

BRUNA AGUIAR GONTIJO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LEPTINA EM CÉLULAS
ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS NOD (DIABÉTICO NÃO
OBESO) E BALB-C. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA
PRÉ-ESTIMULAÇÃO COM ADJUVANTE
COMPLETO DE FREUND**

CAMPINAS

2005

BRUNA AGUIAR GONTIJO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LEPTINA EM CÉLULAS
ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS NOD (DIABÉTICO NÃO
OBESO) E BALB-C. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA
PRÉ ESTIMULAÇÃO COM ADJUVANTE
COMPLETO DE FREUND**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

CAMPINAS

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G589a Gontijo, Bruna Aguiar
Avaliação dos efeitos da leptina em células esplêndidas de camundongos Nod (diabético não obeso) e Bal-C. Estudo da influência da pré estimulação com adjuvante completo de Freund / Bruna Aguiar Gontijo. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Ricardo de Lima Zollner
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. Leptina. 3. Citocinas. 4. Camundongo.
I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: "Evaluation of the leptin effect in spleen cells of NOD (non obese diabetic) and Balb-c mice. Study of the influence of pre stimulation with Complete Freund Adjuvant"

Keywords: • Diabetes Mellitus

- Leptin
- Cytokines

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Ricardo de Lima Zollner

Prof Dr Luiz Henrique Barbosa Boechat

Profa. Dra. Denise Engelbrechat Zanut Wittmann

Data da defesa: 31-08-2005

Banca Examinadora da Dissertação de Tese de Mestrado

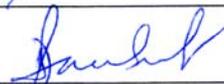
Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Luiz Henrique Barbosa Boechat



2. Prof(a). Dr(a). Denise Engelbrecht Zantut Wittmann



3. Prof(a). Dr(a). Ricardo de Lima Zollner



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31/08/2005

*Amigos queridos, pessoas especiais,
sonhos, planos, fé na vida , no amor...*

*São estas as alegrias que dão
valor especial à nossa existência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Ricardo de Lima Zollner, pela confiança, oportunidade, orientação e incentivo à pesquisa.

Aos Profs Dr Luiz Henrique Boechat e Dra Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann por aceitarem compor a banca examinadora.

A minha família pelo apoio, confiança, carinho, compreensão e incentivo.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE), Conceição Aparecida Vilella, Margarida Melo (Meg), Gláucia, Ana Paula Perroud, Maira, Lica, Rhubia, Carina, Karla, Priscila, Leonardo, Thiago, Ana Rachel e Letícia, pelo apoio, carinho, compreensão e ajuda valiosa na realização deste trabalho.

Aos amigos que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

A Cristiane, secretária da Pós-Graduação/Departamento de Clínica Médica e Renata Maia, secretária da Comissão de Pós-Graduação/FCM, pela paciência, disposição e prontidão em ajudar.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Diabetes Mellitus	17
1.2- Camundongo Diabético Não-Obeso (NOD) como modelo experimental de autoimunidade	18
1.3- Adjuvante Completo de Freund	19
1.4- Citocinas e Diabetes	20
1.5- Leptina e seu potencial Imunomodulador	21
2- OBJETIVOS	25
3- MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1- Animais	28
3.2- Protocolo experimental e Sacrifício dos Animais	28
3.3- Obtenção de Células Mononucleares do Baço	29
3.4- Viabilidade Celular	29
3.5- Cultura de Células mononucleares do Baço e Estímulos	29
3.6- Estimativa da proliferação celular por meio de Ensaio com MTT	30
3.7- Extração de RNA Total	30
3.7.1- Análise do RNA Total Extraído.....	31
3.7.2- Transcrição Reversa do RNA Total Extraído (cDNA).....	31

3.7.3- Amplificação do cDNA pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	32
3.7.4- Análise da PCR por Eletroforese em gel.....	33
3.8- Análise Estatística.....	33
4- RESULTADOS.....	34
4.1- Viabilidade celular - Estimativa de Proliferação.....	35
4.2- Expressão de Citocinas em Células Esplênicas.....	38
4.2.1- TNF- α	38
4.2.2- IFN- γ	41
4.2.3- IL1 β	44
4.2.4- IL-12.....	47
4.2.5- IL-2.....	50
5- DISCUSSÃO.....	53
6- CONCLUSÕES.....	58
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
BB	Bio-breeding
NOD	Non obese diabetic / diabético não obeso
NOD-uni	NOD/ Unicamp
TH1	Celulas T helper tipo 1
TH2	Celulas T helper tipo 2
IL	Interleucina
TNFα	Fator de necrose Tumoral α
IFNγ	Interferon Gama
CD	Cluster differentiation
KDa	“Kilo Dalton”
WHO	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
SPF	Specific Patogen free/ Livre de patógenos específico
Db/db	Deficiência receptor de leptina
Ob/ob	Deficiência produção de leptina
OBR	Receptor de leptina
OB-Rb	Receptor longo de leptina
ConA	Concanavalina A
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium]

RNA	Ácido ribonucléico
DEPC	Dietil pirocarbonato
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia por transcriptase reversa
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
DC	Células Dendríticas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
PBS	Tampão fosfato salina
NK	Natural Killer
BM	Biologia Molecular
CFA	Adjuvante Completo de Freund
OD	Densidade óptica
JAK	Janus quinase
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
ERK	Extracellular Regulated Kinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
SOCS	Supressor da sinalização de citocinas

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Tabela representativa dos primers utilizados com suas seqüências descritas obedecendo à estratégia sense e anti-sense: TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-2, IL-12 e Ciclofilina (Cy - Gene estrutural).....	33

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Gráfico representativo do Estudo de Viabilidade Celular - Estimativa de Proliferação.....	37
Figura 2 Gráfico representativo da Expressão Gênica da Citocina TNF- α em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-c.....	40
Figura 3 Gráfico representativo da Expressão Gênica da Citocina IFN- γ em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-c.....	43
Figura 4 Gráfico representativo da Expressão Gênica da Citocina IL1- β em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-c.....	46
Figura 5 Gráfico representativo da Expressão Gênica da Citocina IL-12 em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-c.....	49
Figura 6 Gráfico representativo da Expressão Gênica da Citocina IL-2 em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-c.....	52

RESUMO

A Leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo, estudos sugerem sua relação com o aumento do processo inflamatório observado no diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) em camundongos NOD (diabético não obeso), modelo experimental desta doença. Neste estudo, analisou-se o efeito da leptina sobre a viabilidade das células em cultura e na expressão de citocinas pro-inflamatórias (TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-12 e IL-2) por RT-PCR. Além disso, analisou-se a resposta induzida pela leptina em cultura de células esplênicas, após o estímulo *in vivo* com adjuvante Completo de Freund (CFA). Os resultados sugerem que a leptina modula a expressão de citocinas pro-inflamatórias, sendo esta modulação específica para cada citocina estudada, sem relação dose dependência, mas de acordo com a resposta imunológica desencadeada pelo efeito do CFA em camundongos NOD e Balb-C.

ABSTRACT

Leptin is a hormone produced mainly by the adipocytes, studies suggest that can be related with the inflammatory process in type 1 Diabetes (IDDM) observed in NOD mice (diabetic non-obese), a classic experimental model of autoimmune diabetes. In this study, we analyze the leptin effect on cell culture viability and pro-inflammatory cytokines expression in NOD and BALB-C mice spleen cells. The spleen cells were cultivated 24, 48 and 72 hours with different leptin concentrations and the pro-inflammatory cytokines expression (TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-2, IL-12) were addressed by RT-PCR. Furthermore, we studied the leptin-induced spleen cell response in culture, after in vivo Complete Freund Adjuvant (CFA) stimulation. Our results suggest that leptin can modulates the proinflammatory cytokines expression without relation to dependent on the dose but in accordance with the status of immune response promoted by CFA effect in Balb-C and NOD mice.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (1) é definido pela Organização Mundial de Saúde como desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, envolvendo a produção, metabolização e ação da insulina (2).

Vários processos patogênicos podem estar envolvidos no desenvolvimento do Diabetes Mellitus, incluindo destruição das células β pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina e outros fatores que podem resultar na resistência à ação deste hormônio. Considerando as características etiológicas do Diabetes Mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em dois tipos: Tipo 1 - Autoimune ou idiopático e Tipo 2: DM-2 resistência à insulina (3).

O início do Diabetes Mellitus auto-imune (DM-1) é, na maior parte das vezes, agudo acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes (4). Os aspectos morfológicos do processo inflamatório inclui infiltração mononuclear progressiva nas ilhotas pancreáticas com destruição seletiva das células β produtoras de insulina, resultando na deficiência deste hormônio (5).

Diversas evidências apontam para origem auto-imune do DM-1 (6), entre elas, a presença de clones auto-reativos de linfócitos T, em função da perda da tolerância a componentes da célula β (1, 7). Entretanto admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar envolvidos, tornando seu entendimento mais complexo e assim, a reação auto-imune estaria associada a sinais locais e sistêmicos que levariam à destruição das células β (8).

A análise da patogênese do diabetes em humanos é limitada. Por esta razão, é importante destacar que grande parte das informações sobre a participação de linfócitos T na imunopatogênese do DM-1 decorre de investigações utilizando animais geneticamente predispostos a essa doença, como o camundongo NOD (diabético não obeso), rato BB (Bio-Breeding).

Estes estudos fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre as sub-populações de células T efectoras (9, 10) com a liberação de fatores de agressão que incluem citocinas e perforinas liberadas por linfócitos T, que contribuirão na destruição da célula β pancreática (11, 13). Tais moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células β e contribuindo para sua destruição.

1.2- Camundongo Diabético Não-Obeso (NOD) como modelo experimental de autoimunidade

O camundongo NOD representa o modelo experimental em que os animais desenvolvem espontaneamente o Diabetes Mellitus auto-imune (DM-1), semelhante ao observado em humanos. Essa linhagem foi desenvolvida a partir do cruzamento de uma linhagem CTS (propensa à catarata), com a linhagem não consangüínea ICR (14).

A linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no laboratório Shionogi Aburahi como modelo animal para DM-1(14) com prevalência do diabetes entre 70-80% em fêmeas e 20% em machos. A partir de então, a linhagem foi estabelecida em diversos centros de pesquisa por todo mundo (15).

No Brasil a colônia foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas(16), a partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França.

Atualmente, estes animais mantidos no centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresentam frequência cumulativa do DM-1 de 60-90% das fêmeas e 5-10% dos machos, entre 17^a e a 25^a semana de vida.

A polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observados nestes animais, acompanhados de rápida perda de peso (14).

Como no homem, o DM-1 apresentado por estes animais é caracterizado por duas fases; na primeira fase, definida como pré-diabética (insulite), ocorre infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (CD4 e CD8, macrófagos)

e de células dendríticas (DC). É um evento fundamental na fase inicial da doença, exercendo papel na patogênese de doenças auto-imunes mediadas por células T, como a apresentação de auto-antígenos, seguida de dano tecidual e morte por apoptose (17).

A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e conseqüente manifestação do diabetes (5).

Linfócitos T demonstram ter papel importante no desenvolvimento do DM-1 (18), no qual a ineficiência da eliminação de linfócitos auto-reativos contribui para o aparecimento da auto-imunidade (19). No decorrer da doença, células T CD4+ e CD8+ exercem papel sinérgico, uma vez que o desenvolvimento do DM-1 é dependente de ambos os subtipos de células (20).

Além disso, os linfócitos T CD4+ têm papel essencial no início da insulite e na progressão do DM-1, visto que o uso de anticorpos monoclonais anti-CD4+, pode suprimir a insulite e conseqüentemente, o aparecimento do DM-1 no camundongo NOD (21).

Este tipo celular é observado principalmente na fase precoce da infiltração (periinsular), onde são necessários para a expansão clonal e ativação de linfócitos T CD8+ através da produção de IL-2, (20). A proporção de células T CD8+ aumenta com a evolução da destruição das células produtoras de insulina, explicando o sinergismo entre os dois subtipos favorecendo o aparecimento do DM-1(22).

1.3- Adjuvante Completo de Freund

Adjuvantes são amplamente utilizados para contornar o problema de fraca imunogenicidade na pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas (23).

O Adjuvante Completo de Freund (CFA) é um dos imunomoduladores mais comumente utilizados. A imunização com este adjuvante ativa a resposta imunológica a antígenos, dada sua capacidade de ativação de células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas, pela *Micobacterium tuberculosis* componente do adjuvante. Este componente do CFA estimula linfócitos T a assumirem o subtipo TH1, já na ausência

deste o perfil adotado pelos linfócitos T é TH2. Contudo esta dicotomia não é rígida (24, 25).

A hiperimunização de animais experimentais com CFA emulsionado com antígeno, administrado subcutaneamente, seguido de injeções de reforço, com intervalos de semanas ou meses entre elas, resulta em altos níveis circulantes de antígeno/anticorpo específico, com forte resposta de linfócitos T e hipersensibilidade tardia (24).

Diversos estudos demonstram a capacidade imunomodulatória do CFA, tanto na indução como na utilização terapêutica, conforme demonstrado em varias doenças autoimunes em animais e humanos. Estes trabalhos denotam principalmente a capacidade deste composto em alterar o perfil dos elementos envolvidos na resposta imunológica (26).

Portanto, em doenças autoimunes experimentais, a ativação do sistema imune inato, mediada pelo CFA é importante não só por regular a fase precoce da resposta, mas por promover um excedente de células efetoras e reguladoras na fase tardia da resposta imune (24).

1.4- Citocinas e Diabetes

A análise da expressão de citocinas na insulite em camundongos NOD e BB demonstra grande variedade tanto em nível gênico quanto na produção da proteína (27).

Evidências favorecem o conceito de que as células β são destruídas em decorrência da falha na imunorregulação, levando a resposta auto-imune direta contra constituintes destas células (28, 29).

No camundongo NOD, o desequilíbrio entre a resposta TH1 e TH2, com predomínio do fenótipo TH1(pró-inflamatório), desempenha papel relevante na fisiopatologia das reações auto-imunes nesta linhagem (17).

Há correlações entre insulite destrutiva das células β e expressão de citocinas proinflamatórias do tipo 1 (TNF β , IFN γ , IL-2 e IL-12) em camundongos NOD, BB e pacientes com DM-1. Desta forma, várias citocinas participam da resposta autoimune que

leva a destruição das células β . A ausência de uma destas citocinas patogênicas não é suficiente para evitar o desenvolvimento do diabetes (27, 29, 30).

Na tentativa de explicar os mecanismos moleculares envolvidos na destruição das células β induzida pelas citocinas, aponta-se a produção de óxido nítrico e radicais livres pelas células expostas às citocinas e outras substâncias como a leptina, a qual pode estimular a resposta imune adaptativa pró-inflamatória TH1 (27, 31).

Acredita-se, que haja envolvimento direto das células linfocitárias (células efectoras) sobre as células β pancreáticas (células alvo), resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local, contribuindo para a destruição das ilhotas (32-35).

1.5- Leptina e seu potencial Imunomodulador

A leptina é um hormônio, produto do gene da obesidade (*ob*) de 16 KDa, produzido principalmente pelas células adiposase e, também, pelo tecido muscular esquelético, placenta e estômago (36). A expressão é proporcional à gordura corporal, sendo mais elevada em pessoas obesas, que apresentam, portanto, acúmulo de gordura corporal. Contudo mostra-se diminuindo durante jejum (37, 39).

O defeito no gene da leptina (*ob*) resulta em aumento da ingestão alimentar e na diminuição do gasto energético, levando à obesidade, demonstrando seu papel no balanço energético e metabolismo. O nível de leptina é usualmente maior em indivíduos obesos e em fêmeas exibindo, portanto, dimorfismo sexual (31, 39).

A leptina tem ação importante na regulação neuroendócrina e na homeostase de energia, assim como em outros processos fisiológicos que demandam energia como a reprodução, hematopoiese, angiogênese e respostas imunológicas (36, 40, 41).

Estruturalmente, este hormônio é semelhante à citocinas do tipo 1 (40, 42, 43). Desta forma, seus receptores também são semelhantes aos receptores de citocinas do tipo 1 (36, 44). A leptina atua na sinalização celular através de receptores próprios (*obR*),

com seis isoformas de receptores ObRa – ObRf, os quais são proteínas transmembrana, com domínio extracelular idêntico para todos os tipos de receptores e o domínio intracelular variando, segundo o receptor. As isoformas ObRa, ObRc, ObRd e ObRf formadas por 32 a 40 aminoácidos apresentam a forma curta do receptor de leptina.

Por outro lado, o receptor ObRb exibe a forma longa do receptor com 306 aminoácidos e o receptor solúvel ObRe, o qual embora não participe diretamente na sinalização da leptina, é relevante para a detecção dos níveis circulantes, livres ou ligadas ao receptor, para determinar sua ação (43).

O receptor da leptina é expresso em vários tipos celulares, como em células do hipotálamo, onde regula a homeostase de energia e funções neuroendócrinas, em células do sistema imune como linfócitos T (40), células NK, monócitos/macrófagos e células B (45) e, ainda, em células endoteliais, células β pancreáticas e hematopoiéticas (36).

A ligação da leptina ao seu receptor, recruta membros da família Janus quinase (JAK) que fosforilam os receptores e proteínas-alvo como STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), as quais se deslocam até o núcleo, induzindo a expressão de genes específicos, como reguladores negativos (SOCS3)

Assim como a via JAK2 – STAT3, outras vias são utilizadas na mediação da ação da leptina no sistema imunológico, como as vias MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e PI3´K (Fosfatidilinositol – Trifosfato Quinase). A via MAPK, parece mediar alguns efeitos anti apoptóticos enquanto a via PI3´K regula o consumo de glicose pelas células (40).

Desta forma, a leptina pode ajudar a restaurar as funções das células T prejudicadas pelo jejum (36).

Estas vias sinalizadoras induzem expressão de genes, incluindo reguladores negativos como a SOCS (supressor da sinalização de citocinas) (40), a qual inibe a fosforilação de JAK, suprimindo a ação das STATs nos eventos de sinalização da leptina (43, 46).

Desde seu descobrimento em 1994 por Zhang et al, vem crescendo o entendimento de seu papel fisiológico na saciedade, onde este hormônio integra diferentes funções endócrinas com efeito metabólico direto em tecidos periféricos (47).

A expressão do gene da leptina é regulada por vários fatores, incluindo outros hormônios e, pode ter sua produção aumentada pelos hormônios sexuais ovarianos e inibida pela testosterona, influenciando diretamente o eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA) (31, 36).

A insulina estimula a secreção de leptina durante alimentação. Da mesma forma, a queda da insulina durante o jejum antecipa a queda da leptina. A integração reguladora entre leptina e insulina, sugere possível participação da leptina na patofisiologia do diabetes mellitus tipo 1 e 2 (47).

Na deficiência nutricional, com redução da reserva energética, a leptina tem papel crucial em mecanismos adaptativos visando à economia de energia. Como a inflamação e a imunidade mediada por células requerem energia, a queda do nível de leptina promove economia no gasto energético, levando a redução na expansão e ativação das células imunes, para sustentar funções vitais (31).

Desta forma, a leptina associa o estado nutricional às respostas pró-inflamatórias TH1, onde o decréscimo do nível deste hormônio durante o jejum compromete a resposta pró-inflamatória do fenotipo TH1 (44).

A deficiência de leptina no organismo aumenta a sensibilidade a estímulos infecciosos e inflamatórios, causando defeito na hematopoiese e resultando na desregulação da produção de citocinas (41).

Em mamíferos, além da ação em células T, a leptina modula outros componentes do sistema imune incluindo hematopoiese, função de macrófagos, entre outras (41).

A ação da leptina na proliferação de linfócitos T ainda é controversa. Enquanto Martin-Romero et al (2000) relatam a necessidade de pré-estimulação de linfócitos para ação proliferativa da leptina, LORD et al (1998) sugerem que sua ação seja preferencialmente em células virgens e não de memória.

Em macrófagos/monócitos a leptina aumenta a função fagocítica através da ativação da fosfolipase, assim como estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-12, IL-1) (48).

Em neutrófilos, foi demonstrado que a leptina está envolvida em todo o processo de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, ativação e citotoxicidade (40). Além disso, a leptina pode direcionar a resposta imunológica para TH1, suprimindo a resposta TH2, atuando, como fator estimulante da produção de citocinas pró-inflamatórias e alterando desta forma, o balanço TH1/TH2 (38, 39, 40).

Em camundongos e humanos deficientes de leptina ou de seu receptor, observa-se prejuízo da função imune mediada por células (42). O camundongo com deficiência de leptina (*ob/ob*) ou de seu receptor (*db/db*) apresenta celularidade reduzida no baço e timo, deficiência na resposta imunológica pró-inflamatória mediada por células e na produção de anticorpos (31).

Em humanos, a deficiência congênita de leptina associa infecções a mortalidade infantil precoce, assim como a supressão de linfócitos e da imunidade TH1, condições estas que podem ser revertidas com a administração de leptina (40).

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- 1- Estudar a ação da leptina sobre células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C *in vitro*

Objetivos Específicos

Verificar:

- 1- Os efeitos da leptina sobre viabilidade celular/estimativa de proliferação celular em culturas de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C.
- 2- A expressão de citocinas em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C submetidas a culturas estimuladas com Leptina.
- 3- A resposta ao estímulo de leptina em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados *in vivo* com adjuvante completo de Freund.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Camundongos das linhagens NOD/Uni e Balb-C com quatro semanas de vida, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica), Unicamp, em condições SPF, eram transportados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental sob as mesmas condições, recebendo ração e água *ad libitum* até completarem oito semanas de vida, quando eram sacrificados. Os camundongos Balb-C eram empregados como controle de linhagem não relacionada e não diabética.

3.2- Protocolo experimental e Sacrifício dos Animais

Protocolo 1:

10 Camundongos das linhagens NOD e cinco Balb-C eram mantidos em condições SPF até oito semanas de vida quando eram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200µl de Tiopental 2,5%, sacrificados para coleta de células esplênicas para serem utilizadas para os ensaios de cultura de célula.

Protocolo 2:

Para avaliação dos efeitos da pré-estimulação com adjuvante, grupos compostos por cinco camundongos das linhagens Balb-C e cinco da linhagem NOD com seis semanas de vida eram estimulados com 200µl de emulsão contendo 100µl Adjuvante Completo de Freund (CFA) (Difco) e 100µl de solução fisiológica estéril nas patas traseiras. Estes animais eram mantidos durante duas semanas em condições SPF e ao final deste período eram sacrificados seguindo-se à retirada de células esplênicas para utilização nos protocolos de cultura celular.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp.

3.3- Obtenção de Células Mononucleares do Baço

Após a remoção asséptica os baços, eram colocados em tubos de ensaio contendo solução salina de Hank (Sigma Co, St Louis, EUA). Para obtenção das células, os baços eram cuidadosamente macerados utilizando peneiras (Sigma) e placas de Pétri estéreis. Após serem isoladas as células eram novamente colocadas em tubos de ensaio estéreis e lavadas por três vezes com solução salina de Hank's (Sigma Co, St Louis, EUA) e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Após a primeira centrifugação, o botão celular era tratado com tampão de lise com o objetivo de eliminar eritrócitos. O precipitado celular era diluído em meio RPMI1640 enriquecido com 0,1% de 2-Mercaptoetanol (1:5000), glutamina 0.2M (1%), 2% HEPES, 0,5% Antibiótico, 10% soro fetal bovino e 0,2% fungicida (2µg/ml).

3.4- Viabilidade Celular

Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o método por exclusão do corante Azul de Trypan, o qual não penetra através da membrana plasmática das células viáveis. Após a contagem na câmara de Neubauer - Hemocitômetro, a concentração de células foi ajustada para 2×10^6 células/ml.

3.5- Cultura de Células mononucleares do Baço e estímulos

As células esplênicas provenientes dos camundongos NOD, NOD estimulado com CFA *in vivo* (NODA), Balb-C e Balb-C estimulado com CFA *in vivo* (BALBA), foram colocadas em placas para cultura com 24 e 96 poços, cultivadas em meio RPMI1640 enriquecido com 0,1% de 2-Mercaptoetanol (1:5000), Glutamina 0.2M (1%), 2% HEPES, 0,5% Antibiótico (Estreptomicina), 10% Soro fetal bovino e 0,2% Fungicida (2µg/ml), por períodos de 24, 48 e 72 horas, em incubadora ambientada (5% CO², 37°C).

As culturas realizadas em triplicata eram estimuladas com Leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM e 2,5 µl/ml de Concanavalina A (ConA) como controle positivo de proliferação celular (resultados não apresentados) e sem estímulo.

Após cada período estipulado para cultura, o conteúdo das placas de 24 poços foram retirados e centrifugados, sendo o botão celular destinado à Biologia Molecular (BM) para análise da expressão gênica de citocinas, ressuspensão em 400µl de Guanidina sarcosyl e as placas de 96 poços foram utilizadas para o ensaio de proliferação celular.

3.6- Estimativa da proliferação celular por meio de ensaio com MTT

A estimativa da proliferação celular das células cultivadas era realizado utilizando-se a técnica de MTT (Brometo de [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5diphenyl tetrazolium bromide) (50). Após o período de incubação determinado, nas placas de 96 poços, era acrescida a cultura 10µl/poço de MTT (5 mg/ml em PBS), incubando-se por quatro horas. A seguir, retirava-se da estufa, acrescenta-se a cada poço 100µl/poço de SDS (10%), contendo HCL 0,01N e incubando-se por 15 minutos em temperatura ambiente.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectramax, utilizando 560 nm como comprimento de onda e 690 nm como referência de fundo.

3.7- Extração de RNA Total

As amostras de RNA total eram extraídas de células esplênicas provenientes das culturas através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol- Clorofórmio (51) adaptado no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) (52) conforme descrição a seguir.

As amostras eram homogeneizadas em solução de lise e inibidora de RNase de Guanidina Tiocianato 4M (Gibco, USA) contendo 2-Mercaptoetanol e Sarcosyl 0,5% (Sigma, EUA) pH 7,0. O volume do tampão de lise Guanidina (GBL) utilizado foi proporcional ao número de células, empregando-se normalmente 10 volumes de GBL.

Para a separação de proteínas e ácidos nucleicos, adicionou-se um volume igual de tampão Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), agitando-se vigorosamente para formação de emulsão. Posteriormente a preparação foi submetida à centrifugação por

cinco minutos à temperatura ambiente a 10.000g, recuperando-se a fase aquosa. Repetia-se o processo até a obtenção de material totalmente límpido.

A retirada do excesso de Fenol foi realizada pela extração com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa foi precipitado pela adição de três volumes de Etanol absoluto e Acetato de sódio pH 5.2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação foi mantida à - 80°C pelo período mínimo de 24 horas. Posteriormente, a preparação foi centrifugada a 14.000g por 20 minutos a 4°C. Após a retirada do Etanol, o precipitado foi diluído em 40µl de água ultrapura preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC) (Sigma, EUA).

3.7.1- Análise do RNA Total Extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Considerando-se adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8. Para a quantificação do RNA total aplicava-se a fórmula: $(OD_{260}/0,025) \times \text{diluição de leitura}/1000 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.7.2- Transcrição Reversa do RNA Total Extraído (cDNA)

Para a síntese do cDNA, eram padronizados 5µg de RNA total de amostras de baço para a realização do RT-PCR final. Assim, o volume de RNA total adicionado para a transcrição reversa foi calculado para a obtenção de 5µg/50µl de reação. Adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo dt (pt) e água ultrapura em quantidade suficiente para 28µl. Os tubos eram aquecidos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriou-se para 4°C por cinco minutos.

Para a ligação complementar dos primers ao RNA, adicionavam-se 21µl de solução-mãe (10µl de tampão Super RT, 5µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M, 1µl de RNAsin) incubando-se por dois minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima

Transcriptase reversa (Invitrogen) (200U), a reação processou-se em termocicladora programada para : 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e resfriamento da amostra até 4°C adaptado no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE) (53). Após a última etapa as amostras eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

3.7.3- Amplificação do cDNA pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

O procedimento-padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação 2µl de amostra de cDNA, adicionou-se 100ng de primer sense, 100ng de primer anti-sense, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase (GibcoBRL, EUA); 5µl de dNTP mix 5nM, 1,5µl de MgCl₂ 50mM e 33,5µl de água ultrapura), 2µl de cDNA e 1µl de óleo mineral. Em seguida os tubos foram transferidos para termocicladora nas seguintes condições programadas: Desnaturação a 94° C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para amplificação de 1µl da enzima taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene. Pareamento 58°C por 45 segundos, extensão dos primers a 72°C por 90 segundos, desnaturação dos primers a 95°C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4 °C. Os produtos das PCR foram armazenados a -20°C.

Tabela 1- Os primers utilizados com suas seqüências descritas acima obedeciam à estratégias sense e anti-sense: TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-2 , IL-12 e Ciclofilina (Cy - Gene estrutural), pb= pares de bases.

Primer	Sense	Anti-Sense	Produto
TNF α	5'CTTAGACTTTGCGGAGTCCG3'	5'CCCTGTCACATGGACCTGACA3'	254pb
IFN γ	5'AAGTGGCATAGATGTGGAAG3'	5'CTGGACCTGTGGGTTGTTGA3'	265pb
IL-1 β	5'AGGCTCCGAGATGAACAA3'	5'AAGGCATTAGAAACAGTCC 3'	450pb
IL-2	5'CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG3'	5'CTTATGTGTTGTAAGCAGGAGGTAC3'	366pb
IL-12	5'AGCTTTTGTGACAACCAATAAGAAC3'	5'CAAACCTCACAGAGATCTGCCTG3'	297pb
Cy	5'GACAGCAGAAAAATTTTCGTGC3'	5'GGTTCTGACTCACCGACCT3'	276pb

3.7.4- Análise da PCR por Eletroforese em gel

A amplificação do cDNA com os respectivos primers para TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-12 e IL-2, eram analisados através de Eletroforese em gel de agarose 1,5% e revelados com brometo de etídio, através de excitação de luz UV e o registro feito através do sistema de documentação fotográfica NucleoVision, Nucleo Tech, CA, USA.. A intensidade das bandas era analisada com software GelExpert, NucleoTech, CA, EUA. Para a semiquantificação do mRNA as áreas de pixel eram determinadas pela intensidade de cada banda e comparadas com as da ciclofilina. Os valores foram transformados em Unidades Arbitrárias (pixel index) através da fórmula: Unidades Arbitrárias = (pixel das citocinas ou apoptose/ pixel da ciclofilina do respectivo grupo) x 100

3.8- Análise Estatística

Para análise dos resultados era utilizado o método ANOVA não-paramétrico (Kruskall-Wallis), com pós-teste de Dunn, ou teste *T Student* para análises comparativas individuais entre tratados previamente com adjuvante ou não. Valores de p<0,05 foram considerados significativos

4- RESULTADOS

4.1- Viabilidade celular - Estimativa de Proliferação

O efeito da Leptina na viabilidade celular foi estudado em células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*.

Quando analisados as culturas realizadas com células provenientes de camundongos NOD, observou-se no período de 24 horas, maior viabilidade celular das culturas estimuladas com 2,5 nM de leptina ($0,250\pm 0,013$), ao se comparar à cultura não estimulada ($0,1805\pm 0,016$). Por outro lado, as culturas sob estímulo de 5,0 nM ($0,048\pm 0,011$) e 10,0nM de leptina ($0,033\pm 0,011$) apresentaram menor viabilidade celular quando comparadas à cultura sem estímulo ($p<0,05$).

No período de 48 horas, notou-se maior viabilidade das células mantidas sob estímulo de 2,5 nM de leptina ($0,160\pm 0,027$) e menor viabilidade das células mantidas sob estímulo de 10,0 nM de leptina ($0,034\pm 0,010$), quando relacionadas às células mantidas sem estímulo ($0,062\pm 0,007$) ($p<0,05$).

As culturas mantidas sob estímulo de leptina nos concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM ($0,1425\pm 0,030$; $0,192\pm 0,076$; $0,212\pm 0,025$), apresentaram no período de 78 horas viabilidade celular significativamente maior quando comparadas à cultura mantida sem estímulo ($0,02\pm 0,007$) ($p<0,05$) (fig. 1A).

Comparando-se as células provenientes de camundongos NOD estimulados *in vivo* com CFA (NODA) e submetidas à cultura no período de 24 horas notou-se viabilidade celular significativamente maior na cultura estimulada por 2,5 nM de leptina ($0,240\pm 0,024$) em relação à cultura não estimulada ($0,141\pm 0,011$) ($p<0,05$).

No tempo de cultura de 48 horas, observou-se menor viabilidade celular nas culturas mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações 2,5 nM ($0,1015\pm 0,009$) e 10,0 nM ($0,105\pm 0,002$), quando comparadas às células mantidas sem estímulo ($0,152\pm 0,003$) ($p<0,05$).

A análise no período de 72 horas, mostrou maior viabilidade das culturas sob estímulo de 2,5 nM ($0,193\pm 0,003$) e 5,0 nM ($0,182\pm 0,009$) ao serem relacionadas às células sem estímulo de leptina ($0,136\pm 0,011$) ($p<0,05$) (fig. 1B).

Nas culturas de células esplênicas provenientes de camundongos Balb-C, no período de 24 horas, foi observado menor viabilidade celular nas culturas estimuladas com leptina nas várias concentrações (2,5 - $0,215 \pm 0,610$; 5,0 - $0,272 \pm 0,069$; 10,0 - $0,291 \pm 0,092$), quando relacionadas à cultura não estimulada ($0,643 \pm 0,164$) ($p < 0,05$). Por outro lado, as células mantidas em cultura por 48 e 72 horas sob estímulo de 5,0 nM de leptina (48 - $0,591 \pm 0,048$; 72 - $0,225 \pm 0,031$) apresentaram viabilidade significativamente maior quando relacionada à cultura sem estímulo (48 - $0,362 \pm 0,061$; 72 - $0,128 \pm 0,037$) ($p < 0,05$) (fig. 1C).

As culturas de células esplênicas de camundongos Balb-C estimulados com CFA *in vivo* (BALBA), mantidas com leptina nas concentrações de 2,5 nM ($0,919 \pm 0,115$), 5,0 nM ($0,954 \pm 0,156$) e 10,0 nM ($0,818 \pm 0,083$), no período de 48 horas, apresentaram maior viabilidade celular quando comparadas às culturas mantidas sem estímulo ($0,519 \pm 0,206$). Já no período de 72 horas, as culturas estimuladas de 5,0 nM de leptina ($0,589 \pm 0,071$) apresentaram maior viabilidade celular em relação à cultura não estimulada ($0,335 \pm 0,220$) ($p < 0,05$). Contudo, nitidamente pôde-se observar viabilidade celular mais elevada no período de 24 horas, embora sem diferença entre as culturas (Fig.1D).

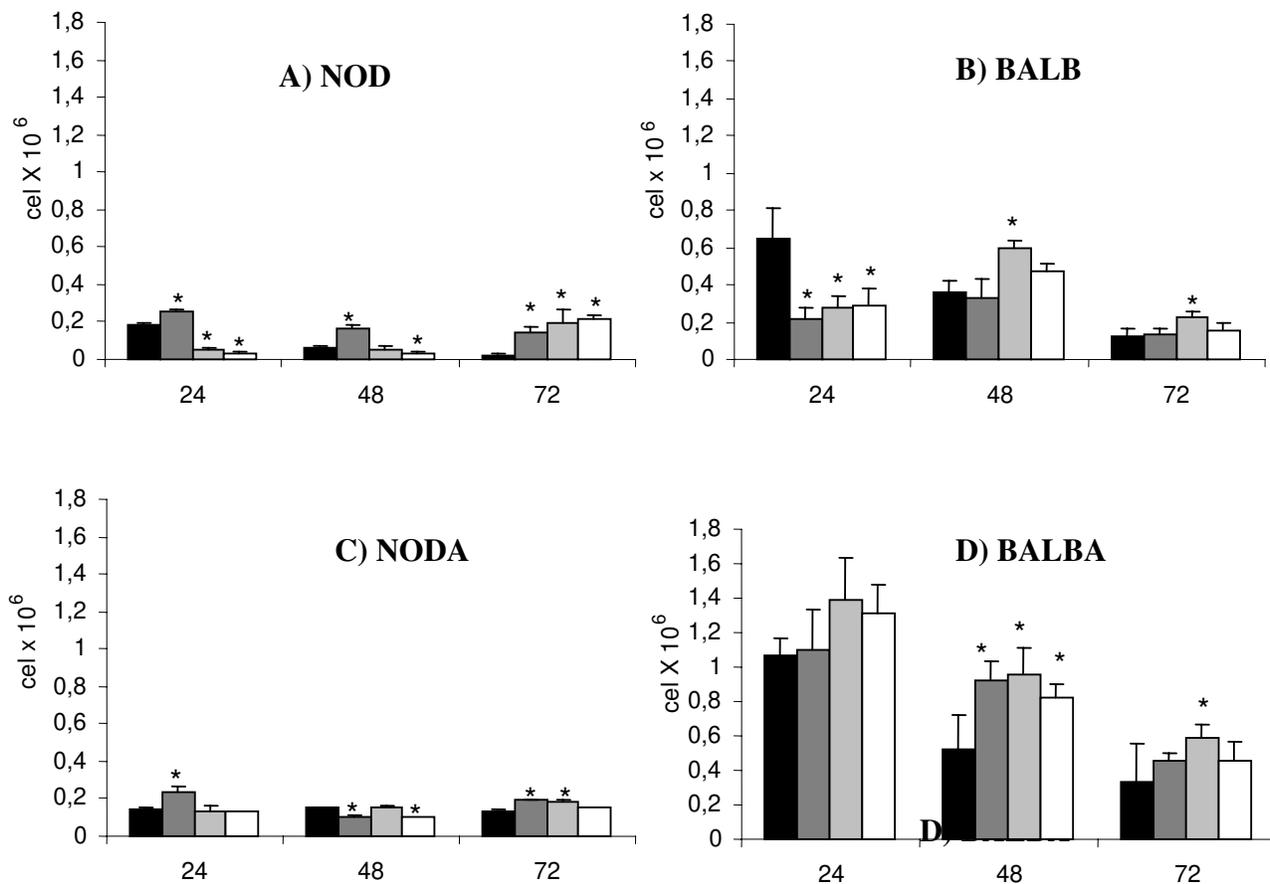


Figura 1- Estudo de Viabilidade Celular – Estimativa de Proliferação: Culturas realizadas com células splênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM de leptina e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico (Kruskall-Wallis), considerando * $p < 0,05$.

4.2- Expressão de Citocinas em Células Esplênicas

4.2.1- TNF- α

A análise da expressão gênica de TNF α em cultura de células provenientes de camundongos NOD mostrou níveis diminuídos de mRNA no período de 24 horas nas culturas estimuladas com leptina nas concentrações de 5,0 (92,2 \pm 14,5) e 10,0 nM (106,2 \pm 8,6) em relação à cultura não estimulada (157,5 \pm 18,9) (p<0,05).

Não houve grande variabilidade nos níveis desta citocina nos períodos de 48 e 72 horas de cultura (p>0,05) (fig 2A).

Utilizando-se células de camundongos NOD estimulados com CFA *in vivo* (NODA) observou-se níveis reduzidos na expressão gênica de TNF α nas concentrações de 2,5 nM (50,42 \pm 5,8) e 5,0 nM de leptina (39,02 \pm 11,0) em relação às culturas não estimuladas (73,52 \pm 9,3), durante o período de 24 horas (p<0,05).

Resultado semelhante foi encontrado no período de 48 horas, onde se notou diminuição dos níveis da citocina nas culturas estimuladas com leptina nas várias concentrações (2,5 - 49,01 \pm 5,3; 5,0 - 45,00 \pm 5,4; 10,0 - 45,88 \pm 31,4) quando relacionadas à cultura sem estímulo (114,59 \pm 12,9) (p<0,05). A análise do período de 72 horas não mostrou diferença estatística (p>0,05) (fig 2B).

As culturas realizadas com células de camundongos Balb-C (BALB) mantidas sob estímulo de 10,0 nM de leptina (167,9 \pm 20,1), no período de 24 horas apresentaram maior expressão gênica de TNF α quando comparadas à cultura sem estímulo (92,8 \pm 14,0). Contudo, no período de 48 horas, o estímulo de 10,0 nM de leptina (102,8 \pm 3,6) apresentou níveis significativamente inferiores da citocina estudada quando comparado à cultura não estimulada (165,0 \pm 46,2) (p<0,05). A análise no período de 72 horas não mostrou diferença estatística (p>0,05) (fig 2C).

A expressão de mRNA de TNF α em culturas de células de camundongos Balb-C estimulados *in vivo* com CFA (BALBA) mostrou-se reduzida nas culturas mantidas sob estímulo de 5,0 nM de leptina (44,9 \pm 3,5), quando comparadas às células mantidas sem

estímulo ($91,5 \pm 14,4$) no período de 24 horas. No tempo de 48 horas as culturas estimuladas com 2,5 nM ($75,11 \pm 17,4$) e 5,0 nM de leptina ($52,3 \pm 3,9$) apresentaram níveis significativamente menores da citocina quando relacionadas às culturas sem estímulo ($107,5 \pm 9,5$). No entanto, no período de 72 horas, a cultura estimulada por 2,5 nM de leptina ($191,7 \pm 4,9$) apresentou níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$, já nas células mantidas sob estímulo de 5,0 ($61,2 \pm 0,5$) e 10,0 nM de leptina ($65,4 \pm 6,7$) foi observada redução na expressão de $\text{TNF}\alpha$, quando relacionadas à cultura não estimulada ($152,1 \pm 6,4$) ($p < 0,05$) (fig 2D).

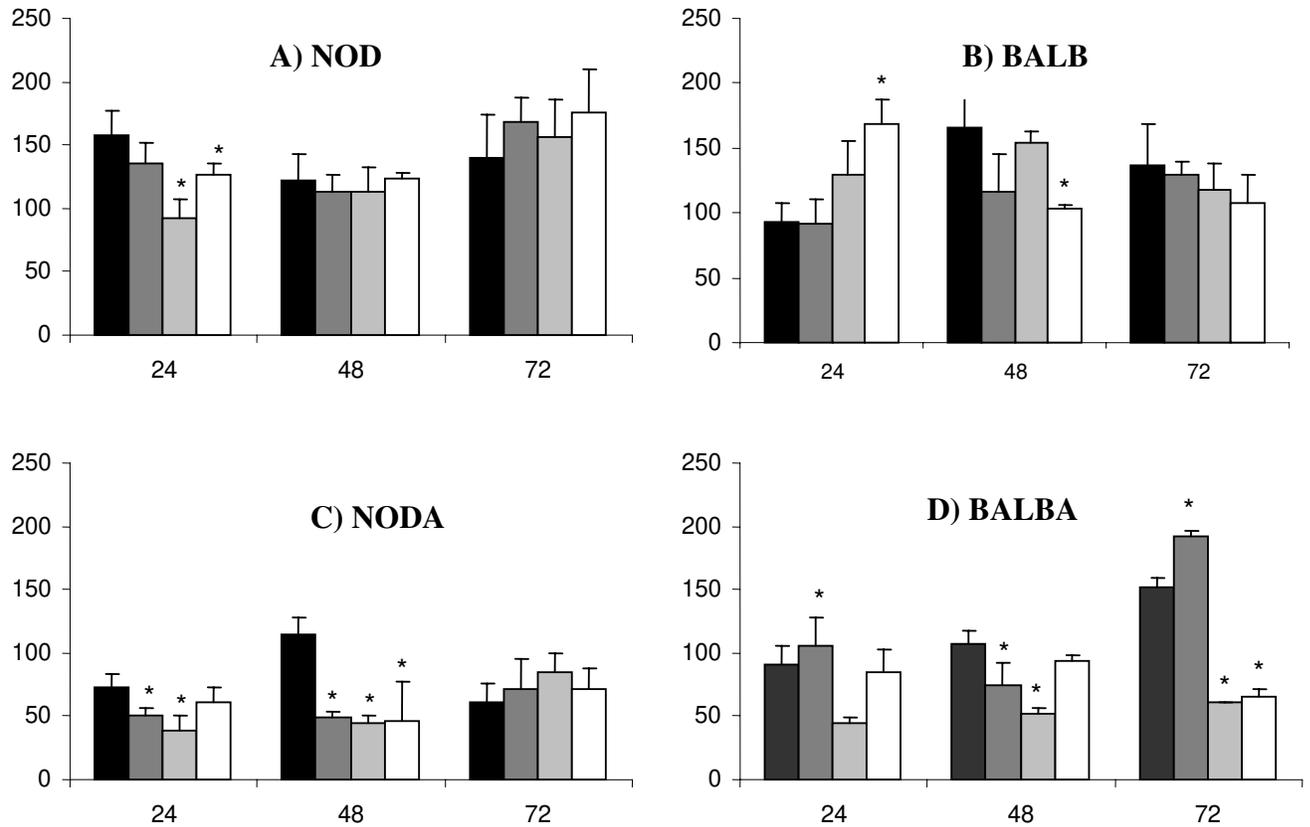


Figura 2- Expressão do mRNA da citocina TNF- α em cultura de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico (Kruskall-Wallis), considerando * $p < 0,05$.

4.2.2- IFN- γ

As culturas realizadas com células esplênicas de camundongos NOD (NOD) no período de 24 horas, mantidas sob estímulo de 2,5 nM ($2,3\pm 0,1$) e 5,0 nM de leptina ($0,9\pm 0,2$) apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ quando relacionadas às culturas sem estímulo ($7,2\pm 3,7$). No período de 48 horas observou-se menor expressão gênica das células estimuladas por 2,5 nM de leptina ($7,8\pm 1,0$) em comparação as células mantidas sem estímulo ($19,3\pm 2,9$). Contudo no tempo de 72 horas, as culturas estimuladas por 10,0 nM de leptina ($69,0\pm 20,5$) apresentaram níveis elevados de IFN- γ quando relacionadas às culturas sem estímulo ($11,3\pm 1,2$) ($p < 0,05$) (Fig 3A).

A análise das culturas realizadas utilizando células de camundongos NOD estimulados com CFA *in vivo* (NODA) mostrou expressão gênica reduzida de IFN- γ nas células mantidas sob estímulo de 5,0 nM de leptina ($2,6\pm 0,88$) no período de 24 horas, quando relacionadas às células sem estímulo ($4,9\pm 1,7$) ($p < 0,05$).

Na análise do período de 48 horas não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$).

Nas culturas mantidas por 72 horas, observou-se nas células estimuladas com leptina nas concentrações de 2,5 nM ($14,3\pm 3,44$) e 5,0 nM ($11,7\pm 0,279$) níveis superiores de IFN- γ quando comparados à cultura mantida sem estímulo ($7,8\pm 2,4$) ($p < 0,05$) (Fig 3B).

As culturas de células de camundongos Balb-C (BALB) apresentam aumento dos níveis de mRNA nas concentrações de 5,0 nM ($9,6\pm 0,5$) e 10,0 nM de leptina ($16,5\pm 4,3$), no período de 24 horas, em relação às culturas sem estímulo ($6,8\pm 0,5$). No período de 48 horas de cultura, as células mantidas sob estímulo de 5,0 nM de leptina ($5,8\pm 1,9$) apresentaram níveis reduzidos da citocina em comparação ao grupo não estimulado ($19,3\pm 3,8$) ($p < 0,05$).

Quando se compara, no período de 72 horas, as células mantidas sob estímulo de 5,0 nM ($4,9\pm 0,5$) e 10,0 nM de leptina ($7,7\pm 2,1$) às células mantidas sem estímulo ($41,2\pm 16,6$), foram encontrados níveis reduzidos de IFN- γ ($p < 0,05$) (Fig 3C).

Na análise da expressão gênica de IFN- γ por células esplênicas de camundongos Balb-C estimulados com CFA *in vivo* (BALBA), no período de 24 horas, foram encontrados níveis significativamente elevados nas células estimuladas por 5,0 nM ($4,2\pm 0,4$) e 10,0 nM de leptina ($5,1\pm 1,8$) quando relacionadas à cultura mantida sem estímulo ($0,0\pm 0,0$). No tempo de 48 horas, encontrou-se redução do nível de IFN- γ nas células mantidas com 5,0 nM de leptina ($4,4\pm 0,5$) em comparação às células sem estímulo ($0,0\pm 0,0$) ($p < 0,05$).

Contudo, no período de 72 horas, as células cultivadas sob estímulo de leptina não apresentaram expressão da citocina estudada (Fig 3D).

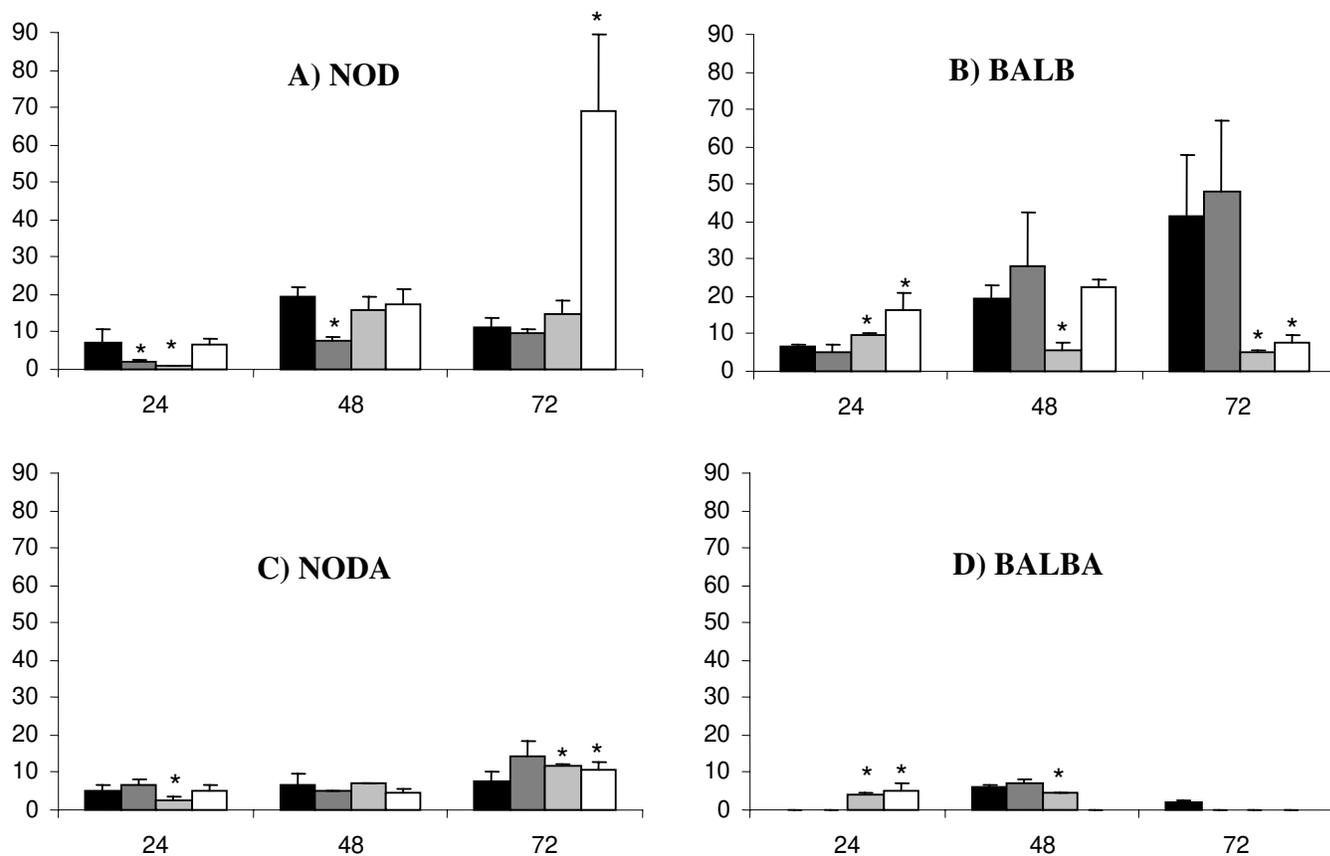


Figura 3- Expressão do mRNA da citocina IFN- γ em cultura de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico (Kruskal-Wallis), considerando * $p < 0,05$.

4.2.3- IL1 β

As culturas de células de camundongos NOD (NOD), mantidas por 24 horas sob estímulo de 2,5 nM (56,2 \pm 4,5) e 10,0 nM de leptina (123,2 \pm 25,0), apresentaram níveis significativamente mais elevados do mRNA de IL1 β em relação às células mantidas sem estímulo (31,1 \pm 11,7). Após 48 horas, as culturas estimuladas por 2,5 nM (102,9 \pm 1,7) e 5,0 nM de leptina (109,7 \pm 5,0) apresentaram níveis elevados de IL1 β . Por outro lado, as células mantidas com 10,0 nM (15,5 \pm 0,8) exibem níveis significativamente reduzidos desta citocina quando comparadas à cultura mantida sem estímulo (72,3 \pm 13,8). Observou-se, em 72 horas de cultura, níveis significativamente menores de IL1 β nas culturas mantidas com 2,5 nM de leptina (12,9 \pm 3,5). Contudo as células estimuladas por 5,0 nM (104,5 \pm 6,1) e 10,0 nM de leptina (84,5 \pm 7,1) apresentam níveis elevados da citocina quando relacionadas à cultura sem estímulo (41,7 \pm 15,9) ($p < 0,05$) (Fig 4A).

A cultura de células esplênicas de camundongos NOD pré-estimulados com CFA *in vivo* (NODA), quando submetidas ao estímulo de 5,0 nM de leptina (44,5 \pm 17,3) apresentaram expressão gênica de IL1 β diminuída no período de 24 horas em comparação à cultura mantida sem estímulo (84,08 \pm 10,3).

A análise do período de 48 horas não apresentou diferença significativamente relevante ($p < 0,05$). Por outro lado, em 72 horas, as culturas estimuladas por 5,0 nM de leptina (28,03 \pm 6,07) apresentaram mRNA de IL1 β reduzido quando comparadas ao grupo sem estímulo (54,67 \pm 12,0). Já as células mantidas com estímulo de 10,0 nM de leptina (85,71 \pm 10,11) apresentaram níveis elevados em relação ao mesmo grupo (Fig 4B).

As células de camundongos Balb-C (BALB) mantidas em cultura sob estímulo de 5,0 nM de leptina (27,0 \pm 6,9) apresentam níveis significativamente reduzidos de IL-1 β , no período de 24 horas quando relacionadas às células mantidas sem estímulo (46,4 \pm 7,0). No período de 48 horas, observou-se maior expressão gênica de IL-1 β nas culturas sob estímulo de 10,0 nM de leptina (96,2 \pm 18,7) em comparação a não estimulada (39,9 \pm 15,8). Já em 72 horas, foram detectados níveis reduzidos de IL-1 β nas culturas mantidas sob estímulo de 5,0 nM (21,4 \pm 2,2) e 10,0 nM de leptina (50,5 \pm 16,7) em relação à cultura não estimulada (87,1 \pm 9,1) ($p < 0,05$) (Fig 4C).

A análise das células de camundongos Balb-C pré-estimulados com CFA *in vivo* (BALBA), no período de 24 horas não mostrou diferença estatística relevante ($p < 0,05$). No período de 48 horas, as culturas mantidas sob estímulo de leptina nas várias concentrações (2,5 – 26,3 \pm 3,0; 5,0 – 59,4 \pm 2,3; 10,0 – 75,6 \pm 13,5) apresentaram níveis significativamente mais baixos do mRNA de IL1 β quando comparadas à cultura não estimulada (144,5 \pm 16,2). Após 72 horas, as culturas estimuladas com 2,5 nM de leptina (13,7 \pm 2,7), apresentaram maior expressão gênica de IL1 β comparando-se às sem estímulo (9,0 \pm 0,7) ($p < 0,05$) (Fig 4D).

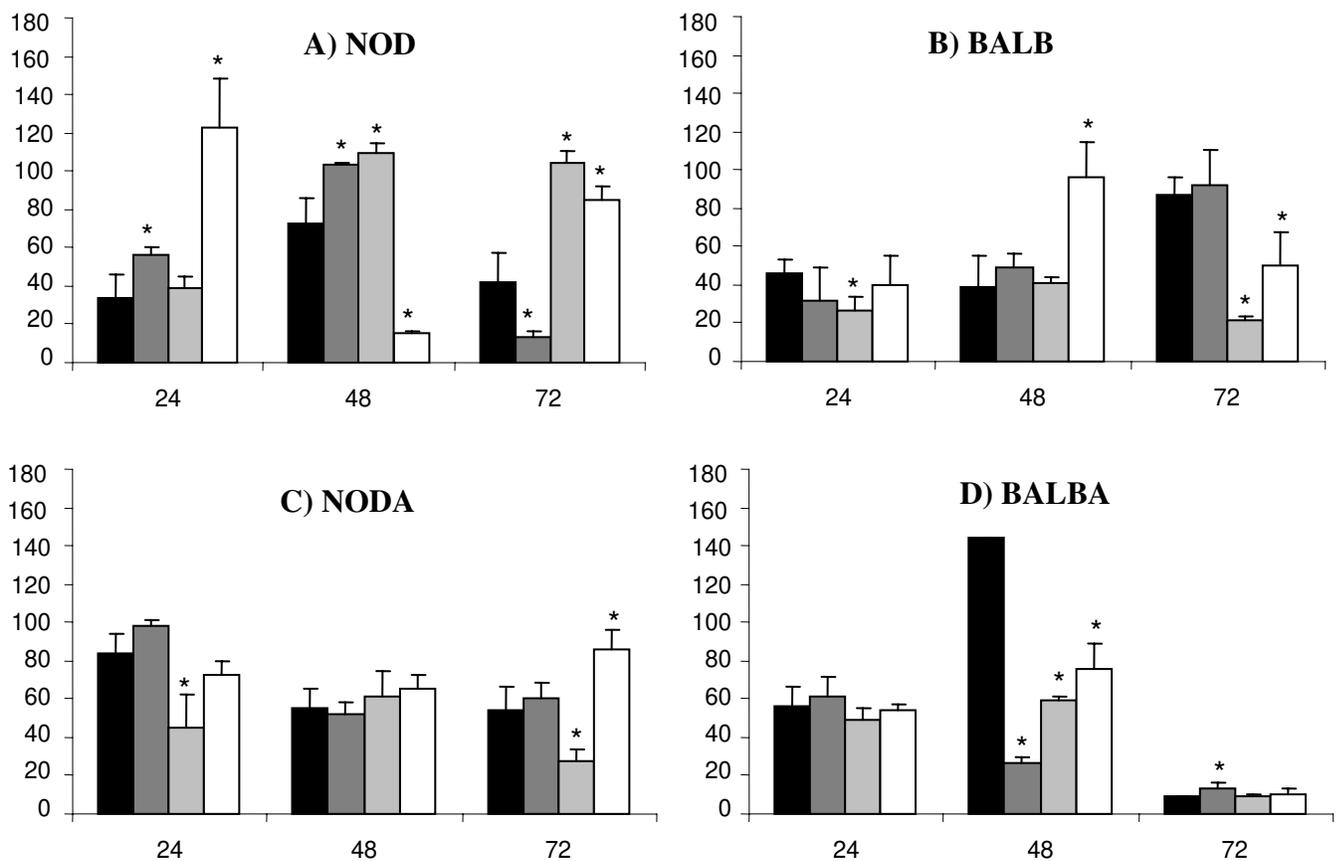


Figura 4- Expressão do mRNA da citocina IL1- β em cultura de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico (Kruskall-Wallis), considerando * $p < 0,05$.

4.2.4- IL-12

A análise da expressão gênica de IL-12 em cultura de células provenientes de camundongos NOD (NOD) mostrou níveis diminuídos de mRNA no período de 24 horas nas culturas estimuladas com leptina em todas as concentrações (2,5 - 192,1±20,5; 5,0 - 51,3±4,5; 10,0 - 136,4±13,4) em relação à cultura não estimulada (265,7±17,7). Em 48 horas de cultura, os grupos sob estímulo de 2,5 nM (200,1±58,3) e 5,0 nM de leptina (197,9±15,6) apresentaram níveis elevados de IL-12, quando relacionados à cultura não estimulada (139,1±24,7).

Já no período de 72 horas, observou-se aumento da expressão gênica de IL-12 nas células mantidas sob estímulo de 5,0 nM (195,0±26,3) e 10,0 nM de leptina (164,2±1,7) quando comparadas ao grupo não estimulado (34,0±2,7) (Fig 5A).

Em relação às células de camundongos NOD pré-estimulados com CFA (NODA), mantidas em cultura por 24 horas, foi encontrado nível reduzido de IL-12 nas células mantidas sob estímulo de 5,0 nM de leptina (61,6±15,6) em relação ao grupo não estimulado (115,1±15,7). Em 48 horas, as culturas estimuladas com as várias concentrações de leptina (2,5 - 91,4±7,3; 5,0 - 64,1±16,7; 10,0 - 30,5±11,9) apresentaram níveis significativamente mais baixos do mRNA de IL1 β quando comparadas à cultura sem estímulo (158,5±18,37).

Ao se analisar o período de 72 horas, as células mantidas com 2,5 nM (200,1±58,3) e 10,0 nM de leptina (200,1±58,3) mostraram níveis elevados de IL-12 quando comparadas ao grupo sem estímulo (200,1±58,3). Já o estímulo de 5,0 nM de leptina (200,1±58,3) apresentou nível reduzido desta citocina quando comparado ao mesmo grupo ($p < 0,05$) (Fig 5B).

As células de camundongos Balb-C (BALB) mantidas sob estímulo de 2,5 nM (102,4±12,9) e 10,0 nM de leptina (112,7±11,7) mostraram níveis significativamente elevados de IL-12, no período de 24 horas quando relacionadas às células mantidas sem estímulo (76,5±11,5). No período de 48 horas, observou-se maior expressão gênica nas culturas sob estímulo de 2,5 nM de leptina (99,6±14,7) em comparação a cultura não

estimulada ($66,7 \pm 10,7$). Já no período de 72 horas, foram detectados níveis reduzidos de IL-12, nas culturas mantidas sob estímulo de 5,0 nM ($75,3 \pm 4,0$) e 10,0 nM de leptina ($35,3 \pm 9,0$) em relação à cultura não estimulada ($149,9 \pm 15,2$) (Fig 5C).

As culturas realizadas com células de camundongos Balb-C estimulados *in vivo* com CFA (BALBA), sob estímulo de leptina nas diferentes concentrações (2,5 – $124,6 \pm 3,0$; 5,0 – $120,8 \pm 19,2$; 10,0 – $119,9 \pm 17,3$) apresentaram níveis significativamente elevados de IL-12 no período de 24 horas, quando relacionados à cultura não estimulada ($55,6 \pm 5,0$). Após 48 horas, notou-se comportamento inverso, com redução dos níveis de IL-12 em todas as concentrações de leptina (2,5 – $73,2 \pm 10,9$; 5,0 – $71,7 \pm 0,9$; 10,0 – $75,2 \pm 5,9$) quando comparadas à cultura sem estímulo ($148,9 \pm 8,5$) ($p < 0,05$).

No tempo de 72 horas encontrou-se maior expressão gênica de IL-12 nas células mantidas sob estímulo de 2,5 nM de leptina ($124,6 \pm 3,0$) e menor expressão desta citocina nas culturas estimuladas por 5,0 nM de leptina ($120,8 \pm 19,2$) quando relacionadas às culturas sem estímulo ($106,9 \pm 5,0$) ($p < 0,05$) (Fig 5D).

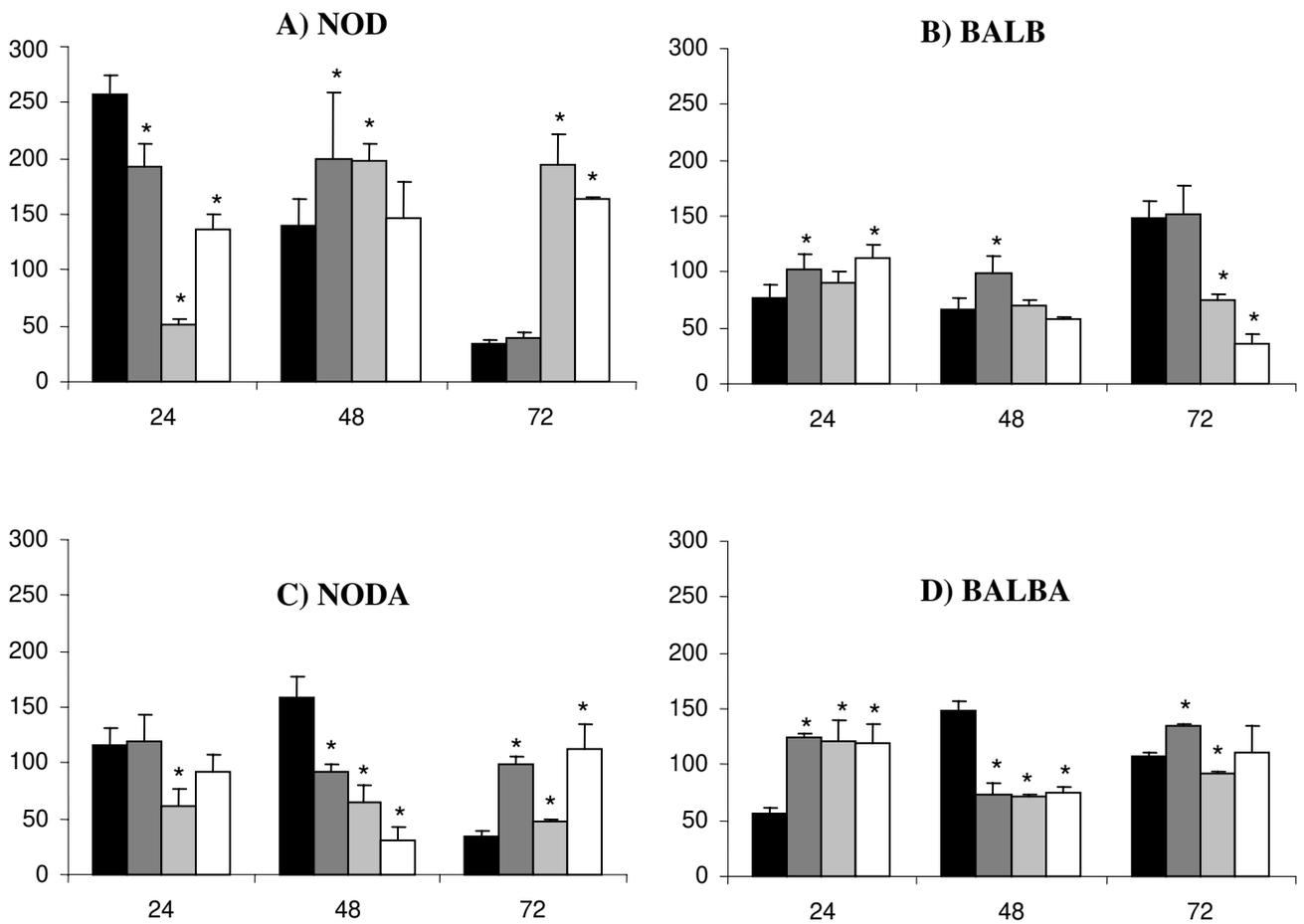


Figura 5- Expressão do mRNA da citocina IL-12 em cultura de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis). Considerando $*p < 0,05$.

4.2.5- IL-2

A análise da expressão gênica de IL-2 nas culturas de células esplênicas de camundongos NOD, o período de 24 horas não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No período de 48 horas, as células mantidas sob estímulo de 10,0 nM de leptina ($2,9 \pm 5,0$) apresentaram menor mRNA de IL-2 quando comparadas à cultura não estimulada ($6,2 \pm 1,7$). Em 72 horas, foram observados níveis superiores de IL-2 nas culturas estimuladas com 2,5 nM de leptina ($65,6 \pm 8,8$) e inferiores nas culturas estimuladas por 5,0 nM de leptina ($20,9 \pm 3,7$) quando relacionadas às culturas sem estímulo ($33,9 \pm 7,2$) ($p < 0,05$) (Fig 6A).

Nas culturas de células de camundongos NOD previamente estimulados com CFA *in vivo* (NODA), os estímulos de 2,5 nM ($8,5 \pm 1,2$) e 10,0 nM de leptina ($18,5 \pm 1,2$) apresentaram expressão gênica de IL-2 significativamente aumentada no período de 24 horas, quando comparadas às culturas sem estímulo ($4,6 \pm 0,6$) ($p < 0,05$). No período de 48 horas, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Contudo, no período de 72 horas, culturas mantidas com estímulo de 5,0 nM de leptina ($14,7 \pm 1,8$) apresentaram níveis inferiores de IL-2 quando comparadas àquelas mantidas sem estímulo ($30,6 \pm 7,1$) ($p < 0,05$) (Fig 6B).

As células de camundongos Balb-C (BALB), mantidas em culturas sob estímulo das diferentes concentrações de leptina (2,5 – $23,7 \pm 6,1$; 5,0 – $26,3 \pm 1,9$; 10,0 – $26,0 \pm 1,1$), apresentaram níveis significativamente reduzidos de IL-2 no período de 24 horas, quando relacionadas à cultura não estimulada ($40,5 \pm 7,8$). Após 48 horas, foi observado menor expressão gênica de IL-2 na cultura mantida sob estímulo de 5,0 nM de leptina ($31,6 \pm 10,8$) quando comparada ao grupo não estimulado ($58,7 \pm 16,3$). No período de 72 horas, as culturas estimuladas com 5,0 nM ($22,4 \pm 4,3$) e 10,0 nM de leptina ($26,3 \pm 8,9$) apresentaram reduzida expressão IL-2 em relação à cultura não estimulada ($106,9 \pm 8,0$) ($p < 0,05$) (Fig 6C).

A análise das culturas de células de camundongos Balb-C previamente estimulados com CFA *in vivo* (BALBA), no período de 24 horas mostrou níveis reduzidos de mRNA de IL-2 nas células sob estímulo de 5,0 nM de leptina ($5,5 \pm 0,6$) e níveis elevados

de IL-2 nas células estimuladas por 10,0 nM de leptina ($16,0 \pm 1,7$) quando comparadas às culturas sem estímulo ($10,2 \pm 2,8$). No período de 48 horas as culturas estimuladas com leptina nas diferentes concentrações (2,5 – $7,5 \pm 1,9$; 5,0 – $9,4 \pm 0,5$; 10,0 – $8,7 \pm 1,1$) apresentaram níveis reduzidos de IL-2 quando comparadas à cultura sem estímulo ($10,2 \pm 2,8$) ($p < 0,05$). Contudo em 72 horas, observou-se expressão gênica de IL-2 apenas nas culturas mantidas com 5,0 nM ($10,3 \pm 0,6$) e 10,0 nM de leptina ($7,8 \pm 0,2$) (Fig 6D).

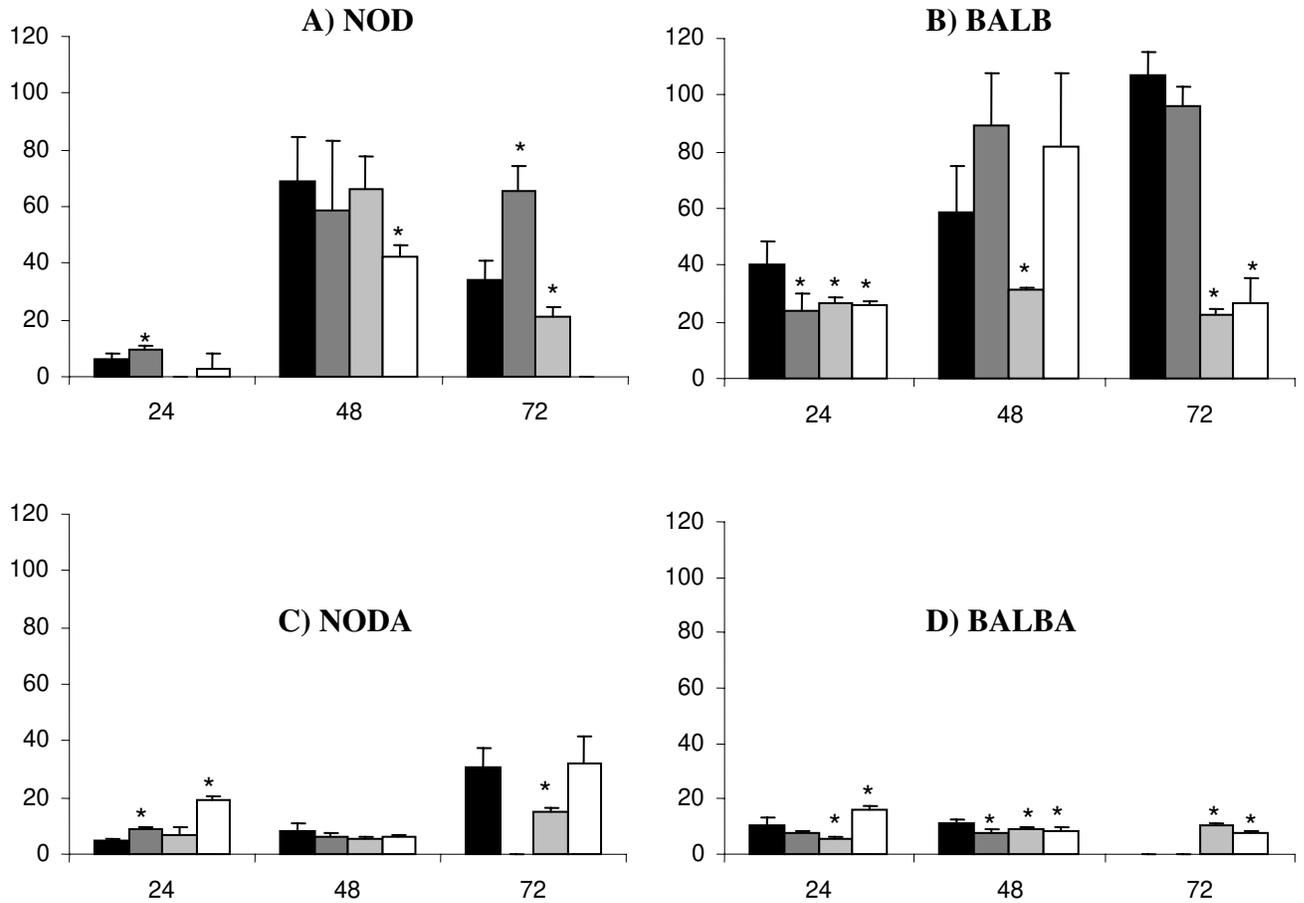


Figura 6- Expressão do mRNA da citocina IL-2 em cultura de células esplênicas de camundongos NOD e Balb-C estimulados e não estimulados com CFA *in vivo*, mantidas sob estímulo de leptina nas concentrações de 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM e sem estímulo, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Análise comparativa entre os estímulos em cada período de cultura. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico (Kruskall-Wallis), considerando * $p < 0,05$.

5- DISCUSSÃO

A leptina, hormônio relacionado com o metabolismo energético, pode ter papel imunomodulatório no desenvolvimento do diabetes autoimune em camundongos NOD fêmeas, acelerando a instalação da doença (54).

No presente trabalho, avaliou-se a influência da leptina na modulação de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-2 e IL-12) em células esplênicas de camundongos NOD, modelo experimental para estudo dos mecanismos imunopatológicos do diabetes mellitus auto-imune insulino-dependente (14).

Foi utilizado o estudo de viabilidade celular para estimar a proliferação celular nas culturas, os resultados aqui alcançados sugerem que os diferentes estímulos de leptina nas culturas realizadas com células de camundongos NOD, no período de 72 horas, mantém maior viabilidade celular, sendo esta superior à apresentada pela cultura mantida sem estímulo. Contudo notou-se grande perda celular durante o procedimento de cultura.

LHOMUS et al. (2004), empregando doses entre 1nM e 1 μ M sugerem que doses mais elevadas de leptina podem exercer efeitos citotóxicos em culturas de linfócitos estimulados inicialmente com ConA (41).

Por outro lado, LORD et al. (1998), empregando diferentes protocolos de proliferação celular, mostrou que a pré-incubação de linfócitos humanos com 10 nM de leptina, diferentemente da concentração de 1 nM, promovia maior proliferação destas células quando estimuladas com toxóide tetânico (38).

Contudo, os resultados desta pesquisa não mostram ação dose específica da leptina no estímulo da proliferação celular.

Os resultados de viabilidade celular em células provenientes de camundongos Balb-C, mostraram numero mais elevado de células viáveis que as células de camundongos NOD. Contudo, as melhores respostas foram obtidas na no período de 48 horas. No contexto da literatura disponível, estes resultados são inéditos e por isso sem elementos que permitam comparação de dados.

A linhagem NOD é modelo que se presta ao estudo de inflamação e imunopatologia de algumas doenças auto-imunes. Desta forma, os resultados obtidos inicialmente com os diferentes estímulos de leptina motivaram a organização de protocolo para verificar o comportamento das células provenientes de animais estimulados com Adjuvante Completo de Freund mantidas em cultura com leptina nas mesmas condições anteriores.

Estudos realizados com células mononucleares de sangue humano (PBMC) demonstram que a leptina tem a capacidade de estimular os monócitos *in vitro*, mas ressaltam que há dependência da pré-estimulação com estímulos não específicos como LPS (lipopolisacarídeo) e PMA (phorbol myristate acetate). Portanto esta não é capaz de estimular linfócitos sem estímulo prévio (48).

Desta forma, nestes resultados observou-se que as culturas de células de camundongos Balb-C estimulados com CFA *in vivo* (BALBA) apresentaram maior manutenção da viabilidade celular quando comparados aos demais grupos experimentais, reafirmando a necessidade do pré-estímulo para proliferação celular. Por outro lado, a cultura realizada com células de camundongos NOD estimulados com CFA (NODA), não apresentou aumento significativo na viabilidade celular, mantendo-se igual e/ou inferior aos experimentos com camundongos NOD e Balb-C não estimulados com CFA (NOD e BALB).

O adjuvante tem sido descrito como estimulador imunológico através de reações inflamatórias que aumentam a infiltração de células apresentadoras de antígenos (APC) no local de aplicação. Adicionalmente, o adjuvante modula a resposta imune, prolongando a apresentação do antígeno, aumentando a expressão de MHC de classe I e II e moléculas de adesão, além de modular negativa ou positivamente a produção de citocinas (25, 55).

Alguns autores descrevem ação antimitótica do CFA, uma vez que sua utilização pode reduzir a ação de agentes mitóticos, como a ConA *in vitro* (24).

Estudos mostram que a administração de CFA em camundongos NOD reduz a resposta de linfócitos esplênicos a mitógenos e esta ação pode ser atribuída à indução de células regulatórias. Contudo este efeito varia de acordo com o tipo de células analisada,

uma vez que foi demonstrado que estímulo de CFA em timócitos de camundongos NOD aumenta a fraca resposta destas células a mitógenos. A indução de células T que secretam o tipo apropriado de citocina pode ser responsável por este efeito (56).

Estes efeitos na ativação e proliferação são dose-dependente, onde o máximo efeito da leptina é observado quando estimulados com 10,0 nM de leptina (38). Contudo, os resultados deste trabalho não apresentaram este comportamento dose-dependente.

Portanto, somente a leptina não é capaz de estimular a proliferação e ativar linfócitos, mas é capaz de potencializar o efeito de outros estímulos (49). Este efeito foi observado nas células provenientes de camundongos Balb-C, mas não nas culturas realizadas com células de camundongos NOD.

Em contrapartida, outros estudos sugerem a ação proliferativa da leptina em linfócitos virgens (38), ainda não havendo uma unanimidade sobre a necessidade ou não de pré-estímulo.

A leptina pode inibir algumas respostas imunes *in vitro* que incluem a proliferação de alguns tipos celulares. Apesar desta ação, a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-6 e TNF α) produzidas e liberadas por monócitos periféricos e IL-2 por linfócitos T virgens está aumentada (42), dirigindo a ativação de células T para o fenótipo TH1, com conseqüente liberação de IFN γ (49, 57).

Ao se analisar as expressões gênicas das citocinas pró-inflamatórias estudadas, foram verificados comportamentos diferentes para cada tipo de citocina, variando de acordo com a linhagem de camundongo, a concentração do estímulo de leptina, o tempo de cultura e estimulação prévia com CFA.

Os resultados deste trabalho mostram que a leptina tem ação limitada sobre a produção de TNF α em cultura de células de camundongos NOD e Balb não previamente estimulados com CFA. Por outro lado. As culturas estimuladas previamente com CFA apresentaram menor expressão desta citocina em algumas concentrações, sem relação específica com as doses.

Este comportamento foi observado em todas as citocinas estudadas, uma vez que a expressão gênica de IFN γ , IL-1 β , IL-12 e IL-2 estavam reduzidas em todas as culturas estimuladas com CFA, sendo mais exacerbado na expressão de IL-2 e IFN γ .

Não há na literatura disponível, elementos para se comparar diretamente os protocolos aqui realizados.

Contudo, embora utilizando células de sangue periférico humano, LORD et al 1998, verificaram que a concentração de 10,0 nM pode ser mais eficiente no estímulo de produção de IFN γ , em células T memória, além de sugerirem ação dose e tempo-dependente da leptina na liberação de citocinas (38).

Contudo, neste estudo, observou-se na cultura realizada com células de camundongos NOD sem prévio estímulo de CFA, nível elevado de IFN γ na concentração de 10,0 nM leptina, no período de 72 horas sem relação dose-dependência.

Ainda, na análise das demais das demais citocinas, não há predomínio de uma dose mais eficaz ou período de cultura ideal para a expressão das citocinas.

Desta forma, o achado mais evidente sugere que as culturas realizadas com células de camundongos NOD e Balb-C previamente estimuladas com CFA, quando comparados às células de NOD e Balb-C sem estímulo prévio e NOD com estímulo de CFA, apresentam, menor produção gênica das citocinas estudadas nas células previamente estimuladas.

Estes resultados são respaldados em estudos prévios que demonstram a proteção ao desenvolvimento do diabetes auto-imune insulino dependente, mediado por células T, empregando CFA, no tratamento (dose única) de camundongos NOD com quatro semanas de vida, o qual atua desviando produção de citocinas do perfil TH1 (IFN γ) para TH2 (IL-4 e IL-10). A regulação da resposta dos tímócitos que induz a produção de citocina pode ser uma consequência do tratamento com CFA (56, 58).

6- CONCLUSÕES

- 1- A ação da leptina sobre a viabilidade/proliferação celular sugere necessidade de pré-estímulo no caso do camundongo Balb-C.
- 2- Não houve ação dose específica na manutenção da viabilidade celular nas culturas de células esplênicas de camundongos NOD e NODA, BALB e BALBA.
- 3- A pré-estimulação de camundongos NOD com CFA não mostrou ação efetiva no aumento da viabilidade/proliferação celular.
- 4- A pré-estimulação de camundongos Balb-C com CFA mostrou maior efetividade no aumento da viabilidade/proliferação celular.
- 5- No conjunto dos resultados cada citocina apresentou um padrão específico, depende da dose de leptina, tempo de cultura, da linhagem animal e do estímulo de CFA. Não sendo possível determinar as melhores condições para a expressão gênica das citocinas.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que a leptina modula a expressão gênica e a viabilidade/proliferação de células esplênicas, representantes da resposta periférica. A análise da expressão destas citocinas não mostrou diferenças altamente significativas, entre as linhagens não relacionadas Balb-C e NOD. Provavelmente, devido à utilização de células provenientes de “fase precoce não inflamatória do NOD” (8 semanas). Tanto para NOD quanto para Balb-C a pré-estimulação com adjuvante completo de Freund, como fator de ativação da resposta imune, diminuíram a expressão da maioria das citocinas estudadas. Assim, estes resultados abrem perspectivas a novos estudos sobre os efeitos da leptina na modulação da expressão gênica e liberação de citocinas pró-inflamatórias no contexto do estado imunológico do organismo geneticamente predisposto ao diabetes auto-imune.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Rossini AAG, D.L.; Friedman, H.P.; Mordes, J.P. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993;1:46-75.
- 2- WHO. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. World Health Organization 1999:1 - 49.
- 3- Alberti KG, Zimmet PZ. New diagnostic criteria and classification of diabetes--again? *Diabet Med* 1998;15(7):535-6.
- 4- Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314(21):1360-8.
- 5- Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 1992;51:285-322.
- 6- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2(7892):1279-83.
- 7- Schwartz SL, Hanson C, Lucas C, Rosenblatt S, Rosenstock J, Whittier F, et al. Double-blind, placebo-controlled study of ramipril in diabetics with mild to moderate hypertension. *Clin Ther* 1993;15(1):79-87.
- 8- Pipeleers D, Hoorens A, Marichal-Pipeleers M, Van de Casteele M, Bouwens L, Ling Z. Role of pancreatic beta-cells in the process of beta-cell death. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S52-7.
- 9- Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994;15(4):516-42.
- 10- Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. *Res Immunol* 1997;148(5):285-6.
- 11- Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR, Jr., McDaniel ML. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(5):1731-5.

- 12- Eizirik DL, Sandler S, Palmer JP. Repair of pancreatic beta-cells. A relevant phenomenon in early IDDM? *Diabetes* 1993;42(10):1383-91.
- 13- Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 1994;19(3):169-78.
- 14- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29(1):1-13.
- 15- Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 1993;14(5):193-6.
- 16- Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem "NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol* 1994; 38:105-108.
- 17- Falcone M, Sarvetnick N. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 1999;11(6):670-6.
- 18- Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85(3):291-7.
- 19- Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1992;13(12):490-4.
- 20- Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol* 1997;148(5):327-32.
- 21- Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 1988;240(4852):659-62.

- 22- Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol* 1989;19(10):1947-51.
- 23- Victoratos P, Yiangou M, Avramidis N, Hadjipetrou L. Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo. *Clin Exp Immunol* 1997;109(3):569-78.
- 24- Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70(6):849-60.
- 25- Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 2002;11(2):126-34.
- 26- Kahn DA, Archer DC, Gold DP, Kelly CJ. Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 2001;193(11):1261-8.
- 27- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2003;4(3):291-9.
- 28- Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998;14(2):129-51.
- 29- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1998;55(8):1139-49.
- 30- Hartemann-Heurtier A, Richard MF, Boitard C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 1999;116(2):225-30.
- 31- La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med* 2004;82(1):4-11.
- 32- Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC. IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol* 1988;141(7):2325-9.

- 33- Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol* 1999;163(11):5770-80.
- 34- Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999;162(5):2511-20.
- 35- Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes* 1988;37(1):133-6.
- 36- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(5):371-9.
- 37- Fruhbeck G, Salvador J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia* 2000;43(1):3-12.
- 38- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998;394(6696):897-901.
- 39- Juge-Aubry CE, Meier CA. Immunomodulatory actions of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 2002;194(1-2):1-7.
- 40- Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* 2005;174(6):3137-42.
- 41- Lohmus M, Olin M, Sundstrom LF, Troedsson MH, Molitor TW, El Halawani M. Leptin increases T-cell immune response in birds. *Gen Comp Endocrinol* 2004;139(3):245-50.
- 42- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2002;72(2):330-8.

- 43- Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal* 2002;14(8):655-63.
- 44- Lord G. Role of leptin in immunology. *Nutr Rev* 2002;60(10 Pt 2):S35-8; discussion S68-84, 85-7.
- 45- Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005;174(11):6820-8.
- 46- Starr R, Hilton DJ. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30(10):1081-5.
- 47- Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications* 2003;17(2):108-13.
- 48- Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999;194(1):6-11.
- 49- Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 2000;199(1):15-24.
- 50- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
- 51- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
- 52- Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(11):1347-55.
- 53- Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL. Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(3):289-95.

- 54- Matarese G, Sanna V, Lechler RI, Sarvetnick N, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. *Diabetes* 2002;51(5):1356-61.
- 55- Avramidis N, Victoratos P, Yiangou M, Hadjipetrou-Kourounakis L. Adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to *Mycoplasma agalactiae* in mice. *Vet Microbiol* 2002;88(4):325-38.
- 56- Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B. Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1993;150(5):2072-80.
- 57- Goldberg AC, Eliaschewitz FG, Montor WR, Baracho GV, Errante PR, Callero MA, et al. Exogenous leptin restores in vitro T cell proliferation and cytokine synthesis in patients with common variable immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol* 2005;114(2):147-53.
- 58- Serreze DV, Chapman HD, Post CM, Johnson EA, Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J Immunol* 2001;166(2):1352-9.