (1 mg/Kg, 6h). Foram dosadas amostras de pelo menos 3 experimentos independentes. O gráfico representa a média (cada grupo com n = 5). B) Células peritoneais foram incubadas *in vitro* com leptina (20 nM, 4h), sendo TNF- $\alpha$  quantificado no sobrenadante. O gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t Student*) entre os grupos salina e leptina (cada grupo com n = 4 no mínimo).

Já que há presença de TNF- $\alpha$  antes do pico de 6h, é possível que esta citocina esteja intensificando o processo inflamatório, contribuindo para a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Assim, para confirmar a participação de TNF- $\alpha$  no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal sob estímulo de leptina, camundongos TNFR1<sup>-/-</sup>, deficientes do principal receptor de TNF- $\alpha$ , foram estimulados com 1 mg/Kg de leptina i.p. A lavagem da cavidade peritoneal foi realizada após 24 h. A Figura 4.4 mostra que há redução parcial do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais TNFR1<sup>-/-</sup>. Isto demonstra que TNF- $\alpha$  é necessário para o efeito da leptina em promover recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

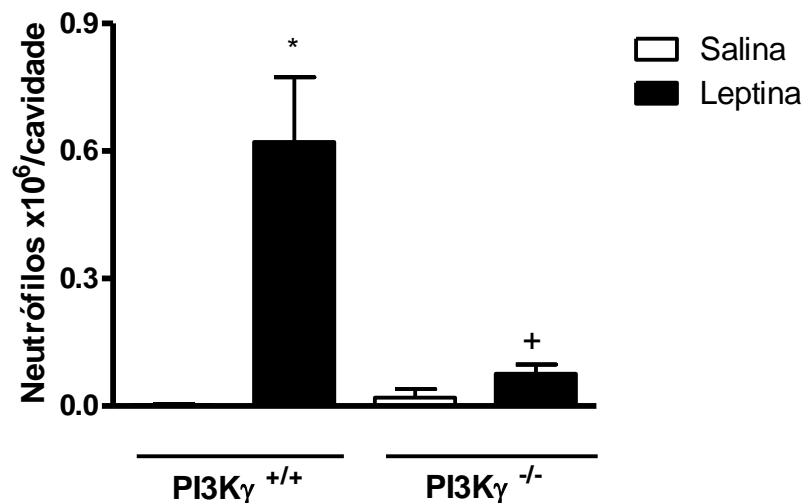
### **Sinalização intracelular via PI3K $\gamma$ participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina**

Curiosamente, TNF- $\alpha$  parece não ser o único mediador da migração, uma vez que esta ainda ocorre parcialmente na ausência do receptor TNFR1 (Figura 4.4). Assim, foi iniciada a investigação da participação de outros mediadores inflamatórios e quimiotáticos. Quimiocinas sinalizam por meio de receptores acoplados a proteína G, que por sua vez sinalizam via ativação de PI3K $\gamma$ . Além disso, nosso grupo demonstrou que leptina sinaliza via PI3K $\gamma$  para induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Assim, foi avaliada a participação de PI3K $\gamma$  no recrutamento peritoneal de neutrófilos sob estímulo de leptina. Para isso, camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram estimulados com 1 mg/Kg i.p. de leptina após jeum pernoite, e o lavado peritoneal foi obtido após 24 h. A Figura 4.5 mostra que leptina não é capaz de induzir recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 24 h em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Com isso, pode ser verificada a participação de PI3K $\gamma$  sugerindo a participação de quimiocinas ativadoras de PI3K $\gamma$  nesta migração.



**Figura 4.4 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais TNFR1<sup>-/-</sup>.**

O gráfico mostra a contagem de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal de animais TNFR1<sup>+/+</sup> e TNFR1<sup>-/-</sup> estimulados ou não com leptina (1 mg/Kg, 24h). \* indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina; + indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo leptina TNFR1<sup>-/-</sup> e o grupo leptina TNFR1<sup>+/+</sup> (p<0,05, teste *One Way Anova*). Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com n = 4 no mínimo).



**Figura 4.5 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>.**

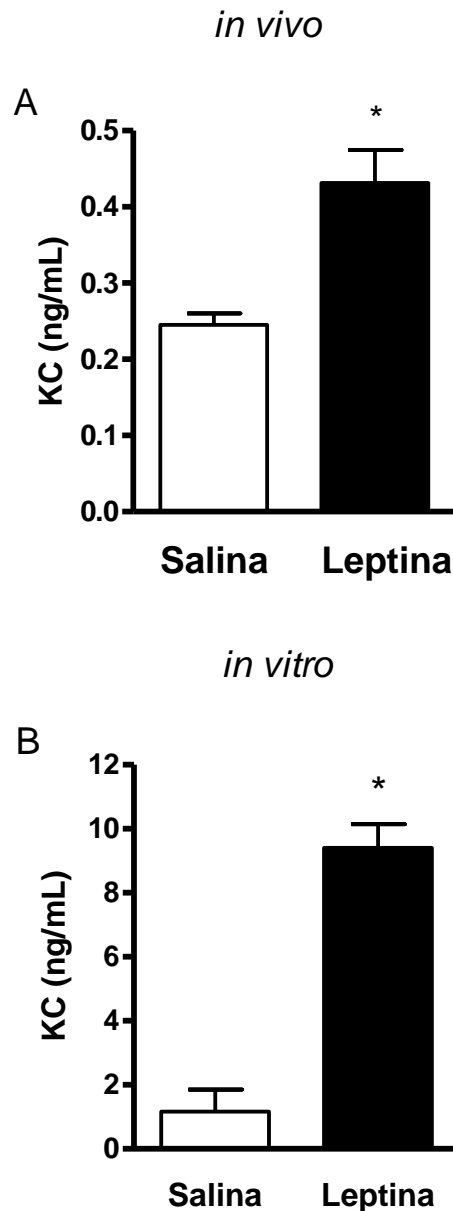
O gráfico mostra a contagem de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> estimulados com leptina (1 mg/Kg i.p., 24 h). \* indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina; + indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos leptina PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e leptina PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> (p<0,05, teste *One Way Anova*). Este resultado é representativo de pelo menos 2 experimentos independentes (cada grupo com n = 4 no mínimo).

## Participação de KC no recrutamento de neutrófilos induzido por leptina

Como PI3K $\gamma$  participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina, foi feita a investigação do envolvimento de CXCL1/KC neste efeito. KC é uma quimiocina que participa da migração de neutrófilos em outros modelos. Inicialmente, foi averiguado o aumento significativo de KC no sobrenadante de lavado peritoneal de camundongos estimulados com leptina (1 mg/Kg i.p.) em 6 h em relação a camundongos que receberam salina, como pode ser observado na Figura 4.6A. Em seguida, macrófagos obtidos por lavagem peritoneal de animais não estimulados foram incubados com 20 nM de leptina por 4h, sendo o sobrenadante recolhido para análise de ELISA. A Figura 4.6B mostra que macrófagos peritoneais incubados com leptina liberam no sobrenadante quantidade de KC significativamente maior que macrófagos do grupo controle. Estes dados demonstram que leptina promove produção de KC por macrófagos peritoneais *in vivo* e *in vitro*, restando ser avaliado se este efeito contribui, *in vivo*, para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

Para determinar se KC participa da migração de neutrófilos por leptina, camundongos foram tratados intraperitonealmente com 3  $\mu$ g/cavidade de anticorpo anti-KC, 10 min antes do estímulo de 1 mg/Kg i.p. de leptina. A Figura 4.7 mostra que o tratamento com anticorpos anti-KC não bloqueou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal 24 h após o estímulo de leptina.

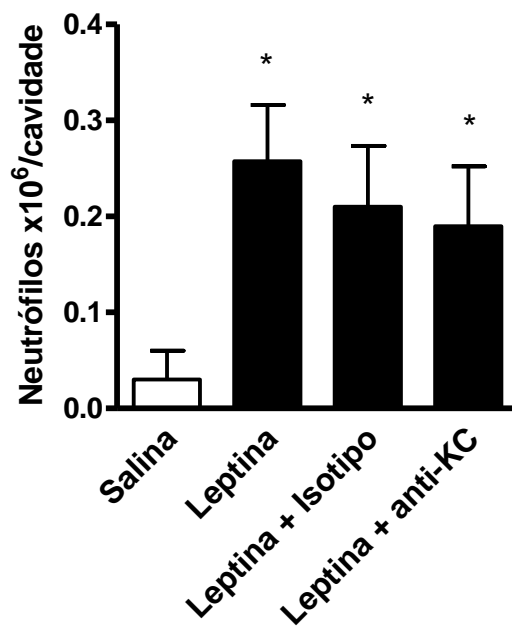
Uma vez que o pico de migração de neutrófilos ocorre em 6 h de estímulo de leptina, e que o efeito do anticorpo frente ao estímulo pode ter tempo de ação reduzido, a análise da participação de KC na migração de neutrófilos foi realizada em tempo mais precoce. Assim, o lavado peritoneal de camundongos tratados com 3  $\mu$ g/cavidade i.p. de anticorpo anti-KC, 10 min antes do estímulo com 1 mg/Kg i.p. de leptina, foi obtido 3:30 h depois do estímulo de leptina. Como observado na Figura 4.8, o tratamento com anticorpo anti-KC reduziu mais de 50% da migração de neutrófilos por estímulo de leptina. Desta forma, pode-se observar que parte da capacidade da leptina em promover recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal ocorre por sinalização de KC.



**Figura 4.6 – Produção de KC *in vivo* e *in vitro*.**

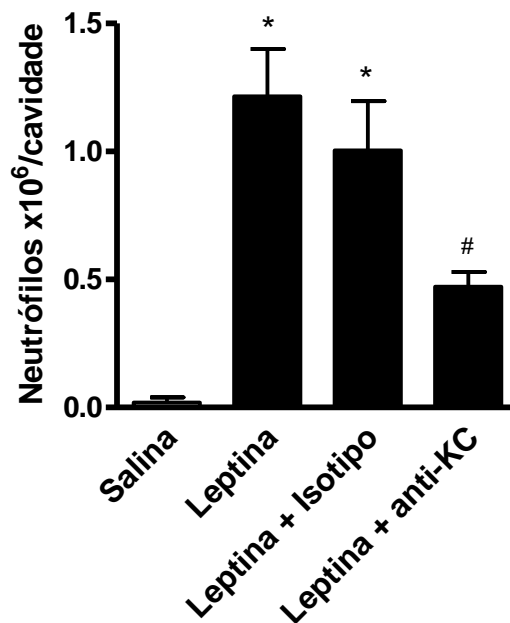
A) Dosagem de KC encontrado no sobrenadante de lavado peritoneal de animais estimulados com leptina (1 mg/Kg, 6 h). O gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com n = 5). B) Células peritoneais foram incubadas *in vitro* com leptina (20 nM, 4 h), sendo KC quantificado no sobrenadante. O gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t Student*) entre os grupos salina e leptina (cada grupo com n = 4 no mínimo).





**Figura 4.7 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos anti-KC e estimulados com leptina (24 h).**

O gráfico mostra a contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos inespecíficos ou com anticorpos anti-KC (3 µg/cav, 10 min) e estimulados com leptina (1 mg/Kg). \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos indicados e salina. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com  $n = 3$  no mínimo).



**Figura 4.8 - Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos anti-KC e estimulados com leptina (3:30 h).**

O gráfico mostra a contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal de animais tratados com anticorpos inespecíficos ou com anticorpos anti-KC (3 µg/cavidade, 10 min) e estimulados com leptina (1 mg/Kg). \* indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicados e salina; # indica diferença significativa em relação ao grupo leptina. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com n = 5 no mínimo).

## Papel do LTB<sub>4</sub> no recrutamento de neutrófilos por leptina

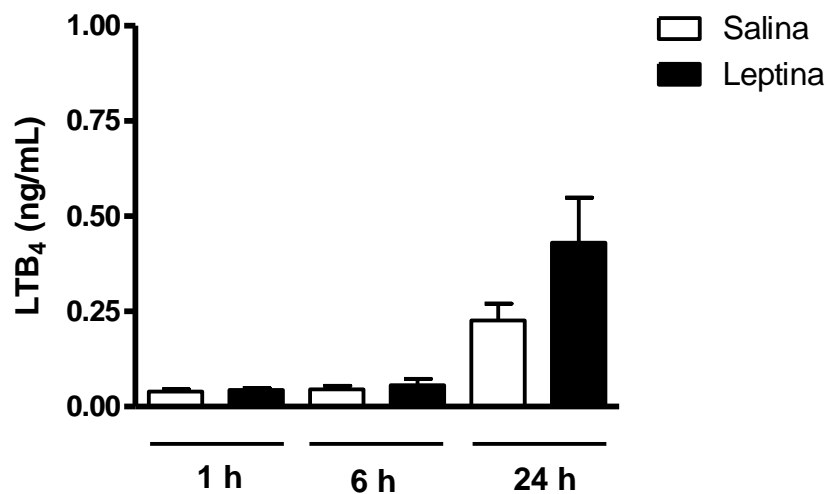
No trabalho anterior do nosso grupo, foi demonstrado que o acúmulo lipídico em macrófagos peritoneais *in vivo*, acompanhado de presença de 5-LO no interior destes corpúsculos, promovido por leptina, favorece a maior produção de LTB<sub>4</sub> quando estas células são, em seguida, estimuladas por ionóforo de cálcio (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Considerando que LTB<sub>4</sub> é conhecido como um forte agente quimiotático de neutrófilos, foi iniciado o estudo da sua participação na indução da migração de neutrófilos por leptina.

Para avaliar o efeito da leptina na indução de produção de LTB<sub>4</sub> por macrófagos *in vivo*, foi feita a quantificação de LTB<sub>4</sub> no sobrenadante de lavado peritoneal de camundongos submetidos a jejum pernoite estimulados com 1 mg/Kg de leptina i.p. em 1 h, 6 h e 24 h. Pela Figura 4.9, pode ser observado que animais estimulados com leptina não apresentam no sobrenadante de lavado peritoneal aumento significativo de produção de LTB<sub>4</sub> em relação a animais que receberam salina.

Apesar de não ter sido encontrado LTB<sub>4</sub> no lavado peritoneal, poderia estar ocorrendo aumento de síntese sem detecção deste mediador. Desta forma, a capacidade de leptina induzir a produção de LTB<sub>4</sub> por macrófagos peritoneais foi avaliada por *Eicosacel*, técnica mais sensível que o Ensaio Imunoenzimático convencional, pois imobiliza lipídios em seu sítio de síntese intracelular, o que permite identificar a síntese de LTB<sub>4</sub>.

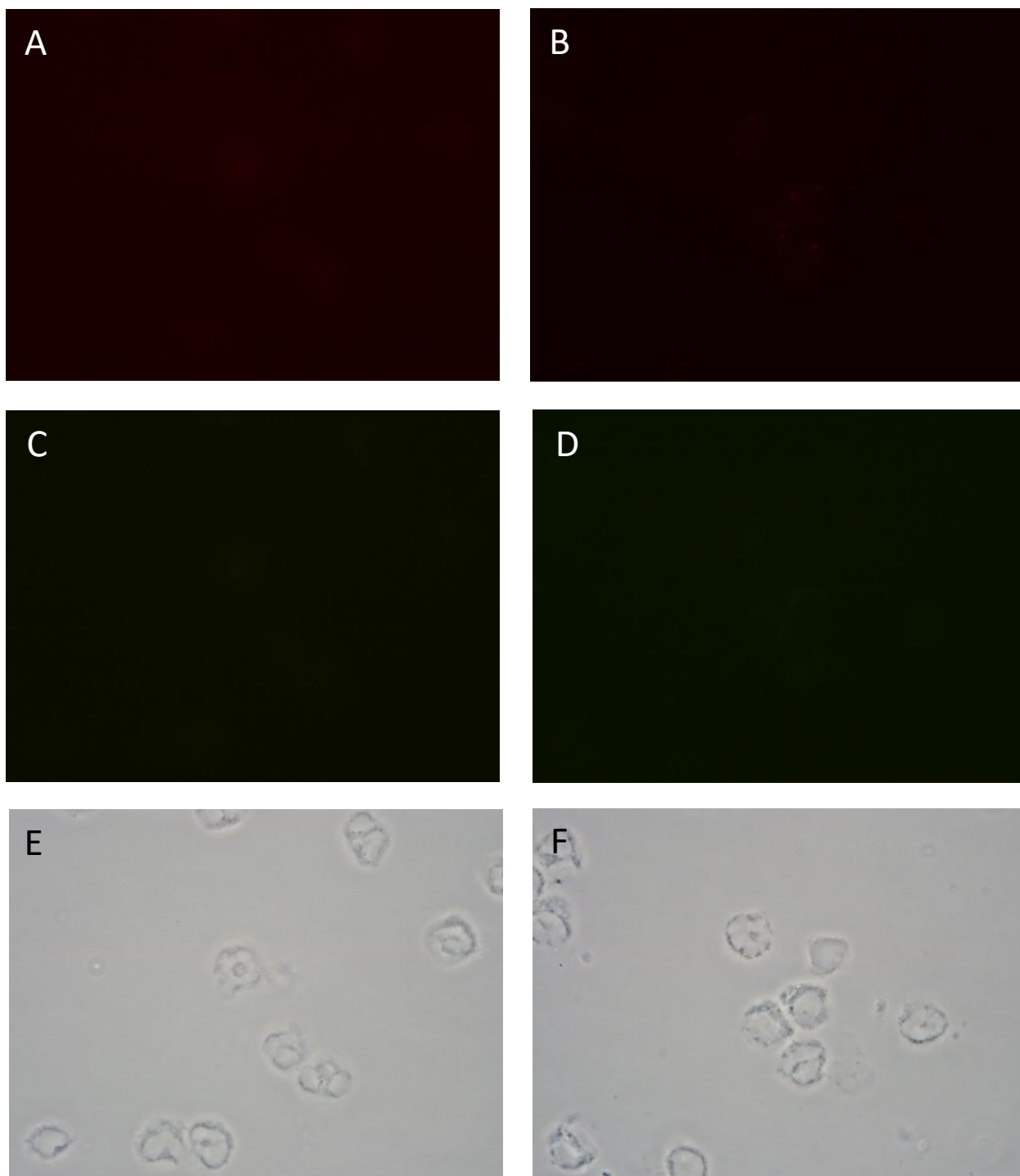
A Figura 4.10 apresenta imagens capturadas em microscopia de fluorescência na objetiva com aumento de 100x, mostrando a marcação, por *Eicosacel*, de células obtidas de lavado peritoneal de camundongos estimulados com leptina (1,5 mg/Kg i.p., 2:30 h). Pode ser observado que leptina não induziu a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos presentes no sítio inflamatório em 2:30 h, como mostra a marcação por anticorpos anti-ADRP (Figuras 4.10A e B), bem como não induziu produção de LTB<sub>4</sub> em nenhum sítio intracelular (Figuras 4.10C e D).

A leptina, desta maneira, não induz a produção nem a secreção de LTB<sub>4</sub> por macrófagos peritoneais *in vivo*. Uma vez que LTB<sub>4</sub> pode ser produzido por outros leucócitos no processo inflamatório, foi feita a investigação da participação de LTB<sub>4</sub> no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal sob estímulo de leptina. Para isso, animais 5-LO<sup>-/-</sup> foram estimulados com leptina (1 mg/Kg i.p., 24 h). A Figura 4.11A mostra que animais 5-LO<sup>-/-</sup> apresentam recrutamento de neutrófilos, sugerindo que a ausência de LTB<sub>4</sub> não interfere na migração de neutrófilos para o peritônio por indução de leptina.



**Figura 4.9 – Produção de LTB<sub>4</sub> *in vivo*.**

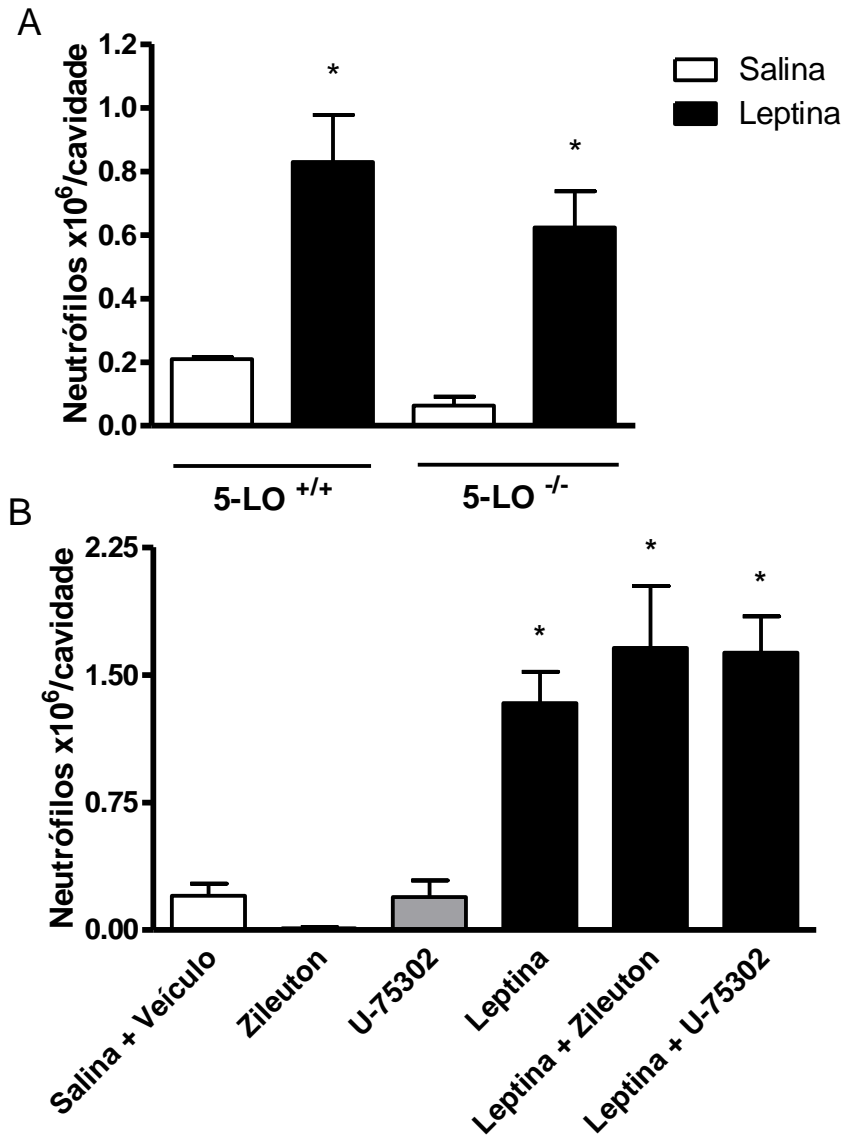
Dosagem de LTB<sub>4</sub> encontrado no sobrenadante de lavado peritoneal de animais estimulados com leptina (1 mg/Kg) por 1 h, 6 h e 24 h. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (cada grupo com n = 4 no mínimo).



**Figura 4.10 – Detecção de LTB<sub>4</sub> intracelular por *Eicosacell*.**

Imagens de microscopia de fluorescência mostram células de animais estimulados com leptina (1,5 mg/Kg, 2:30 h) submetidos à técnica de *Eicosacell*. As células foram marcadas com anticorpos anti-ADRP para corpúsculos lipídicos (A e B) e anticorpos anti-LTB<sub>4</sub> (C e D). E e F, microscopia de campo claro. Este resultado representa 1 experimento (cada grupo com n=3 no mínimo).





**Figura 4.11 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais com sinalização por LTB<sub>4</sub> inibida.**

A) Contagem de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais 5-LO<sup>-/-</sup> e 5-LO<sup>+/+</sup> estimulados com leptina (1 mg/Kg i.p., 24 h). \* indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05, teste *One Way Anova*) entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina. Este resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com n = 3 no mínimo). B) Contagem de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais tratados (10 min) com U-75302 (5 mg/Kg) ou Zileuton (60 µg/animal) antes de serem estimulados com leptina (1,5 mg/Kg, 3 h). \* indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05, teste *One Way Anova*) entre os grupos indicados e o grupo salina + veículo. Este resultado representa 1 experimento (cada grupo com n = 5 no mínimo).

Outras abordagens foram realizadas para verificar a participação de LTB<sub>4</sub>. Assim, camundongos foram tratados com Zileuton (60 µg/animal) ou U-75302 (5 mg/Kg), por 10 min antes do estímulo de leptina (1,5 mg/Kg i.p., 3 h). Zileuton é um fármaco inibidor de 5-LO, enquanto U-75302 é uma molécula antagonista de BLT1, o principal receptor de LTB<sub>4</sub>. A Figura 4.11B demonstra que nem a inibição de 5-LO, nem a inibição farmacológica de BLT1 interferem na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Assim, estes dados mostram que LTB<sub>4</sub> não parece mediar o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal por leptina.

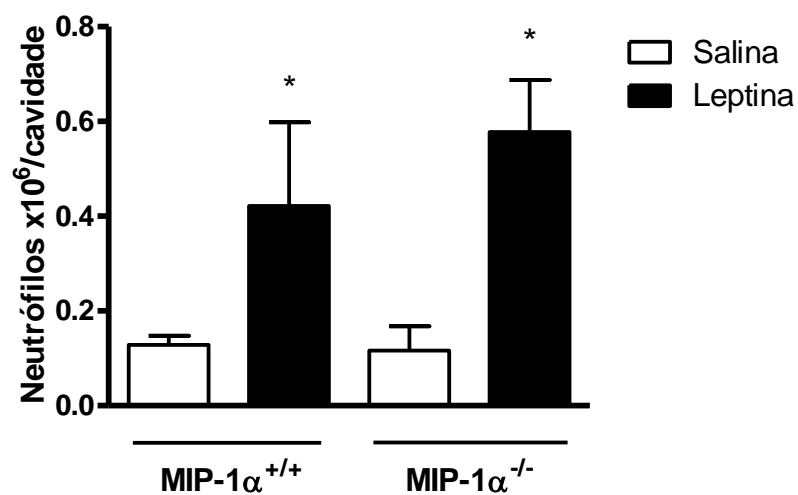
### **MIP-1 $\alpha$ não participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina**

CCL3/MIP-1 $\alpha$  é uma quimiocina que tradicionalmente não possui efeito sobre neutrófilos. No entanto, a literatura mostra que insulina é capaz de predispor neutrófilos a migrarem em resposta a MIP-1 $\alpha$ . Como leptina e insulina realizam sinalização cruzada, foi feita a avaliação da participação de MIP-1 $\alpha$  na migração de neutrófilos por leptina. Camundongos MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> foram desafiados com leptina (1 mg/Kg i.p., 24h). A Figura 4.12 mostra que o recrutamento de neutrófilos por leptina não é alterado em animais deficientes de MIP-1 $\alpha$ . Assim, MIP-1 $\alpha$  não parece participar do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por leptina.

### **O recrutamento de neutrófilos por leptina é independente de mTOR**

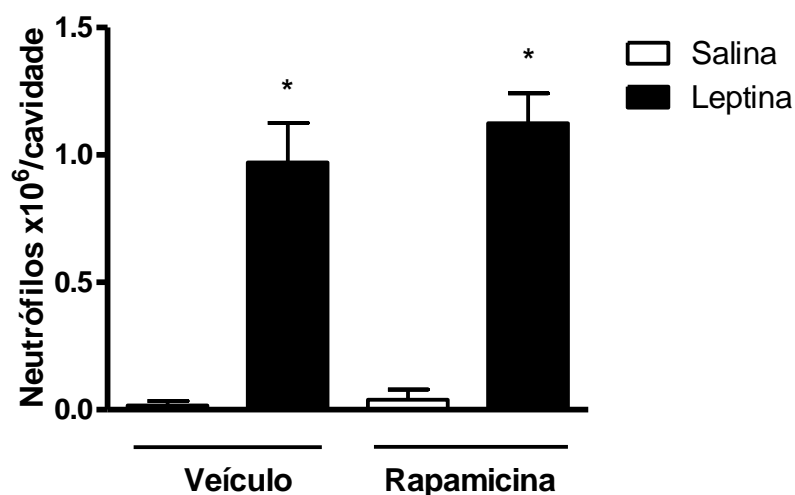
Em diferentes tecidos, tem sido descrito que a leptina sinaliza ativando mTOR. O trabalho anterior do nosso grupo descreveu que leptina atua via mTOR para induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Como a leptina induz macrófagos a produzirem mediadores que contribuem para o recrutamento de neutrófilos, foi avaliada a contribuição de mTOR para a indução de migração de neutrófilos por leptina. Assim, camundongos foram tratados com rapamicina i.p. (15 µg/Kg, sendo 12h e 15 min antes e 12h após a estimulação com leptina), inibidor de mTOR. A Figura 4.13 mostra que, 24h após o estímulo, a leptina foi capaz de promover recrutamento de neutrófilos mesmo em animais tratados com rapamicina. Desta forma, pode-se observar que o efeito da leptina em induzir migração de neutrófilos é independente da sinalização via mTOR.





**Figura 4.12 - Recrutamento de neutrófilos em animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$ .**

Contagem de neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal de animais MIP-1 $\alpha^{-/-}$  estimulados com leptina (1 mg/Kg, 24 h). \* indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05, teste *One Way Anova*) entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina. Estes resultados são representativos de 2 experimentos (cada grupo com n=6 no mínimo).



**Figura 4.13 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais tratados com rapamicina e estimulados com leptina.**

Número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal de animais tratados com rapamicina (15 mg/kg, 12 h e 15 min antes e 12 h após) e estimulados com leptina (1 mg/Kg, 24 h). \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos estimulados com leptina e os respectivos grupos salina. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos ( $n=7$  no mínimo).

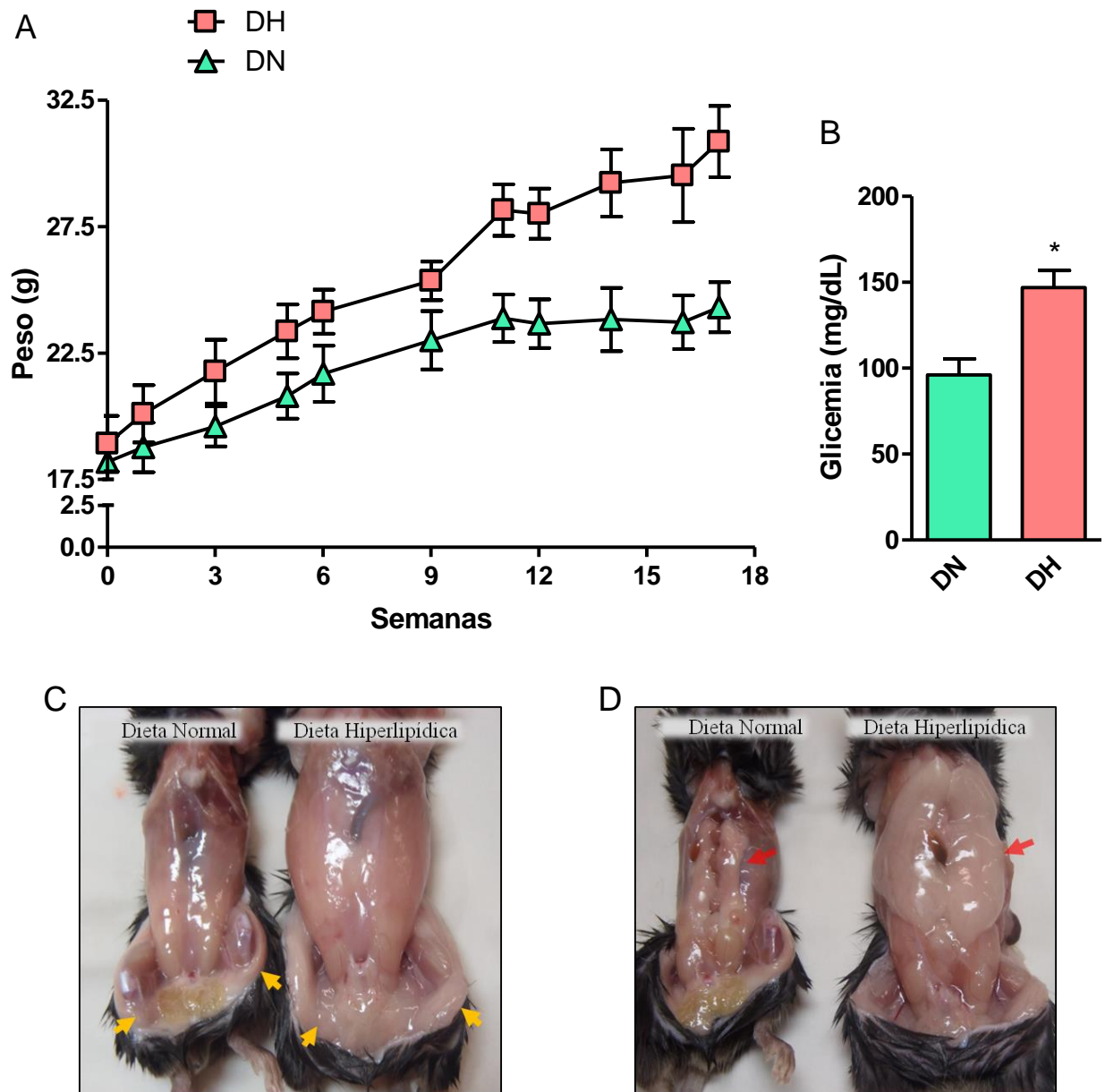
## **Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

A leptina regula o sistema imune inato de indivíduos obesos e não obesos. No entanto, os efeitos da leptina sobre o sistema imune em obesos é diferente dos efeitos em não-obesos, devido à exposição crônica das células do sistema imune a altos níveis circulantes de leptina. Para realizar o estudo do efeito da leptina sobre o recrutamento de neutrófilos na obesidade, foi estabelecido o modelo de obesidade murina induzida por dieta hiperlipídica.

Camundongos C57Bl/6 foram alimentados por 15-17 semanas com dieta hiperlipídica (DH), sendo 60% do teor calórico proveniente de gordura, enquanto o grupo controle recebeu dieta de teor lipídico normal (DN), com 10% de gordura. A Figura 4.14A mostra a curva de peso em ambos os grupos. O grupo que recebeu dieta hiperlipídica apresentou maior ganho de peso ao longo da dieta do que o grupo que recebeu dieta normolipídica, de modo que, ao fim do período, a diferença de peso foi significativa entre os grupos.

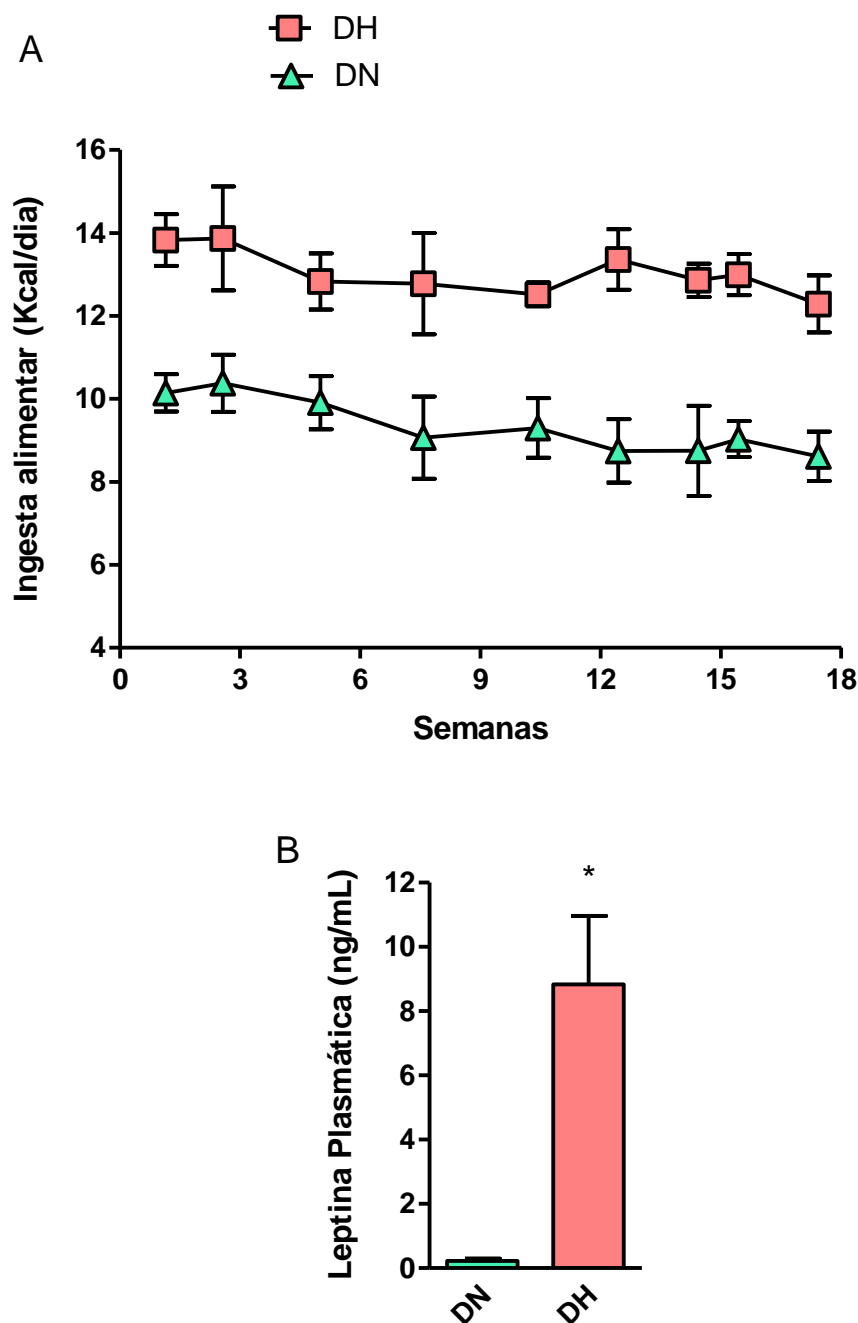
Ao fim do período de dieta, a análise da glicemia de jejum pernoite revelou que animais que receberam DH apresentam níveis mais altos de glicose circulante do que animais que receberam DN, conforme observado na Figura 4.14B. O ganho de peso no período de dieta é proporcional ao ganho de massa de tecido adiposo, principalmente tecido adiposo epididimal, além de tecido adiposo subcutâneo (Figuras 4.14C e D). Em conjunto, a Figura 4.14 demonstra que animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentam sobrepeso associado ao aumento de glicemia e de adiposidade, reproduzindo características presentes na obesidade humana.

Animais submetidos à DH apresentam, ao longo do período de dieta, maior ingestão calórica diária do que animais alimentados com DN, como pode ser observado na Figura 4.15A. Estes animais ingerem maior quantidade de calorias de modo a armazenar o excedente não-utilizado na manutenção do funcionamento do organismo, o que se traduz em ganho de peso (vide Figura 4.14A). Ao fim do período de dieta, foi realizada punção cardíaca para quantificação de leptina plasmática. A Figura 4.15B mostra que animais alimentados com DH apresentam níveis elevados de leptina plasmática. A ocorrência de hiperleptinemia ao fim do período de dieta sem alteração na ingestão calórica mostra que a leptina não está promovendo efeito hipotalâmico de inibição do apetite. Isso sugere que o aumento de leptina não foi agudo, mas gradual e crônico, acompanhado de crescente resistência central à leptina.



**Figura 4.14 – Aumento de peso, glicemia e adiposidade induzidas por dieta hiperlipídica.**

Animais foram alimentados por 15 a 17 semanas com ração hiperlipídica, sendo o grupo controle alimentado com ração de teor lipídico normal. DH: grupo alimentado com ração hiperlipídica; DN: grupo alimentado com ração normolipídica. A) Acompanhamento de peso no período de dieta. B) Glicemia apresentada após jejum pernoite, no último dia de dieta. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos DH e DN. C e D) Imagens representativas dos grupos DN e DH ao fim do período de dieta. Seta amarela indica tecido adiposo subcutâneo; seta vermelha indica tecido adiposo perigonadal, observado após a abertura da cavidade peritoneal. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com  $n=13$  no mínimo).



**Figura 4.15 – Ingesta calórica e leptinemia resultantes de dieta hiperlipídica.**

Animais foram alimentados por 15 a 17 semanas com ração hiperlipídica, sendo o grupo controle alimentado com ração de teor lipídico normal. DH: grupo alimentado com ração hiperlipídica; DN: grupo alimentado com ração normolipídica. A) Ingesta calórica diária dos grupos DN e DH ao longo do período de dieta. B) Dosagem de leptina plasmática, realizada ao fim do período de dieta. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t Student*) entre os grupos DH e DN. Estes resultados são representativos de 3 experimentos ( $n=7$  no mínimo).

Pode-se observar que o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica mimetiza a obesidade humana, pois reproduz características de sobrepeso, adiposidade, hiperglicemia e hiperleptinemia associadas à resistência central à leptina. Para o estudo dos efeitos da leptina no contexto de hiperleptinemia crônica associada à obesidade, os animais submetidos à dieta hiperlipídica são, então, considerados obesos, sendo os animais alimentados com dieta normolipídica considerados não-obesos.

### **Efeito de leptina sobre macrófagos peritoneais de animais obesos**

O estímulo agudo de leptina induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de animais não-obesos, segundo trabalho do nosso grupo (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Para avaliar o efeito de leptina exógena em macrófagos peritoneais de animais obesos, tais animais foram estimulados com 1 mg/Kg de leptina i.p. após jejum pernoite, sendo feita a lavagem da cavidade peritoneal após 24h. As células peritoneais foram submetidas à coloração com tetróxido de ósmio, que marca corpúsculos lipídicos. A Figura 4.16 apresenta a média do número de corpúsculos lipídicos por célula, tendo sido contados 50 macrófagos por animal. Pode-se observar que macrófagos peritoneais de animais obesos apresentam maior número de corpúsculos lipídicos do que animais não-obesos. Quando estimulados por leptina i.p., a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de animais obesos é potencializada em relação aos animais obesos não estimulados com leptina. O número de corpúsculos lipídicos em macrófagos de animais obesos não estimulados por leptina é semelhante ao número de corpúsculos em macrófagos de animais não-obesos estimulados com leptina. Assim, estes dados indicam que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica predispõe macrófagos peritoneais aos efeitos da estimulação com leptina i.p.

Uma vez que os macrófagos peritoneais estão sendo expostos tanto à hiperleptinemia endógena de maneira crônica, quanto ao estímulo agudo de leptina exógena, faz-se necessário avaliar alteração nos níveis de leptina, pela técnica de ELISA. Como demonstrado na Figura 4.17A, após 24 h de estimulação com 1 mg/Kg i.p. de leptina, animais não-obesos apresentam níveis aumentados de leptina plasmática em relação a animais não-obesos não estimulados. Já a estimulação de animais obesos não altera os níveis plasmáticos de leptina, que se mantém elevados em relação os não-obesos estimulados com leptina. Foi realizada também a dosagem de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal de animais obesos e não-obesos, estimulados e não estimulados com 1 mg/Kg de leptina i.p. por 24h. A Figura 4.17B revela que não há

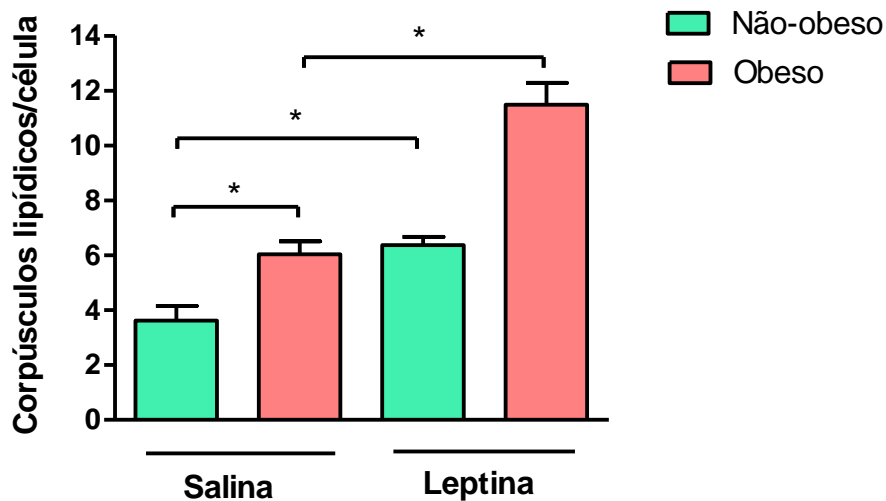
aumento significativo na quantidade de leptina encontrada no sobrenadante de lavado peritoneal de animais não-obesos estimulados com leptina, nem de animais obesos não-estimulados. No entanto, foram apresentados níveis mais altos de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal de animais obesos estimulados com leptina. Isto significa que macrófagos peritoneais de animais obesos estão mais expostos aos efeitos da leptina exógena do que animais obesos não estimulados e animais não-obesos estimulados, uma vez que a presença de leptina na cavidade peritoneal permanece após 24h de estímulo.

### **Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por leptina em animais obesos**

Estabelecido o modelo de obesidade induzida por dieta e demonstrado o efeito da leptina sobre macrófagos de animais obesos, foi feita a investigação sobre a capacidade da leptina induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais obesos. Para isso, animais obesos estimulados com leptina 1 mg/Kg i.p. tiveram seu lavado peritoneal recolhido após 24 h. Pela Figura 4.18, pode ser observado que animais obesos não apresentam neutrófilos na cavidade peritoneal. A estimulação com leptina promove recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais obesos, atingindo níveis semelhantes aos de animais não-obesos.

Como foi observado que o recrutamento de neutrófilos induzido por leptina depende da participação de TNF- $\alpha$ , e sabendo-se que indivíduos obesos apresentam um quadro de inflamação subclínica, foi avaliada a contribuição de TNF- $\alpha$  ao efeito da leptina em animais obesos. Assim, foi feita a quantificação de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de lavado peritoneal por ELISA. Na Figura 4.19, pode ser observado que animais obesos apresentam altos níveis de TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal, equivalente aos níveis encontrados em animais não-obesos estimulados com leptina; a estimulação de animais obesos com leptina não altera os níveis de TNF- $\alpha$ .

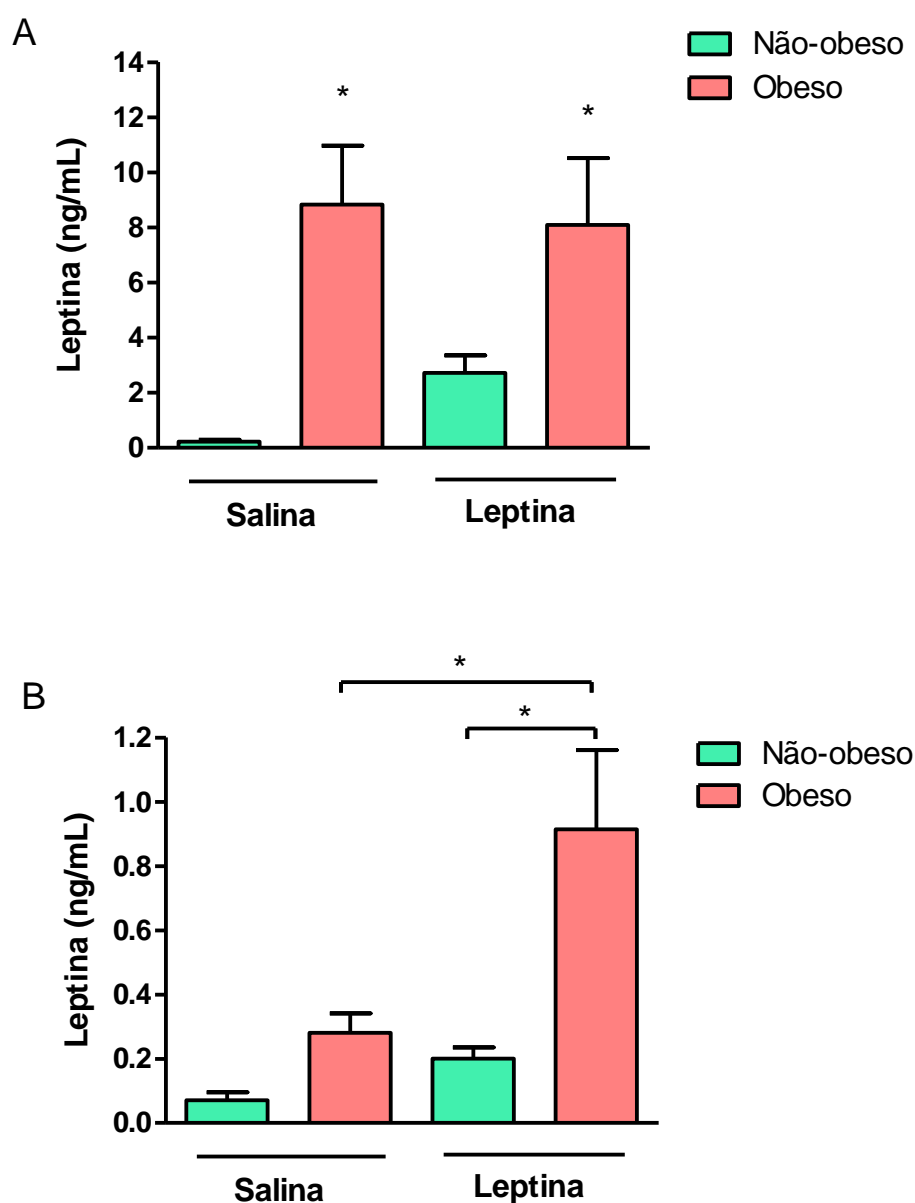
Nota-se então que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam *background* inflamatório, caracterizado por altos níveis de TNF- $\alpha$  e predisposição de macrófagos peritoneais aos efeitos da leptina. No entanto, esta inflamação subclínica, associada à hiperleptinemia crônica, não é suficiente para promover influxo de neutrófilos para o peritônio, de modo que o estímulo agudo de leptina é capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos em animais obesos mas não há aumento em relação a animais não obesos.



**Figura 4.16 –Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de animais obesos e não-obesos estimulados com leptina.**

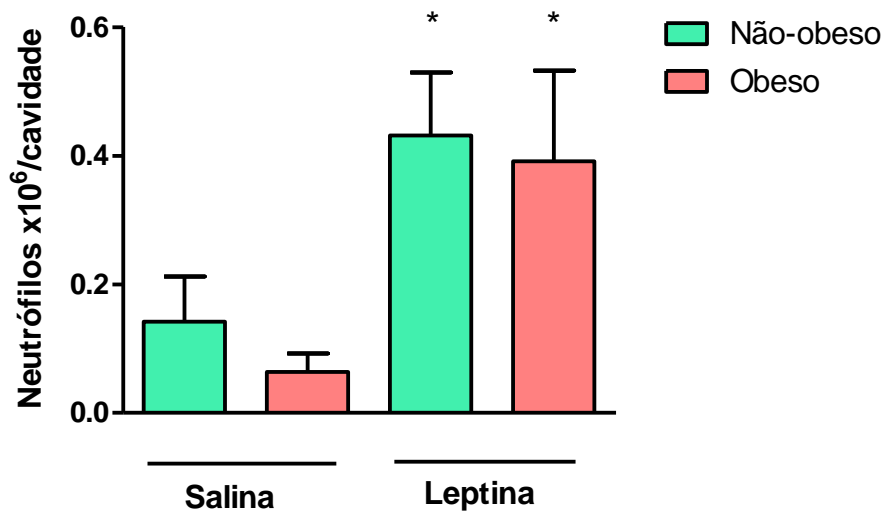
Animais obesos e não-obesos foram estimulados com leptina (1mg/Kg, 24 h) após jejum pernoite. Gráfico mostra o número médio de corpúsculos lipídicos encontrados em macrófagos peritoneais. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos indicados. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com  $n=6$  no mínimo).





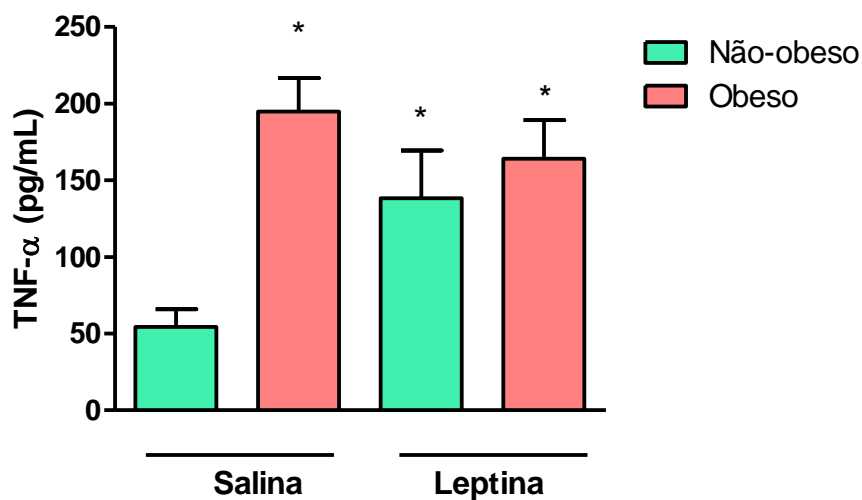
**Figura 4.17 – Níveis plasmáticos e intraperitoneais de leptina em animais obesos e não-obesos, estimulados e não-estimulados com leptina.**

Animais obesos e não-obesos foram estimulados com leptina (1mg/Kg, 24 h) após jejum pernoite. A) Dosagem de leptina plasmática. B) Dosagem de leptina encontrada no sobrenadante de lavado peritoneal. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos obeso e não-obeso em A ou entre os grupos indicados em B. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com  $n=6$  no mínimo).



**Figura 4.18 – Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina para a cavidade peritoneal de animais obesos.**

Animais obesos e não-obesos foram estimulados com leptina (1 mg/Kg, 24 h) após jejum pernoite. O gráfico mostra a contagem de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos salina e leptina. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com  $n=6$  no mínimo).



**Figura 4.19 – Níveis intraperitoneais de TNF- $\alpha$  em animais obesos estimulados ou não com leptina.**

Animais obesos e não-obesos foram estimulados com leptina (1 mg/Kg, 24 h). O gráfico mostra a quantidade de TNF- $\alpha$  detectado no sobrenadante de lavado peritoneal. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *One Way Anova*) entre os grupos indicados e o grupo não-obeso salina. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos (cada grupo com  $n=6$  no mínimo).

## **5.Discussão**

A leptina possui atividade reguladora da resposta imune, atuando como mediador pró-inflamatório ao promover a participação de neutrófilos em diferentes patologias, o que pode favorecer a sobrevivência ou agravar o processo inflamatório. A literatura científica não é conclusiva quanto aos diversos efeitos da leptina sobre neutrófilos. Enquanto alguns trabalhos demonstram que a leptina é capaz de induzir ativação e quimiotaxia diretamente sobre neutrófilos, apesar da ausência de receptor ObRb, outros trabalhos têm demonstrado apenas efeitos indiretos, mediados principalmente por TNF- $\alpha$  (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2004). No presente estudo, é demonstrado pela primeira vez que leptina é capaz de promover migração de neutrófilos *in vivo* pela indução de micro-ambiente inflamatório, independente do prévio estabelecimento de um processo inflamatório provocado por outro agente.

A injeção intraperitoneal de leptina é uma via de administração recorrente na literatura e é capaz de promover a inibição da ingesta alimentar. Uma vez que a cavidade peritoneal é estéril, a indução de peritonite por meio da injeção intraperitoneal de agentes patogênicos ou inflamatórios tornou-se um recurso amplamente utilizado para o estudo de processos inflamatórios. A investigação dos efeitos da leptina *in vivo* tem sido caracterizada em associação a modelos de sepse ou peritonite desencadeada por outros agentes, em que o envolvimento de leptina é secundário ao estímulo (Pini *et al.*, 2008, Shapiro *et al.*, 2010). Neste trabalho, a leptina atua como estímulo primário na cavidade peritoneal, o que permite investigar seus efeitos biológicos de maneira isenta de interação com estímulos prévios, abordagem inédita na literatura.

Na publicação anterior do nosso grupo, a estimulação intraperitoneal com leptina provocou efeitos pró-inflamatórios sobre macrófagos peritoneais, em doses de leptina semelhantes às que promovem inibição da ingesta alimentar, ou seja, doses que não induzem toxicidade nem estimulação excessiva (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Nesta dissertação, a avaliação do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal revelou que a migração é mais intensa em resposta a doses mais altas. Assim, a dose preferencial adotada ao longo do estudo foi 1 mg/Kg, semelhante à dose utilizada via intraperitoneal na literatura (Fujita *et al.*, 2012).

A cinética da migração de neutrófilos ocorre de maneira típica de processo inflamatório agudo, ocorrendo nos momentos iniciais de estímulo, seguido de pico em 6 h e perdurando por 24 h. A migração de neutrófilos em 1 h sugere que a leptina poderia atuar como agente quimiotático de neutrófilos. A presença de neutrófilos na cavidade peritoneal após 24 h do estímulo indica que o sítio inflamatório estaria promovendo recrutamento tardio em níveis mais baixos, ou estaria estimulando a maior sobrevivência dos neutrófilos que migraram para o peritônio até o pico. De fato, a estimulação de neutrófilos por leptina é

menos intensa do que a que ocorre por outros estímulos inflamatórios, como podemos observar pela ausência de corpúsculos lipídicos nestes neutrófilos. Esta menor ativação pode contribuir para a maior sobrevivência, como corroborado por dados da literatura que mostram efeitos anti-apoptóticos da leptina sobre neutrófilos (Bruno *et al.*, 2005).

Não nos detivemos a investigar se o recrutamento de neutrófilos é efeito direto ou indireto de leptina, uma vez que neutrófilos não apresentam receptor ObRb (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2004). Não se pode descartar a possibilidade de algum efeito direto, por meio do receptor ObRa, contribuir para recrutamento e ativação de neutrófilos no peritônio. Caldefie-Chezet *et al.* (2003) e Ottonello (2006) demonstraram que a leptina apresenta efeito direto e atuam como agente quimiotático sobre neutrófilos (Caldefie-Chezet *et al.*, 2003, Ottonello, 2004). Dada a natureza dos receptores curtos, incapazes de desencadear a sinalização tradicionalmente observada por ObRb, têm sido investigadas outras vias possíveis, que não JAK2/STAT3 e PI3K/Akt/mTOR. Assim, o trabalho de Montecucco demonstrou que o tratamento com inibidores de p38 MAPK e Src quinases inibe a migração de neutrófilos em resposta à leptina. p38 é conhecido por participar de resposta a agentes quimiotáticos clássicos, enquanto Src quinases, por regular a polimerização de F-actina durante a quimiotaxise (Montecucco, Bianchi, Gnerre, *et al.*, 2006). Estas evidências sugerem que a ação quimiotática de leptina ocorra por meio do receptor ObRa. Já foi descrito na literatura que leptina é capaz de ativar MAPK e Src quinases de maneira independente de JAK2 (Bełtowski *et al.*, 2006, Bjørbaek *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 2008).

De fato, existem mais evidências demonstrando a ocorrência de efeitos indiretos da leptina sobre neutrófilos, do que de efeitos diretos. O trabalho de Zarkesh-Esfahani *et al.* (2004) descreve que a ativação de neutrófilos por leptina não ocorre de maneira direta, mas depende de TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos estimulados com leptina. Neste trabalho, mostramos que macrófagos produzem TNF- $\alpha$  *in vivo* e *in vitro* quando estimulados por leptina, o que sugere a contribuição de macrófagos no recrutamento de neutrófilos. Verificamos que, de fato, TNF- $\alpha$  contribui para o recrutamento de neutrófilos, uma vez que animais TNFR1<sup>-/-</sup> apresentam migração reduzida. A participação de TNF- $\alpha$  fica evidente, sem no entanto eliminar a possibilidade de outros mediadores estarem contribuindo para a migração de neutrófilos nestes animais.

Como a migração de neutrófilos em outros modelos de inflamação aguda é multifatorial, decidimos investigar o envolvimento de KC no recrutamento induzido por leptina. KC é conhecidamente um agente quimiotático de neutrófilos. Neste trabalho, demonstramos que KC participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina. É

possível que a ação dos anticorpos seja sobrepujada pelo aumento dos níveis de KC *in vivo* e *in vitro* que antecedem o pico de migração, o que explicaria a inibição de migração em 3:30 h mas não em 24 h de estimulação com leptina.

A participação de KC pode explicar o fato do recrutamento de neutrófilos por leptina ocorrer via PI3K $\gamma$ . De fato, Pinho *et al.* (2007) demonstraram que PI3K $\gamma$  é necessário para o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, em diferentes modelos de inflamação. Além disso, nosso grupo demonstrou que leptina sinaliza via PI3K $\gamma$  para induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais. Este é um achado intrigante, pois o receptor ObRb é associado a proteínas tirosina-quinases, que sinalizam via PI3K $\alpha$ . O acúmulo lipídico em macrófagos via PI3K $\gamma$  poderia ser resultado da sinalização por algum mediador que atue por meio de receptor acoplado a proteína G. Desta forma, KC pode estar participando da estimulação autócrina de macrófagos por meio de seu receptor CXCR2, associado à proteína G, e por conseguinte, ativando PI3K $\gamma$ . Esta consideração também se aplica ao recrutamento de neutrófilos, esclarecendo a participação de PI3K $\gamma$  no recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.

Considerando que mediadores que sinalizam via PI3K $\gamma$  participam do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina, decidimos investigar a participação de LTB<sub>4</sub> neste processo. LTB<sub>4</sub> é conhecido pela sua forte ação quimiotática para neutrófilos. A leptina predispõe macrófagos alveolares e peritoneais a produzirem LTB<sub>4</sub>, como resultado da estimulação com ionóforo de cálcio (Mancuso *et al.*, 2004; Maya-Moteiro *et al.*, 2008). O presente estudo demonstra que leptina não induziu *per se*, a produção de LTB<sub>4</sub> por macrófagos peritoneais *in vivo*.

Uma vez que a produção de LTB<sub>4</sub> pode estar ocorrendo abaixo do limite de detecção por EIA, investigamos a produção de LTB<sub>4</sub> por meio da técnica de *Eicosacell*. Esta técnica apresenta maior sensibilidade que EIA, uma vez que EDAC promove a fixação de lipídios em seus sítios intracelulares, permitindo a detecção de LTB<sub>4</sub>, caso este seja sintetizado. Assim, nossos resultados sugerem que leptina não induz a produção de LTB<sub>4</sub> em macrófagos peritoneais estimulados com leptina *in vivo*.

Nosso grupo demonstrou que a produção de LTB<sub>4</sub> em macrófagos está associada à presença de 5-LO em corpúsculos lipídicos nestas células (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas envolvidas no metabolismo lipídico em diferentes tipos celulares. Em adipócitos, há apenas uma grande gota lipídica, que apesar da função primária de armazenamento de lipídios, este armazenamento não é estático: o organismo frequentemente requisita estes lipídios, e os repõem após as refeições. O aumento

do tamanho do adipócito acontece quando a quantidade de lipídios armazenados é superior à quantidade de lipídios liberados. Em leucócitos, a biogênese de corpúsculos lipídicos é regulada por diferentes estímulos pró-inflamatórios e patogênicos, emergindo como marcador de ativação celular em processos inflamatórios e infecciosos; além disso, são fonte para a produção, bem como sítio de síntese, de eicosanóides (Bozza *et al.*, 2009, D'Avila *et al.*, 2006). Assim, nossos dados sugerem que a presença de 5-LO em corpúsculos lipídicos predispõem à formação de LTB<sub>4</sub> em resposta à leptina, desde que exista outro estímulo; na ausência de um segundo estímulo, leptina não é capaz de induzir a produção de LTB<sub>4</sub>.

Ao averiguar o papel de 5-LO no recrutamento de neutrófilos, foi observado que leptina é capaz de promover recrutamento de neutrófilos em animais 5-LO<sup>-/-</sup>, ou seja, LTB<sub>4</sub> não participa do recrutamento. Para distinguir a ausência de 5-LO de sua incapacidade funcional, animais foram tratados com Zileuton, inibidor farmacológico de 5-LO. A migração de neutrófilos ocorrida após o estímulo de leptina demonstra que a produção de LTB<sub>4</sub> não é necessária para este efeito, uma vez que Zileuton não inibiu tal migração. Investigamos também a participação de BLT1, o receptor de LTB<sub>4</sub> que participa da quimiotaxia de neutrófilos. Para isso, foi realizado tratamento com U-75302, antagonista de BLT1. O tratamento com U-75302 não interferiu na migração de neutrófilos por leptina, confirmando o achado de que o recrutamento de neutrófilos por leptina é dependente de LTB<sub>4</sub>. Desta forma, nossos dados indicam por diferentes metodologias que LTB<sub>4</sub> não participa do recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.

Sabe-se que quimiocinas da família CC, como CCL3/MIP1 $\alpha$ , atuam preferencialmente sobre monócitos e eosinófilos. Apesar de MIP-1 $\alpha$  ser incapaz de promover quimiotaxia de neutrófilos *per se* (Ottonello *et al.*, 2005), MIP-1 $\alpha$  contribui para o influxo de cálcio e a migração de neutrófilos em processos inflamatórios (Das *et al.*, 1999, Gao *et al.*, 1997). Como parte da caracterização do efeito agudo de leptina, foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal não ocorre via MIP-1 $\alpha$ , uma vez que há migração em animais MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>. É possível que o papel de MIP-1 $\alpha$  na migração de neutrófilos não esteja associado a estímulos inflamatórios agudos, mas a doenças inflamatórias crônicas, uma vez que medeia a migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos previamente imunizados (Ramos *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2010).

Por outro lado, é interessante investigar o envolvimento de MIP-1 $\alpha$  nos efeitos de leptina sobre neutrófilos, pois Montecucco, Bianchi, Bertolotto *et al.* (2006) mostram que insulina é capaz de predispor neutrófilos a migrarem em resposta a MIP-1 $\alpha$ , dado que associa a hiperinsulinemia à infiltração neutrofílica de lesões aterosteróticas. Hiperleptinemia também



está associada à aterosclerose (Taleb *et al.*, 2007); no entanto, independente do modelo de inflamação, a literatura não aponta estudos sobre a participação de MIP-1 $\alpha$  na migração de neutrófilos expostos à hiperleptinemia. Neste caso, é interessante averiguar a participação de MIP-1 $\alpha$  em modelo murino de obesidade, que inclusive apresenta níveis aumentados de MIP-1 $\alpha$  (Xu *et al.*, 2003), pois a exposição crônica de neutrófilos à hiperleptinemia *in vivo* poderia revelar achado similar ao de Montecucco, Bianchi, Bertolotto *et al.* (2006).

Dados da literatura indicam que leptina sinaliza em diferentes tecidos por meio da ativação de mTOR (Rodríguez *et al.*, 2011). Nosso grupo demonstrou que a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais ativados por leptina depende de mTOR (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Apesar das evidências deste trabalho sugerirem que o recrutamento de neutrófilos depende da ativação de macrófagos, o tratamento com rapamicina não inibiu o influxo para o peritônio. Desta forma, observa-se que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por leptina não ocorre via mTOR.

O papel de mTOR na migração de neutrófilos não está plenamente estabelecido (Liu & Parent, 2011, Sasaki & Firtel, 2006). Estudos *in vivo* têm mostrado que o tratamento com rapamicina, molécula inibidora de mTORC1, promove melhoria de processos inflamatórios, efeito devido, em parte, à redução do influxo de neutrófilos (Gomez-Cambronero, 2003, Lee *et al.*, 2010). Além disso, estudos indicam a capacidade de rapamicina prevenir metástase tumoral por meio de mecanismos associados à regulação do citoesqueleto, evidenciando o papel de mTORC1 na mobilidade celular (Kobayashi *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2010).

A maior parte dos estudos de mTOR são realizados por meio da inibição de mTORC1 por rapamicina. No entanto, mTORC2 não é sensível à rapamicina, podendo estar ativo na transdução de sinal da via PI3K/mTOR. mTORC2 atua na quimiotaxia de neutrófilos, tendo sido demonstrada sua participação na polarização do citoesqueleto e na migração celular (Charest *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2010). Desta forma, nossos dados sugerem que leptina promove recrutamento de neutrófilos de maneira independente de mTORC1; no entanto, não investigamos se há ou não participação de mTORC2.

De fato, existe a possibilidade de ocorrer ativação de mTORC2 em neutrófilos, por meio da interação desta via com a via de PI3K $\gamma$ . Neste estudo, foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos induzido por leptina depende de PI3K $\gamma$ . PI3K $\gamma$  participa da migração de neutrófilos em resposta a agentes quimiotáticos que sinalizam por meio de receptores acoplados à proteína G, de maneira tecido e estímulo específica (Pinho *et al.*, 2007, Sasaki *et al.*, 2000). Além disso, a sinalização intracelular induzida por leptina em neutrófilos pode ser independente de PI3K $\alpha$ -mTORC1, uma vez que receptores ObRb estão ausentes em

neutrófilos. Assim, este trabalho contribui para a hipótese de que o recrutamento de neutrófilos por leptina ocorre paralelamente por ambas vias, PI3K $\gamma$  e mTORC2.

Modelos animais são amplamente utilizados no estudo da obesidade. Os primeiros modelos foram obtidos por meio do isolamento, na década de 1950, de camundongos que apresentavam alelos recessivos dos genes *ob* e *db*, resultando em obesidade espontânea pela ausência de leptina e seu principal receptor, ObRb. Desde então, outros modelos em camundongos e ratos têm sido gerados, tanto pelo isolamento de mutação espontânea, caso dos ratos obesos *fa/fa* (Zucker & Zucker, 1961), quanto por manipulação genética, caso de linhagens *knockout* que apresentam fenótipo de obesidade, ou ainda por indução de obesidade pela alimentação com dieta hipercalórica. O estudo do fenótipo em animais com genes inibidos espontaneamente ou por engenharia genética são adequados para determinar o papel do gene em questão nos diferentes parâmetros da obesidade.

Os comportamentos promotores da obesidade humana são alimentação inadequada, altamente calórica e rica em carboidratos e gordura, associada ao reduzido gasto energético; portanto, uma forma de mimetizar a obesidade humana em modelos animais é reproduzir comportamento semelhante, submetendo-os à dieta hipercalórica. Dentre os modelos de obesidade induzida por dieta hipercalórica de longa duração, as características patológicas a serem estudadas são determinadas pela composição da dieta. Assim, dieta rica em carboidratos simples induz obesidade associada a diabetes moderada, enquanto dieta hiperlipídica induz acúmulo lipídico no tecido adiposo e resistência hipotalâmica à leptina (Van Heek *et al.*, 1997).

Neste trabalho, a dieta hiperlipídica foi composta de 60% de teor lipídico em kcal, enquanto a dieta padrão foi composta de 10% de teor lipídico em kcal. A dieta hiperlipídica foi formulada de modo a apresentar teor de carboidratos reduzido em relação à dieta controle para promover o aumento do consumo de gordura enquanto fonte energética, como forma de assegurar que a hiperleptinemia seja mais importante na regulação de efeitos metabólicos do que a hiperglicemia e/ou hiperinsulinemia.

A utilização de animais C57Bl/6 neste modelo promove contribuição mais relevante para a literatura, pois permite a comparação com dados da literatura acerca de animais *ob/ob* e *db/db*, uma vez que o isolamento destes animais deu-se a partir da linhagem C57Bl/6. O modelo estabelecido para este estudo reproduz o modelo de Lin *et al.* (2000). Interessante notar que o peso, a glicemia e a adiposidade dos animais que receberam dieta hiperlipídica são moderados quando comparados com animais *ob/ob* e *db/db*. Ainda assim, este modelo é muito utilizado para o estudo da obesidade por se aproximar da obesidade humana, que não

apresenta mutações genéticas extremas, além de reproduzir aumento de peso significativo, hiperleptinemia associada à alta ingesta calórica e resistência hipotalâmica à leptina.

O acúmulo lipídico em macrófagos peritoneais de animais obesos é efeito das alterações metabólicas e hormonais nestes animais, o que inclui a hiperleptinemia. Interessante que, apesar da presença de corpúsculos lipídicos em macrófagos estar associada a sua ativação, não há recrutamento de neutrófilos para o peritônio, apresentando-se como um aspecto da inflamação subclínica observada na obesidade. Quando animais obesos são estimulados com leptina i.p., há aumento de corpúsculos lipídicos em macrófagos, bem como recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Estes dados sugerem que o estímulo agudo com leptina aumenta o perfil inflamatório de macrófagos peritoneais em animais obesos, sem promover maior recrutamento de neutrófilos.

A literatura mostra que a dose de leptina utilizada neste estudo é capaz de inibir o apetite de animais não-obesos, mas incapaz de inibir o apetite de animais obesos (Lin *et al.*, 2000). A avaliação dos níveis plasmáticos de leptina mostra que, em animais obesos, leptina exógena não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos 24 h após o estímulo. Assim, sem alteração nos níveis plasmáticos, o hipotálamo é incapaz de receber o sinal de inibição do apetite. Além disso, Van Heek *et al.*, 1997 mostram que animais obesos por dieta não são responsivos à leptina administrada intraperitonealmente, isto é, não apresentam inibição de apetite, mas são parcialmente responsivos à leptina administrada via intracerebroventricular; este fenômeno tem sido muitas vezes chamado de resistência periférica à leptina.

A observação de que animais obesos apresentam maior quantidade de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal pode ser explicada por alguns mecanismos. Como a barreira hematoencefálica tem papel fundamental na permeabilidade à leptina, contribuindo para a resistência hipotalâmica, têm sido investigados os efeitos da leptina sobre o endotélio. Assim, a maior quantidade de leptina no peritônio pode ser resultado da eventual dificuldade de absorção de leptina exógena para a circulação sanguínea, o que estaria associado à alteração da permeabilidade vascular periférica à leptina (Cao *et al.*, 2001). Outro ponto a se considerar é que a maior quantidade de leptina no peritônio pode ser resultado da produção local de leptina, já que existem relatos de aumento nos níveis de leptina em sítios inflamatórios, possivelmente produzidos pelos leucócitos locais. Este mecanismo, contudo, não é suficiente para explicar este achado em obesos, uma vez que animais não-obesos estimulados com leptina i.p. não apresentam acúmulo de leptina no peritônio, reforçando a teoria da dificuldade de absorção por alteração da permeabilidade vascular. De todo modo, a ocorrência de alterações vasculares não foi parte do escopo deste trabalho.

A obesidade não intensificou nem reduziu a quimiotaxia de neutrófilos à leptina exógena, uma vez que a migração de neutrófilos em animais obesos após o estímulo de leptina i.p. ocorre nos níveis dos não-obesos estimulados. Esta é uma observação interessante, pois sabe-se que a obesidade é acompanhada de um estado inflamatório subclínico caracterizado pelo aumento de TNF- $\alpha$ , dentre outras citocinas. Este trabalho descreveu que o efeito quimiotático de leptina sobre neutrófilos *in vivo* depende da participação de TNF- $\alpha$ ; além disso, o sobrenadante de lavado peritoneal de animais obesos apresenta níveis elevados de TNF- $\alpha$ , que não são incrementados pela injeção de leptina nestes animais. Ou seja, apesar de não haver diferença na quimiotaxia induzida por leptina em animais obesos e não-obesos, os mecanismos regulatórios podem estar/estão alterados na condição de obesidade, já que o aumento de TNF- $\alpha$  em animais não-obesos é condição necessária para a quimiotaxia, enquanto que a presença de TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal de obesos não está associado à migração de neutrófilos sem estimulação com leptina i.p., nem à intensificação da migração após a indução com leptina i.p.

A participação de TNF- $\alpha$  e seus receptores na patologia da obesidade tem sido investigada, uma vez que são conhecidos seus efeitos reguladores de termogênese no hipotálamo. No entanto, não estão esclarecidos os efeitos periféricos de TNF- $\alpha$  sobre o sistema imune inato na obesidade. Este trabalho não investigou mecanismos que estejam associados à observação de que animais obesos apresentam altos níveis peritoneais de TNF- $\alpha$  sem induzir migração de neutrófilos. Dados da literatura descreveram mecanismos de dessensibilização de neutrófilos a fatores quimiotáticos. Wiekowski *et al.* (2001) demonstraram que elevados níveis circulantes de KC causaram dessensibilização de seu receptor, CXCR2. Unglaub *et al.* (1987) descreveram a regulação da sensibilidade ao TNF- $\alpha$  via PKC em diferentes tipos celulares. Assim, é possível a ocorrência de dessensibilização de neutrófilos à TNF- $\alpha$  (Unglaub *et al.*, 1987, Wiekowski *et al.*, 2001).

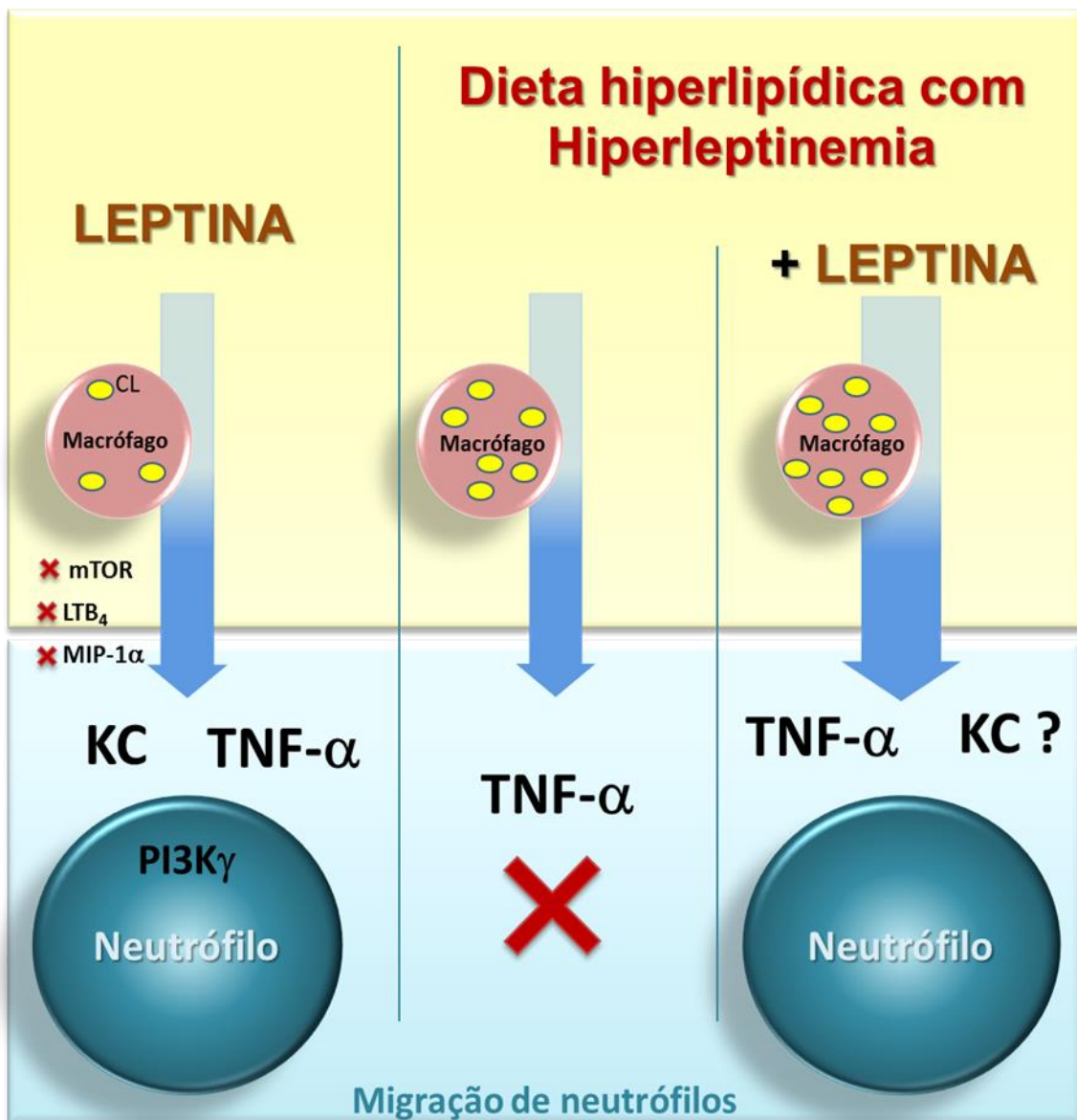
## **6. Conclusão**

Pode-se concluir com este trabalho que a leptina induz o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57Bl/6. A intensidade da migração parece estar associada com a dose. A cinética da migração ocorre de maneira típica de processo inflamatório agudo, em que há migração nos momentos iniciais de estímulo (1 h), seguido de pico em 6 h; a presença de neutrófilos na cavidade peritoneal permanece em 24 h.

Leptina promove recrutamento de neutrófilos por meio da indução da produção de TNF- $\alpha$  e KC por células peritoneais, sendo macrófagos peritoneais uma possível fonte. O recrutamento de neutrófilos por leptina é independente de LTB<sub>4</sub>, tendo sido descartada a possibilidade de LTB<sub>4</sub> ser produzido por macrófagos estimulados apenas com leptina. O recrutamento de neutrófilos por leptina também é independente de MIP-1  $\alpha$ .

A sinalização intracelular via PI3K $\gamma$  é necessária para que ocorra recrutamento de neutrófilos induzido por leptina. No entanto, a migração de neutrófilos por leptina não é dependente da via mTOR (mTORC1).

A obesidade murina induzida por dieta hiperlipídica é caracterizada por sobrepeso, adiposidade, hiperglicemia, hiperleptinemia e resistência hipotalâmica à leptina. Está acompanhada de inflamação subclínica, com elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal e predisposição de macrófagos peritoneais aos efeitos agudos de leptina. Além disso, em animais obesos, há recrutamento de neutrófilos após estimulação aguda com leptina, de maneira similar ao recrutamento em animais não obesos. Tais eventos indicam que estes leucócitos são responsivos à leptina apesar da resistência hipotalâmica.



**Esquema 6.1 – Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina.**

A leptina induz o recrutamento de neutrófilos de forma dependente de  $\text{TNF-}\alpha$  e KC, provavelmente produzidos por macrófagos, e de forma independente de  $\text{LTB}_4$  e  $\text{MIP-1}\alpha$ . A ativação de  $\text{PI3K}\gamma$ , mas não de  $\text{mTOR}$ , é necessária para a indução de migração de neutrófilos por leptina. A dieta hiperlipídica promove hiperleptinemia e resposta inflamatória aumentada, aumentando a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos após estimulação com leptina; no entanto, o recrutamento de neutrófilos por leptina não é alterado nestas condições. CL: corpúsculo lipídico.

## **7. Referências bibliográficas**



- Alberti, K. G. M. M.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. a; Fruchart, J.-C.; et al. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation*, **120** (16), 1640–5.
- Bahrenberg, G.; Behrmann, I.; Barthel, A.; Hekerman, P.; Heinrich, P. C.; Joost, H.-G.; Becker, W. (2002) Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol. Endocrinol.*, **16** (4), 859–72.
- Bellmeyer, A.; Martino, J. M.; Chandel, N. S.; Scott Budinger, G. R.; Dean, D. a; Mutlu, G. M. (2007) Leptin resistance protects mice from hyperoxia-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **175** (6), 587–94.
- Bełtowski, J.; Wójcicka, G.; Trzeciak, J.; Marciniak, A. (2006) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Src-dependent transactivation of the EGF receptor mediates the stimulatory effect of leptin on renal ERK and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Peptides*, **27** (12), 3234–44.
- Bjørbaek, C.; Kahn, B. B. (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.*, **59**, 305–31.
- Bjørbaek, C.; Uotani, S.; Silva, B. da; Flier, J. S. (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, **272** (51), 32686–95.
- Black, P. (2001) Why is the prevalence of allergy and autoimmunity increasing? *Trends Immunol.*, **22** (7), 354–5.
- Boden, G. (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **37** (3), 635–46, viii–ix.
- Bozza, P. T.; Magalhães, K. G.; Weller, P. F. (2009) Leukocyte lipid bodies—Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids*, **1791** (6), 540–551; Elsevier.
- Bruno, A.; Alessi, M.; Soresi, S.; Bonanno, A.; Riccobono, L.; Montalbano, A. M.; Albano, G. D.; et al. (2011) Increased leptin/leptin receptor pathway affects systemic and airway inflammation in COPD former smokers. *J. Inflamm. Res.*, **4**, 51–9.
- Bruno, A.; Conus, S.; Schmid, I.; Simon, H.-U. (2005) Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J. Immunol.*, **174** (12), 8090–6; Am Assoc Immunol.
- Caldefie-Chézet, F.; Poulin, a; Farges, M.-C.; Walrand, S.; Vasson, M.-P. (2006) Implication of leptin in the non-specific immune response of stressed rats. *Eur. J. Clin. Invest.*, **36** (9), 668–9.
- Caldefie-Chezet, F.; Poulin, A.; Tridon, A.; Sion, B.; Vasson, M. P. (2001) Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J. Leukoc. Biol.*, **69** (3), 414–8.
- Caldefie-Chezet, F.; Poulin, A.; Vasson, M. P. (2003) Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic. Res.*, **37** (8), 809–814.
- Cao, R.; Brakenhielm, E.; Wahlestedt, C.; Thyberg, J.; Cao, Y. (2001) Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98** (11), 6390–5.
- Cava, A. La; Matarese, G. (2004) The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **4** (5), 371–9.

- Charest, P. G.; Shen, Z.; Lakoduk, A.; Sasaki, A. T.; Briggs, S. P.; Firtel, R. a. (2010) A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev. Cell*, **18** (5), 737–49; Elsevier Ltd.
- Chen, H.; Charlat, O.; Tartaglia, L. a; Woolf, E. a; Weng, X.; Ellis, S. J.; Lakey, N. D.; et al. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, **84** (3), 491–5.
- Coleman, D. L. (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, **9** (4), 294–8.
- Coleman, D. L.; Hummel, K. P. (1969) Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.*, **217** (5), 1298–304.
- Considine, R. V; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, a; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.*, **334** (5), 292–5.
- Cota, D.; Proulx, K.; Smith, K. A. B.; Kozma, S. C.; Thomas, G.; Woods, S. C.; Seeley, R. J. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, **312** (5775), 927–30.
- D’Avila, H.; Melo, R. C. N.; Parreira, G. G.; Werneck-Barroso, E.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Bozza, P. T. (2006) Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.*, **176** (5), 3087–97.
- Das, A. M.; Ajuebor, M. N.; Flower, R. J.; Perretti, M.; Mccoll, S. R. (1999) Contrasting roles for RANTES and macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in a murine model of allergic peritonitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **117** (2), 223–229.
- Elks, C. M.; Francis, J. (2010) Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.*, **12** (2), 99–104.
- Fernandes, G. (1994) Dietary lipids and risk of autoimmune disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **72** (2), 193–7.
- Frederich, R. C.; Hamann, A.; Anderson, S.; Löllmann, B.; Lowell, B. B.; Flier, J. S. (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.*, **1** (12), 1311–4.
- Friedman, J. M.; Halaas, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395** (6704), 763–70.
- Fujita, Y.; Yanagida, H.; Mimori, T.; Jin, Z.-X.; Sakai, T.; Kawanami, T.; Sawaki, T.; et al. (2012) Prevention of fasting-mediated bone marrow atrophy by leptin administration. *Cell. Immunol.*, **273** (1), 52–8; Elsevier Inc.
- Gainsford, T.; Willson, T. a; Metcalf, D.; Handman, E.; McFarlane, C.; Ng, a; Nicola, N. a; et al. (1996) Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93** (25), 14564–8.
- Galgani, M.; Procaccini, C.; Rosa, V. De; Carbone, F.; Chieffi, P.; Cava, A. La; Matarese, G. (2010) Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Immunol.*, **185** (12), 7474–9.
- Gao, J.-L.; Wynn, T. A.; Chang, Y.; Lee, E. J.; Broxmeyer, H. E.; Cooper, S.; Tiffany, H. L.; et al. (1997) Impaired Host Defense, Hematopoiesis, Granulomatous Inflammation and Type 1-Type 2 Cytokine Balance in Mice Lacking CC Chemokine Receptor 1. *J. Exp. Med.*, **185** (11), 1959–1968.

- Ge, H.; Huang, L.; Pourbahrami, T.; Li, C. (2002) Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **277** (48), 45898–903.
- Gomez-Cambronero, J. (2003) Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett.*, **550** (1-3), 94–100.
- Gruen, M. L.; Hao, M.; Piston, D. W.; Hasty, A. H. (2007) Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293** (5), C1481–8.
- Gutierrez, D. a.; Hasty, a. H. (2011) Haematopoietic leptin receptor deficiency does not affect macrophage accumulation in adipose tissue or systemic insulin sensitivity. *J. Endocrinol.*, **212** (3), 343–351.
- Heek, M. Van; Compton, D. S.; France, C. F.; Tedesco, R. P.; Fawzi, a B.; Graziano, M. P.; Sybertz, E. J.; et al. (1997) Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J. Clin. Invest.*, **99** (3), 385–90.
- Hongo, S.; Watanabe, T.; Arita, S.; Kanome, T.; Kageyama, H.; Shioda, S.; Miyazaki, A. (2009) Leptin modulates ACAT1 expression and cholesterol efflux from human macrophages. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297** (2), E474–82.
- Hsu, a; Aronoff, D. M.; Phipps, J.; Goel, D.; Mancuso, P. (2007) Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clin. Exp. Immunol.*, **150** (2), 332–9.
- Hummel, K. P.; Dickie, M. M.; Coleman, D. L. (1966) Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, **153** (3740), 1127–8.
- INGALLS, A. M.; DICKIE, M. M.; SNELL, G. D. (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.*, **41** (12), 317–8.
- Jiang, L.; Li, Z.; Rui, L. (2008) Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **283** (42), 28066–73.
- Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue , insulin resistance , and hepatic steatosis in obesity, **116** (6).
- Kershaw, E. E.; Flier, J. S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89** (6), 2548–56.
- Kiguchi, N.; Maeda, T.; Kobayashi, Y.; Fukazawa, Y.; Kishioka, S. (2009) Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **384** (3), 311–5; Elsevier Inc.
- Kim, S. Y.; Lim, J. H.; Choi, S. W.; Kim, M.; Kim, S.-T.; Kim, M.-S.; Cho, Y. S.; et al. (2010) Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394** (3), 562–8; Elsevier Inc.
- Kobayashi, S.; Kishimoto, T.; Kamata, S.; Otsuka, M.; Miyazaki, M.; Ishikura, H. (2007) Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci.*, **98** (5), 726–33.
- Lee, P.-S.; Wilhelmson, A. S. K.; Hubner, A. P.; Reynolds, S. B.; Gallacchi, D. a; Chiou, T. T.; Kwiatkowski, D. J. (2010) mTORC1-S6K Activation by Endotoxin Contributes to Cytokine Up-Regulation and Early Lethality in Animals. *PLoS One*, **5** (12), e14399.
- Lemos, M. P.; Rhee, K. Y.; McKinney, J. D. (2011) Expression of the leptin receptor outside of bone marrow-derived cells regulates tuberculosis control and lung macrophage MHC

- expression. *J. Immunol.*, **187** (7), 3776–84.
- Li, L.; Renier, G. (2007) Adipocyte-derived lipoprotein lipase induces macrophage activation and monocyte adhesion: role of fatty acids. *Obesity (Silver Spring)*, **15** (11), 2595–604.
- Lin, S.; Thomas, T. C.; Storlien, L. H.; Huang, X. F. (2000) Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **24** (5), 639–46.
- Liu, L.; Das, S.; Losert, W.; Parent, C. a. (2010) mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev. Cell*, **19** (6), 845–57; Elsevier Inc.
- Liu, L.; Parent, C. A. (2011) Review series: TOR kinase complexes and cell migration. *J. Cell Biol.*, **194** (6), 815–24.
- Löllmann, B.; Grüniger, S.; Stricker-Krongrad, A.; Chiesi, M. (1997) Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238** (2), 648–52.
- Lord, G. M.; Matarese, G.; Howard, J. K.; Baker, R. J.; Bloom, S. R.; Lechler, R. I. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, **394** (6696), 897–901.
- Lugogo, N. L.; Hollingsworth, J. W.; Howell, D. L.; Que, L. G.; Francisco, D.; Church, T. D.; Potts-Kant, E. N.; et al. (2012) Alveolar Macrophages from Overweight/Obese Asthmatic Subjects Demonstrate a Pro-inflammatory Phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, (12).
- Mancuso, P. (2012) Obesity and respiratory infections: Does excess adiposity weigh down host defense? *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **null** (null).
- Mancuso, P.; Canetti, C.; Gottschalk, A.; Tithof, P. K.; Peters-Golden, M. (2004) Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 $\gamma$ ) protein expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **287** (3), L497–502.
- Mancuso, P.; Huffnagle, G. B.; Olszewski, M. a; Phipps, J.; Peters-Golden, M. (2006) Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **173** (2), 212–8.
- Marroqui, L.; Gonzalez, A.; Neco, P.; Caballero-Garrido, E.; Vieira, E.; Ripoll, C.; Nadal, A.; et al. (2012) Role of leptin in the pancreatic b-cell: effects and signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.*, **49** (1), R9–R17.
- Matsuda, A.; Jacob, A.; Wu, R.; Aziz, M.; Yang, W.-L.; Matsutani, T.; Suzuki, H.; et al. (2012) Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J. Nippon Med. Sch.*, **79** (1), 4–18.
- Mattioli, B.; Straface, E.; Quaranta, M. G.; Giordani, L.; Viora, M. (2005) Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J. Immunol.*, **174** (11), 6820–8.
- Maya-Monteiro, C. M.; Almeida, P. E.; D’Avila, H.; Martins, A. S.; Rezende, A. P.; Castro-Faria-Neto, H.; Bozza, P. T. (2008) Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **283** (4), 2203–10.
- Mezey, E.; Rennie-Tankersley, L.; Potter, J. J. (2005) Effect of leptin on liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337** (4), 1324–9.
- Montecucco, F.; Bianchi, G.; Bertolotto, M.; Viviani, G.; Dallegri, F.; Ottonello, L. (2006) Insulin primes human neutrophils for CCL3-induced migration: crucial role for JNK 1/2.

- Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1090**, 399–407.
- Montecucco, F.; Bianchi, G.; Gnerre, P.; Bertolotto, M.; Dallegri, F.; Ottonello, L. (2006) Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1069**, 463–71.
- Moore, S. I.; Huffnagle, G. B.; Chen, G.-H.; White, E. S.; Mancuso, P. (2003) Leptin Modulates Neutrophil Phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **71** (7), 4182–4185.
- Nijhuis, J.; Rensen, S. S.; Slaats, Y.; Dielen, F. M. H. van; Buurman, W. a; Greve, J. W. M. (2009) Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)*, **17** (11), 2014–8; Nature Publishing Group.
- O'Rourke, L.; Gronning, L.; Yeaman, S.; Shepherd, P. (2002) Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J. Biol. Chem.*, **277** (45), 42557–62.
- O'Rourke, L.; Yeaman, S. J.; Shepherd, P. R. (2001) Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes*, **50** (5), 955–61.
- Ottonello, L. (2004) Leptin as a Uremic Toxin Interferes with Neutrophil Chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15** (9), 2366–2372.
- Ottonello, L.; Montecucco, F.; Bertolotto, M.; Arduino, N.; Mancini, M.; Corcione, A.; Pistoia, V.; et al. (2005) CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2. *Cell. Signal.*, **17** (3), 355–363.
- Papathanassoglou, E.; El-Haschimi, K. (2006) Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J. Immunol.*, **176**, 7745–7752.
- Park, S.; Rich, J.; Hanses, F.; Lee, J. C. (2009) Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Lepr<sup>db</sup>/Lepr<sup>db</sup> mice to infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **77** (3), 1008–14.
- Pinho, V.; Russo, R. C.; Castro Russo, R. de; Amaral, F. a; Sousa, L. P. de; Barsante, M. M.; Souza, D. G. de; et al. (2007) Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *J. Immunol.*, **179** (11), 7891–8.
- Pini, M.; Gove, M. E.; Sennello, J. a; Baal, J. W. P. M. van; Chan, L.; Fantuzzi, G. (2008) Role and regulation of adipokines during zymosan-induced peritoneal inflammation in mice. *Endocrinology*, **149** (8), 4080–5.
- Porzionato, A.; Rucinski, M.; Macchi, V.; Stecco, C.; Castagliuolo, I.; Malendowicz, L. K.; Caro, R. De. (2011) Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the rat and human carotid body. *Brain Res.*, **1385**, 56–67; Elsevier B.V.
- Procaccini, C.; Jirillo, E.; Matarese, G. (2011) Leptin as an immunomodulator. *Mol. Aspects Med.*, **33** (1), 35–45; Elsevier Ltd.
- Rafail, S.; Ritis, K.; Schaefer, K.; Kourtzelis, I.; Speletas, M.; Doumas, M.; Giaglis, S.; et al. (2008) Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNF $\alpha$  involvement. *Thromb. Res.*, **122** (3), 366–75.
- Ramos, C. D. L.; Canetti, C.; Souto, J. T.; Silva, J. S.; Hogaboam, C. M.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. (2005) MIP-1 $\alpha$ [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates

- neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J. Leukoc. Biol.*, **78** (1), 167–77.
- Rodríguez, A.; Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; García-Navarro, S.; Rotellar, F.; Valentí, V.; Silva, C.; et al. (2011) Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96** (4), E586–97.
- Sasaki, A. T.; Firtel, R. a. (2006) Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. *Eur. J. Cell Biol.*, **85** (9-10), 873–95.
- Sasaki, T.; Irie-Sasaki, J.; Jones, R. G.; Oliveira-dos-Santos, A. J.; Stanford, W. L.; Bolon, B.; Wakeham, A.; et al. (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, **287** (5455), 1040–6.
- Shapiro, H.; Lutaty, A.; Ariel, A. (2011) Macrophages, meta-inflammation, and immunometabolism. *ScientificWorldJournal.*, **11**, 2509–29.
- Shapiro, N. I.; Khankin, E. V; Meurs, M. Van; Shih, S.-C.; Lu, S.; Yano, M.; Castro, P. R.; et al. (2010) Leptin exacerbates sepsis-mediated morbidity and mortality. *J. Immunol.*, **185** (1), 517–24.
- Siiteri, P. K. (1987) Adipose tissue as a source of hormones. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45** (1 Suppl), 277–82.
- Strandberg, L.; Verdrengh, M.; Enge, M.; Andersson, N.; Amu, S.; Onnheim, K.; Benrick, A.; et al. (2009) Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. *PLoS One*, **4** (10), e7605.
- Taleb, S.; Herbin, O.; Ait-Oufella, H.; Verreth, W.; Gourdy, P.; Barateau, V.; Merval, R.; et al. (2007) Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27** (12), 2691–8.
- Tanaka, M.; Suganami, T.; Kim-Saijo, M.; Toda, C.; Tsuiji, M.; Ochi, K.; Kamei, Y.; et al. (2011) Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B-cell development. *J. Neurosci.*, **31** (23), 8373–80.
- Tanaka, M.; Suganami, T.; Sugita, S.; Shimoda, Y.; Kasahara, M.; Aoe, S.; Takeya, M.; et al. (2010) Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. *Endocr. J.*, **57** (1), 61–72.
- Tartaglia, L. a. (1997) The leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, **272** (10), 6093–6.
- Tartaglia, L. a; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G. J.; et al. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, **83** (7), 1263–71.
- Tschöp, J.; Nogueiras, R.; Haas-Lockie, S.; Kasten, K. R.; Castañeda, T. R.; Huber, N.; Guanciale, K.; et al. (2010) CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. *J. Neurosci.*, **30** (17), 6036–47.
- Tu, H.; Hsueh, H.; Kastin, A. J.; Wu, X.; Pan, W. (2010) Unique leptin trafficking by a tailless receptor. *FASEB J.*, **24** (7), 2281–91.
- Tu, H.; Kastin, A. J.; Hsueh, H.; Pan, W. (2008) Soluble receptor inhibits leptin transport. *J. Cell. Physiol.*, **214** (2), 301–5.
- Tu, H.; Pan, W.; Feucht, L.; Kastin, A. J. (2007) Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-ObRd. *J. Cell. Physiol.*, **212** (1), 215–22.
- Unglaub, B. Y. R.; Maxeiner, B.; Thoma, B.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. (1987) Down regulation of TNF sensitivity via modulation of TNF binding capacity by PKC

- activators. *Cell*, **166** (December), 1788–1797.
- Uotani, S.; Bjørbaek, C.; Tornøe, J.; Flier, J. S. (1999) Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*, **48** (2), 279–86.
- Vernooy, J. H. J.; Bracke, K. R.; Drummen, N. E. a; Pauwels, N. S. a; Zabeau, L.; Suylen, R. J. van; Tavernier, J.; et al. (2010) Leptin modulates innate and adaptive immune cell recruitment after cigarette smoke exposure in mice. *J. Immunol.*, **184** (12), 7169–77.
- Vernooy, J. H. J.; Drummen, N. E. a; Suylen, R. J. van; Cloots, R. H. E.; Möller, G. M.; Bracke, K. R.; Zuyderduyn, S.; et al. (2009) Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. *Thorax*, **64** (1), 26–32.
- Wang, M. Y.; Zhou, Y. T.; Newgard, C. B.; Unger, R. H. (1996) A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett.*, **392** (2), 87–90.
- Wells, J. C. K. (2012) Obesity as malnutrition: The role of capitalism in the obesity global epidemic. *Am. J. Hum. Biol. - Off. J. Hum. Biol. Counc.*, **276** (January), 261–276.
- Wiekowski, M. T.; Chen, S. C.; Zalamea, P.; Wilburn, B. P.; Kinsley, D. J.; Sharif, W. W.; Jensen, K. K.; et al. (2001) Disruption of neutrophil migration in a conditional transgenic model: evidence for CXCR2 desensitization in vivo. *J. Immunol.*, **167** (12), 7102–10.
- World Health Organization. (2000) WHO TRS 894 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*
- World Health Organization. (2012) Obesity and overweight. *Fact sheet N°311*. Retrieved August 14, 2012, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Xu, H.; Barnes, G. T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C. J.; Sole, J.; et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, **112** (12), 1821–1830.
- Yang, Z.; Lei, Z.; Li, B.; Zhou, Y.; Zhang, G.-M.; Feng, Z.-H.; Zhang, B.; et al. (2010) Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating alphav integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Sci.*, **101** (2), 494–500.
- Yazdanbakhsh, M.; Biggelaar, a van den; Maizels, R. M. (2001) Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol.*, **22** (7), 372–7.
- Zarkesh-Esfahani, H.; Pockley, A.; Wu, Z.; Hellewell, P.; Weetman, A.; Ross, R. (2004) Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J. Immunol.*, **172** (3), 1809–14.
- Zarkesh-Esfahani, H.; Pockley, G.; Metcalfe, R. a; Bidlingmaier, M.; Wu, Z.; Ajami, A.; Weetman, a P.; et al. (2001) High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol.*, **167** (8), 4593–9.
- Zhang, R.; Sun, P.; Jiang, Y.; Chen, Z.; Huang, C.; Zhang, X. (2010) Genome-wide haplotype association analysis and gene prioritization identify CCL3 as a risk locus for rheumatoid arthritis. *Int. J. Immunogenet.*, **37** (4), 273–8.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372** (6505), 425–32.
- Zucker, L.; Zucker, T. (1961) Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.*, **52**, 275–278.