ELI MANSUR

A PARTICIPAÇÃO DA LEPTINA NO CONTROLE DA APOPTOSE EM TIMO DE RATOS WISTAR

CAMPINAS

2007

i

ELI MANSUR

A PARTICIPAÇÃO DA LEPTINA NO CONTROLE DA APOPTOSE EM TIMO DE RATOS WISTAR

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2007

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

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

M318p	Mansur, Eli A participação da leptina no controle da apoptose em timo de ratos wistar / Eli Mansur. Campinas, SP : [s.n.], 2007.
	Orientador : Lício Augusto Velloso Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Leptina. 2. Timo. 3. Apoptose. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : The participation of leptin in the control of apoptosis the thymus of wistar rats

Keywords: • Leptin

- Thymus
- Apoptosis

Área de concentração : Medicina Experimental Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Lício Augusto Velloso Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos Profa. Dra. Paulina Sannomiya Prof Dr Ricardo de Lima Zollner Prof Dr Rui Curi

Data da defesa: 23-02-2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador (a): Prof (a). Dr(a). Lício Augusto Velloso

MEMBROS:

- 1- Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Dos Santos
- 2- Profa. Dra. Paulina Sannomiya
- 3- Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
- 4- Prof. Dr. Rui Curi

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração Medicina Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23.02.2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Raymond e Marie Por uma vida toda de dedicação e sacrifícios. A minha esposa Denise Pela paciência e cumplicidade. Eu os amo muito.

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

"...Homem algum poderá revelar-vos senão o que já está meio adormecido na aurora do vosso entendimento.

O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.

Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente.

O astrônomo poderá falar-vos de sua compreensão do espaço, mas não vos poderá dar a sua compreensão.

O músico poderá cantar para vós o ritmo que existe em todo o universo, mas não vos poderá dar o ouvido que capta a melodia, nem a voz que a repete.

E o versado na ciência dos números poderá falar-vos do mundo dos pesos e das medidas, mas não vos poderá levar até lá,

Porque a visão de um homem não empresta suas asas a outro homem ... "

Gibran Khalil Gibran.

Minha eterna gratidão Aquele que tanto admiro

Eli

v

Aos Amigos

"...Vosso amigo é a satisfação de vossas necessidades.

Ele é o campo que semeais com carinho e ceifais com agradecimento...

...Quando vosso amigo expressa seu pensamento, não temais o 'não' de vossa própria opinião, nem prendais o 'sim'.

E quando ele se cala, que vosso coração continue a ouvir o seu coração.

Porque na amizade, todos os desejos, ideais, esperanças, nascem e são partilhados sem palavras, numa alegria silenciosa...

...E que não haja outra finalidade na amizade a não ser o amadurecimento do espírito.

E que o melhor de vós próprios seja para vosso amigo.

Procurai-o sempre com horas para viver:

O papel do amigo é de encher vossa necessidade, não vosso vazio.

E na doçura da amizade, que haja riscos e o partilhar dos prazeres..."

Gibran Khalil Gibran

PÁG.

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1- INTRODUÇÃO	16
2- OBJETIVOS	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS	25
4- RESULTADOS	37
5- DISCUSSÃO	51
6- CONCLUSÕES	57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8- ANEXOS	69

αPy	antifosfotirosina
μCi	microCi
AG ₄₉₀	composto químico inibidor de JAK
Akt	proteína serina quinase
ANOVA	análise de variâncias
APC	célula apresentadora de antígeno
AS	antisense
ASO	oligonuclotídeo antisense
BLAST	ferramenta de pesquisa de alinhamento
BSA	albumina sérica bovina
CD	cluster of differentiation
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	fluoresceína isotiocianato isômero 1
G-CSF	fator estimulador de colônia-granulócitos
¹²⁵ I	isótopo de iodo 125
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
IP	iodeto de propídeo
IRS1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS1 _{ASO}	oligonucleotídeo antisense IRS1

IRS1 _{SO}	oligonucleotídeo sense IRS1
JAK	Janus kinase
kDa	quilo Dalton
LY294002	composto químico inibidor da PI3-quinase
MAP Quinase	proteína quinase ativadora da mitogênese
МНС	complexo principal de histocompatibilidade
МО	medula óssea
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
ob	gene da leptina
ObR	receptor da leptina
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
РІЗ-К	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
РҮ	fosfotirosina
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RPE	R. ficoeritrina
RPE-Cy5	R. ficoeritrina-Cy5
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil
	sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
SH2-B	proteína de interação com JAK-2
STAT	transdutor do sinal e ativador da transcrição
TRIS	metano hidroximetilamina

PÁG.

Tabela 1-	Time-course dos níveis sangüíneos de leptina após a administração	
	de leptina exógena	38

PÁG.

Figura 1-	A leptina inibe a apoptose basal no timo	39
Figura 2-	A leptina ativa a transdução de sinal no timo	42
Figura 3-	A expressão do ObR se reduz durante a maturação dos timócitos	43
Figura 4-	Os efeitos dos inibidores de transdução do sinal	46
Figura 5-	O efeito da inibição da transdução do sinal sobre a apoptose inibida pela leptina em timo de ratos vivos	49
Figura 6-	Os efeitos da inibição da transdução do sinal sobre a apoptose inibida pela leptina em timócitos isolados	50

RESUMO

A leptina, hormônio com semelhança funcional e estrutural às citocinas, é conhecida por exercer, além das ações clássicas de controle da ingestão alimentar e termogênese, importantes funções na modulação das respostas do sistema imune. Alguns destes efeitos são dependentes da propriedade da leptina em modular a apoptose das células tímicas. Neste trabalho, utilizamos ratos Wistar para investigar os mecanismos moleculares envolvidos no controle, dependente da leptina, da apoptose no timo. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo e ELISA para determinação de nucleossomos, enquanto que a transdução do sinal foi avaliada por imunoprecipitação, imunoblot e microscopia confocal. O ObR estava expresso na maioria das células tímicas e a sua quantidade relativa reduziu-se progressivamente durante a maturação dos timócitos. A expressão do ObR estava co-localizada com JAK-2 e STAT-3, e a injeção aguda, *in vivo*, de leptina promoveu a fosforilação em tirosina de JAK-2 e o engajamento de STAT-3. O tratamento com leptina, também, levou à fosforilação em tirosina de IRS1 e fosforilação em serina de Akt. O tratamento crônico com leptina reduziu a apoptose tímica, e este efeito não foi inibido pelo AG490, um inibidor de JAK, mas foi significativamente inibido por LY294002, um inibidor de PI3-Quinase, e por um oligonucleotídeo antisense para IRS1. Portanto, a leptina inibe a apoptose em células tímicas via um mecanismo independente da ativação de JAK-2 mas dependente do engajamento da via IRS1/PI3-Quinase.

ABSTRACT

The cytokine-like hormone leptin is known to exert important functions on the modulation of immune responses. Some of these effects are dependent on the property of leptin to modulate the apoptosis of thymic cells. In the present study, we employed Wistar rats to investigate the molecular mechanisms involved in leptin-dependent control of apoptosis in thymus. Apoptosis was evaluated by flow cytometry and ELISA for nucleosome determination, while signal transduction was evaluated by immunoprecipitation, immunoblot and confocal microscopy. The ObR was expressed in most thymic cells and its relative amount reduced progressively during thymocyte maturation. ObR expression was co-localized with JAK-2 and STAT-3, and an acute, in vivo, injection of leptin promoted the tyrosine phosphorylation of JAK-2 and the engagement of STAT-3. The treatment with leptin also led to the tyrosine phosphorylation of IRS1 and serine phosphorylation of Akt. Chronic treatment with leptin reduced thymic apoptosis, an effect that was not inhibited by the JAK inhibitor AG490 but was significantly inhibited by the PI3-kinase inhibitor LY294002 and by an antisense oligonucleotide to IRS1. Thus, leptin inhibits the apoptosis of thymic cells through a mechanism that is independent of the activation of JAK-2 but depends on the engagement of the IRS1/PI3-kinase pathway.

1- INTRODUÇÃO

A leptina é uma proteína não glicosilada de 16-KDa codificada pelo gene *ob* localizado nos cromossomos 7 em humanos, 6 em camundongos e 5 em ratos (Zhang et al., 1994; Sone et al., 2001; La Cava et al., 2004). A principal fonte da leptina é o tecido adiposo branco, mas outros tecidos e células isoladas são capazes de produzi-la em pequenas quantidades (Zhang et al., 1994; Masuzaki et al., 1997; Bado et al., 1998). A leptina é um dos principais hormônios implicados na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético (Friedman, 2002). Após atravessar a barreira hematoencefálica, a leptina age em neurônios localizados em núcleos hipotalâmicos responsáveis pela regulação do apetite e do gasto de energia, sinalizando a presença de uma reserva excessiva de energia, o que leva a uma diminuição da ingestão alimentar e a um aumento do dispêndio energético (Halaas et al., 1995; Flier, 2004). Por outro lado, durante a restrição alimentar ocorre diminuição na produção desta e assim, ativa-se a sinalização que favorece a busca por um maior aporte nutricional (Boden et al., 1996).

Além do controle do peso, os animais homeotérmicos mantêm a temperatura corporal relativamente estável, a despeito da variação da temperatura externa, e este fenômeno é dependente de núcleos hipotalâmicos de regulação da temperatura corpórea, fenômeno esse dependente da participação da leptina. O alimento ingerido é usado como substrato para a produção de energia necessária tanto para o metabolismo como para a produção de calor (Leibel et al., 1995).

Além de hormônio, a leptina tem uma função como citocina, com papel de integrar informações a respeito do estado nutricional do organismo com a atividade do sistema imune (Matarese et al., 2004; Fox et al., 2005; Matarese et al., 2005). As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune inato e adaptativo, e também por muitas outras células do organismo em certas situações. Dentre suas múltiplas funções destaca-se sua propriedade de interligar as células do sistema imune para favorecer uma resposta imune integrada (Abbas et al., 2000). A leptina pertence à família das citocinas helicoidais de cadeia longa apresentando homologia estrutural com vários membros da família, tais como interleucina-6 (IL-6), IL-2, IL-5, e granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Torpy et al., 1998; Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997).

O receptor da leptina (ObR) é membro da superfamília da classe I dos receptores das citocinas, que inclui, entre outros, os receptores para IL-2, IL-6, IL-12 (Hanui et al., 1998 ; Abbas et al., 2000; Wang et al., 1996). Este receptor é uma glicoproteína de membrana produzida pelo gene *db*, localizado nos cromossomos 4 em camundongos, 5 em ratos, e 1 em humanos (Chung et al., 1996). São conhecidas, até o momento, seis isoformas do ObR produto de um *splicing* alternativo do mRNA do único gene, apresentando um domínio extracelular comum para a ligação à leptina. Estas isoformas são denominadas ObRa – ObRf, sendo o ObRa a forma curta do receptor, em relação ao domínio intracelular; o ObRb, a forma longa; e, o ObRe a forma secretada, não ligada à membrana (Tartaglia, 1997). O ObR está presente em vários tipos celulares, tanto no sistema nervoso central como na periferia, entre eles em linfócitos do sangue periférico (Siegmund et al., 2004).

Os receptores pertencentes à superfamília da classe I dos receptores de citocinas não possuem capacidade intrínseca de deflagrar vias de sinalização após o engajamento do ligante. Para que a completa ativação da via seja possível, tais receptores associam-se a quinases intracelulares da família Janus (JAK), sendo que o ObR associa-se à JAK-2 (Kloek et al., 2002). Somente a forma longa do receptor da leptina (ObRb) é capaz de se associar ao JAK-2, sendo, até o momento, a única forma conhecida do receptor capaz de promover sinalização intracelular (Kloek et al., 2002). Após a ligação da leptina ao ObRb, ocorre uma mudança conformacional deste, ativando a JAK que, por sua vez, sofre autofosforilação, fosforila o próprio receptor em resíduos tirosina, e com isso permite o recrutamento de um membro da família de fatores de transcrição, signal transducer and activator of transcription (STAT), sendo que, no caso do ObR, há o recrutamento preferencial do STAT-3. O STAT, sofre então fosforilação e homodimerização se dissociando do receptor, migra para o núcleo celular e se liga a seqüências específicas do DNA nas regiões promotoras dos genes de resposta à leptina, ativando, por fim, a transcrição gênica (Banks et al., 2000; Zabeau et al., 2003). A leptina, além de sinalizar via JAK-2/STAT-3 com acesso ao núcleo, é capaz de ativar outras vias de sinalização, tais como a via da MAP Quinase (Bjorbaek et al., 1998; Dunn et al., 2005; Banks et al., 2000), a via fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K)/Akt (Vecchione et al., 2002), SH-2 B (Duan et al., 2004) e IRS1 (Carvalheira et al., 2003). Através dessas vias, é possível que

haja uma integração entre a sinalização da leptina e um complexo sistema intracelular de *cross-talk* que regula funções tais como crescimento celular, mitogênese, metabolismo e apoptose (Friedman, 2002; La Cava et al., 2004; Matarese et al., 2004).

Os linfócitos T, os principais controladores da imunidade adaptativa, originamse a partir de células tronco derivadas da medula óssea (MO) que colonizam o timo. MO e timo são órgãos linfóides primários, sendo que na MO há a produção e maturação dos linfócitos B e no timo há a maturação dos linfócitos T. Os linfócitos T em maturação são também chamados de timócitos. O timo se origina a partir do terceiro e quarto arcos faríngeos e se localiza no mediastino, sendo histologicamente dividido em córtex e medula. O córtex é mais rico em células, predominantemente timócitos, menos maduras, e a medula é mais esparsamente povoada por estas células, agora em um estado mais avançado de amadurecimento (Abbas et al., 2000).

Durante o seu desenvolvimento, os timócitos, no início duplo-negativos para CD4 e CD8, se tornam duplo-positivos e ao final da maturação células T CD4⁺ ou CD8⁺. Na cortical do timo, estes precursores de linfócitos T maduros são selecionados de tal forma a serem capazes de responder a estímulos de ativação provenientes de antígenos estranhos ligados a uma molécula de histocompatibilidade (MHC) da classe II apresentado por uma célula apresentadora de antígeno (APC). Tal processo é denominado de seleção positiva. As células selecionadas positivamente devem ser incapazes de montar respostas imunológicas frente aos auto-antígenos. Para que tal fenômeno não ocorra, os timócitos passam por um processo denominado seleção negativa, que ocorre na medula do timo. Uma parcela majoritária dos timócitos não atende às duas exigências apresentadas acima, e morre por apoptose (Abbas et al., 2000).

Apoptose é um processo de morte celular programada caracterizado por clivagem de DNA, condensação e fragmentação nuclear, vesiculação da membrana plasmática, mudança na distribuição lipídica da membrana, e destacamento da célula da matriz extracelular. Isto resulta na fagocitose da célula. O que diferencia a apoptose da necrose é que nesta última ocorre a ruptura da membrana celular liberando o seu conteúdo resultado num processo inflamatório, enquanto que na apoptose não há evidência de inflamação (Bredesen et al., 2006). A indução de apoptose em timócitos pode ocorrer de

duas formas. A primeira forma é por negligência ocorrendo por perda ou ausência de estímulos de sobrevivência. No timo, essa forma de apoptose ocorre quando os timócitos não são salvos da morte durante a seleção positiva. A segunda forma de apoptose de timócitos é induzida ativamente por meio da sinalização via receptores de membrana indutores de morte que são expressos na membrana após ativação dos timócitos. Essa forma de apoptose ocorre quando os timócitos auto-reativos são induzidos a morrerem após serem confrontados com auto-antígenos, durante a seleção negativa (Abbas et al., 2000).

A leptina e a resposta imune

A obesidade é uma doença que atinge hoje proporções epidêmicas em várias regiões do mundo (Velloso et al., 2006; Flier, 2004). Várias são as conseqüências metabólicas e cardio-vasculares da obesidade, entretanto, além dessas conseqüências bastante conhecidas, pacientes e modelos animais de obesidade apresentam importantes defeitos da resposta imune (Morton et al., 2006). Tais indivíduos e animais apresentam sinais de doença sistêmica inflamatória de baixa intensidade (Morton et al., 2006), o que pode ser evidenciado pela presença de níveis circulantes aumentados de proteínas da fase aguda e de citocinas pro-inflamatórias. Tais indivíduos e animais podem, ainda, apresentar maior incidência de infecções e de doenças neoplásicas sugerindo a ocorrência de defeitos na vigilância imunológica (Pacifico et al., 2006; O'Rourke et al., 2006). Animais com mutações genéticas que acarretam a deficiência de leptina, como, por exemplo, camundongos ob/ob, ou aqueles portadores de mutação gênica levando a uma ausência funcional do receptor longo (ObRb) da leptina, como os camundongos db/db apresentam importantes defeitos da resposta imune (Tilg et al., 2006; O'Rourke et al., 2006). Da mesma forma, em raras famílias descritas com defeito gênico de síntese de leptina, observam-se várias disfunções da resposta imunológica (Farooqi et al., 2002).

Em situações onde há resistência à ação da leptina, tais como em diabetes mellitus, são observadas disfunções, das mais variadas, da resposta imune tanto em animais experimentais quanto em humanos (MacCuish et al., 1974; Pereira et al., 1987; Sannomiya et al., 1990). Disfunções da resposta imunológica, também, foram observadas em situações

que levam à diminuição dos níveis circulantes da leptina, tais como jejum e desnutrição crônica, em animais e em humanos (Chan et al., 1996; Chandra, 1980; Palácio et al., 2002). Adicionalmente, nosso grupo e outros, de forma independente, mostraram que em algumas disfunções imunes primárias, em humanos, existem baixos níveis de leptina circulante (Ferraroni et al., 2005; Goldberg et al., 2005).

A leptina é uma citocina com múltiplas ações pró-inflamatórias. Junto com IL-1 e IL-6, ela participa na resposta da fase aguda, produzida em altos níveis durante inflamação, sepse e febre (La Cava et al., 2004; Zarkesh-Esfahani et al., 2001). Esta citocina exerce ação potencializadora em situações experimentais de doenças auto-imunes, tais como diabetes auto-imune e encefalite auto-imune, entre outras (Matarese et al., 2001; Matarese et al., 2002; Martin-Romero , 2000; Lord et al., 1998; Lord et al., 2002; Sanna et al., 2003; Santos-Alvarez et al., 1999; Matarese et al., 2005). A ausência da leptina provoca defeito na resposta imune celular e humoral e provoca o surgimento de quadro mais leve de artrite experimental e encefalite auto-imune (Busso et al., 2002; De Rosa et al., 2006). Mais ainda, a leptina é capaz de inibir a apoptose induzida em linfócitos T de sangue periférico em animais experimentais (Fujita et al., 2002; Papathanassoglou et al., 2006).

O receptor da leptina está presente em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B e macrófagos/monócitos em repouso, de sangue periférico, em ratos. Após ativação há aumento da quantidade do ObR nestas células. A leptina ativa STAT-3 em células T e promove a sobrevida dos linfócitos *in vitro* por inibir a apoptose induzida por FAS (Papathanassoglou et al., 2006).

A administração de leptina exógena é capaz de reverter a disfunção imunológica presente em situações de falta deste hormônio. Tanto em humanos como em animais experimentais com defeito congênito da produção de leptina, a reposição do hormônio foi capaz de melhorar a resposta imunológica e este efeito ocorreu quando da administração da leptina por via periférica e não central (Farooqi et al., 2002; Zhang et al., 2002). O timo é um órgão muito sensível à privação nutricional, ocorrendo a diminuição de seu tamanho, fato há muito conhecido e por isso já foi usado o termo "timectomia nutricional" (Prentice, 1999; Savino, 2002; Pallaro et al., 2001). Neste estado hipoleptinêmico há uma perda da arquitetura tímica normal, indicando uma redução no número dos timócitos corticais por apoptose. (Howard et al., 1999).

Apesar dos efeitos funcionais da leptina sobre a apoptose e a celularidade tímica terem sido bem caracterizados, os mecanismos moleculares envolvidos neste controle são pouco compreendidos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as vias intracelulares de transdução de sinais que participam na inibição de apoptose pela leptina no timo em ratos Wistar.

2- OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar as vias intracelulares de transdução de sinais que participam na inibição induzida pela leptina da apoptose no timo de ratos Wistar.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

A leptina, o inibidor de JAK AG₄₉₀ (tirfostina B42) e o inibidor de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K) LY₂₉₄₀₀₂ foram adquiridos de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditiotreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, albumina, IgG anti-fração Fc de IgG de camundongo (rabbit anti-mouse IgG) e albumina sérica bovina (BSA, fração V) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (¹²⁵I) procedeu da Amersham (Amersham, UK), a Proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia) e a Proteína A Agarose (AG-Plus) (sc-#2003) da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico amobarbital de sódico foi adquirido da Eli Lilly& Co. (Indianápolis, IN, USA). Os anticorpos anti-JAK-2 (sc#278), anti-IRS1 (sc#559), anti-STAT-3 (sc#483), anti-ObR (sc#8325), anti-fosfo(Ser⁴⁷³) Akt (sc#9271), e anti-fosfotirosina (sc#508) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Os anticorpos conjugados anti-CD3-(FITC), anti-CD4-(PRE) e anti-CD8-RPE-Cy5 obtidos de Serotec, Ltd. (Oxford, UK). O RPMI 1640 e os reagentes para cultura celular e o reagente TRIzol foram adquiridos de Invitrogen Corp. (Carslbad, CA, USA). O kit de ELISA de determinação de nucleossomos (Cat#QIA25) foi fornecido pela Oncogene Research Product (Boston, MA, USA). O kit de detecção de apoptose por anexina-V para citometria de fluxo (Apoptest#K2350) foi obtido da Dako Corp. (Carpinteria, CA, USA). O kit de ELISA para leptina foi obtido da Linco Research Inc. (St. Charles, MO, USA). O MMLV para transcirptase reversa foi adquirido de *Clontech* (Mountain View, CA, USA). Os oligonucleotídeos sense (5' - ACC CAC TCC TAT CCC G - 3') (IRS1_{S0}) e antisense (5' - CGG GAT AGG AGT GGG T - 3') (IRS1_{ASO}) específicos para IRS1 foram produzidos por Invitrogen Corp. (Carslbad, CA, USA) (Araujo et al., 2004; Araujo et al., 2002; Araujo et al., 2005). As seqüências foram selecionadas entre 3 pares de oligonucleotídeos não relacionados com base na sua habilidade de inibir a expressão da IRS1, como verificado pelo immunoblotting do extrato total de tecido tímico utilizando o anticorpo anti-IRS1 específicos. Estas següências dos antisenses foram submetidas à

análise do BLAST (em www.ncbi.nlm.nih.gov) e corresponde somente à seqüência da IRS1 de *Rattus norvegicus* (NCBI/NM 012969).

Soluções utilizadas

- Tampão de extração A (extrato total): foi utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.
- Tampão de Laemmli (5X): foi usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.
- Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.
- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

- Solução tampão para SDS-PAGE Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução Basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.
- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- Solução tampão de extração B (imunoprecipitação): foi utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirosfofato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina são acrescidos no momento do uso.
- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e Triton X-100 0,5%.
- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.
- Solução com proteína A marcada com ¹²⁵I: permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 μCi de proteína A ¹²⁵I.

Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 4 semanas de idade, como também, camundongos LEP^{db} (db/db) e C57BLKS/J da mesma idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os camundongos LEP^{db} (db/db) foram originalmente adquiridos de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, USA) e atualmente estabelecidos como colônia no Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os ratos foram alimentados com água e ração para roedores da marca Purina, *ad libitum*. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro para a Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas. A temperatura ambiente foi mantida entre 21-23 °C com ciclos luz de 12 h. Os animais foram pareados por idade para os experimentos individuais e aleatoriamente distribuídos dentro dos grupos tratamento e controle.

MÉTODOS

Protocolos para tratamento agudo com leptina e análise protéica por imunoprecipitação e immunoblotting

Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal com amobarbital de sódio (15 mg/Kg de peso corporal), e submetidos ao procedimento cirúrgico logo que a anestesia foi assegurada com a perda dos reflexos pedioso e corneano. A cavidade abdominal foi aberta e a veia porta exposta, e foi feita uma estimulação, *in vivo*, injetando 400 μ l de solução salina (0,9% NaCl), insulina (10⁻⁶ M) ou leptina (10⁻⁶, 10⁻⁸ ou 10⁻¹⁰ M). Após um tempo pré-determinado foi feita toracotomia e o timo foi retirado em seguida. Este tecido foi colocado imediatamente em tubo tipo *Falcon* contendo tampão de extração, mantido todo o tempo no gelo. O tecido foi homogeneizado durante 30 segundos com processador do tipo "polytron", operado em velocidade máxima. No final da extração, foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 9.000 x g por 20 min a 4°C, numa centrífuga *Beckman 70.1 Ti rotor* (Palo Alto, CA, USA), para remover o material insolúvel. Utilizamos o sobrenadante para imunoprecipitação com os anticorpos

anti-JAK-2, STAT-3 ou IRS1. Esta metodologia já foi descrita (Velloso et al., 1993; Luciano et al., 2002). Após quantificação protéica, pelo método colorimétrico de biureto (Bradford, 1976), utilizamos volumes das amostras com a mesma concentração de proteína. As amostras foram incubadas durante 12-14 h a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida, foi acrescentada proteína A-Sepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do complexo antígeno/anticorpo, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 min, a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem. As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 min e centrifugadas por 1 min. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre o gel, de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (resolving). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da Bio Rad, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 h, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 h, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por três sessões de 10 min cada e incubadas com anticorpo antifosfotirosina diluído em solução tampão por 4 h, a temperatura ambiente sob agitação constante, ou durante uma noite a 4 °C. A seguir as membranas foram lavadas novamente com solução basal por três sessões de 10 min e incubadas em solução com proteína A, marcada com ¹²⁵I, durante 2 h a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 12 - 48 h, os

filmes foram revelados na forma convencional. Nos experimentos de immunoblotting direto, extratos de proteínas totais foram separados em SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose, e anticorpos anti-fosfo (Ser⁴⁷³) Akt e anti-IRS1 foram usados. Em alguns experimentos, os ratos foram tratados previamente com 100 μ l de AG₄₉₀ (10⁻⁴ M) ou 400 μ l de LY₂₉₄₀₀₂ 5,0 μ M e depois submetidos ao tratamento agudo com leptina.

Protocolos para tratamento crônico com leptina e avaliação de apoptose

Para estes experimentos, os ratos foram aleatoriamente divididos em 8 grupos e tratados por injecão intraperitoneal de acordo com um dos seguintes protocolos: 400 ul de salina; 400 µl de leptina (10⁻⁶ M); 100 µl de AG₄₉₀ (10⁻⁴ M) + 400 µl de leptina; 400 µl de LY_{294002} 5,0 μ M + 400 μ l de leptina; 100 μ l de IRS1_{SO} (4,0 nmol) + 400 μ l de leptina; 100 μ l de IRS1_{SO} (4,0 nmol) + 400 μ l de salina; 100 μ l de IRS1_{ASO} (4,0 nmol) + 400 μ l de leptina; 100 μ l de IRS1_{ASO} (4,0 nmol) + 400 μ l de salina. O tratamento consistiu de duas doses diárias por três dias consecutivos. No quarto dia, cedo, os animais foram anestesiados conforme descrição anterior, e o timo retirado por toracotomia. Usando Potter, obtivemos uma suspensão de timócitos em solução tampão fosfato (PBS)/2% soro fetal bovino (Cult Lab, Campinas, Brazil). Estas células foram usadas para detecção de apoptose por citometria de fluxo. Em alguns experimentos, fragmentos de timo foram usados para determinação de nucleossomos por ELISA. Para avaliar a eficiência dos tratamentos com os três inibidores na manutenção de uma inibição contínua sobre seus respectivos alvos, em ratos tratados de acordo com os protocolos acima citados, 1, 4, 8 e 12 h após a dose do terceiro dia de tratamento, determinamos a fosforilação em tirosina de JAK2, STAT-3 e IRS1 após o tratamento com AG₄₉₀; a fosforilação em serina de Akt após o tratamento com LY₂₉₄₀₀₂; e a expressão protéica de IRS1 após o tratamento com IRS1_{ASO}.

Cultura primária de timócitos

Para a preparação de timócitos isolados, os ratos foram anestesiados; o timo retirado e gentilmente passado por uma peneira metálica. As células foram lavadas e suspensas, em gelo, com meio RPMI 1640 contendo penicilina-estreptomicina, L-glutamina

e 0,5% de soro fetal bovino. Vinte e quatro grupos de 5,0 x 10^6 células foram colocados em placas de cultura de 2,0 ml e tratados com leptina (10^{-8} M), AG₄₉₀ (10^{-6} M) + leptina (10^{-8} M), LY₂₉₄₀₀₂ (10^{-8} M) + leptina (10^{-8} M), IRS1_{ASO} (4,0 nmol) + leptina (10^{-8} M) ou IRS1_{ASO} (4,0 nmol). A apoptose foi avaliada após 12 h pelo método de ELISA para nucleossomos.

Determinação dos níveis sangüíneos de leptina após injeção de leptina exógena

Quarenta ratos foram aleatoriamente divididos em cinco grupos de 8 ratos cada. O primeiro grupo não recebeu tratamento. O segundo grupo foi subdividido em dois grupos de 4 ratos, os animais anestesiados e receberam uma dose de 400 μ l de leptina 10⁻⁶ M ou um volume equivalente de salina via veia cava. O sangue foi coletado da veia do rabo dos animais após 3,0 min do tratamento. O terceiro, quarto e quinto grupos foram, também, subdivididos em grupos de 4 ratos e tratados com uma dose de 400 μ l de leptina 10⁻⁶ M ou um volume equivalente de salina por via intraperitoneal e o sangue foi coletado da veia do rabo dos animais após 1, 6 e 12 h de tratamento, respectivamente. Os ratos foram anestesiados antes da coleta de sangue. A leptina foi determinada nas amostras usando um kit ELISA, comercialmente disponível, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Linco Research Inc.).

Detecção de apoptose por citometria de fluxo

As transformações estruturais pelas quais a célula em apoptose passa podem ser detectadas por diferentes métodos. A célula em processo de morte celular programada sofre alteração em sua membrana ocorrendo uma redistribuição dos fosfolipídeos por entre as suas duas camadas. Em condições de viabilidade, a célula mantem uma assimetria na dupla camada lipídica, e uma destas assimetrias é a, quase, completa ausência de fosfatidilserina na camada externa da membrana. Porém, durante a apoptose a fosfatidilserina está externalizada. A anexina V, na presença de íons cálcio, se liga de forma específica a fosfolipídeos de membrana na presença da fosfatidilserina. Assim, a ligação da anexina V à célula é um marcador potente de células apoptóticas (Vermes et al., 2000).

A apoptose é caracterizada pela manutenção de uma membrana celular intacta durante grande parte deste processo, incluindo a função de barreira da membrana. Células viáveis ou em apoptose são capazes de excluir do interior do citoplasma corantes, tais como iodeto de propídeo (IP). As células necróticas apresentam rupturas na sua membrana, o IP não é excluido do interior, e são positivas para este corante (Vermes et al., 2000).

Por isso, através de citometria de fluxo, analisamos os timócitos em apoptose e, por tanto, positivos para anexina V e negativos para IP.

Os timócitos, preparados conforme descrito acima, foram testados para apoptose usando a técnica de anexina-V (Oliveira et al., 2001). Noventa e seis microlitros de suspensão celular numa concentração final de 1.0×10^6 células/ml foram incubadas com 1,0 µl de anexina-V conjugada a FITC e 2,5 µl de iodeto de propídio (IP), como sugerido pelo fabricante. As células foram mantidas em gelo e incubadas no escuro por 10 min antes de diluir as células até 250 µl com tampão de ligação e analisadas por citometria de fluxo FACScalibur e o CellQuest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 10.000 células foi adquirido. Células não marcadas suspensas em PBS foram usadas como controle negativo e para determinação dos parâmetros de mensuração empregados nos As células apoptóticas foram medidas ensaios de apoptose. no quadrante anexina-V-positivo e IP-negativo e divididos pelo número total de células na região pré-determinada.

Detecção de apoptose por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Ratos foram tratados com injeção intraperitoneal, conforme descrito no protocolo para tratamento crônico, com salina, leptina, AG_{490} , $IRS1_{ASO}$ e/ou $IRS1_{SO}$. Na manhã do quarto dia, os animais foram anestesiados, e o timo retirado por toracotomia. Timócitos isolados foram tratados conforme descrito acima e utilizados 12 h após o tratamento. As células foram lisadas, centrifugadas e fragmentos citoplasmáticos de DNA

associado à histona foram determinados, no sobrenadante, por ELISA (Trumper et al., 2002) seguindo orientações do fabricante.

Citometria de fluxo para determinação de marcadores celulares

Conforme descrição anterior, o timo foi retirado após toracotomia,, de ratos previamente anestesiados. Com o emprego do Potter obtivemos suspensões $(1,0 \times 10^6 \text{ células/ml})$ de timócitos em PBS/2% soro fetal bovino. Amostras de 100 µl das suspensões celulares recém-isoladas foram incubadas por 20 min no escuro, em temperatura ambiente, com 10 μl dos seguintes painéis de anticorpos: CD3FITC/CD4RPE/CD8RPE-Cy ou CD4RPE/CD8RPE-Cy/ObR. A seguir, as células foram lavados e incubados com anticorpo secundário FITC-conjugado. Uma análise de três - cores foi feita usando FACScalibur, e o CellQuest Software foi usado para a análise quantitativa. Adicionalmente, empregamos a analise do volume celular para detectar a expressão dos marcadores celulares nas células em maturação.

Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR)

O RNA total foi extraído de timócitos isolados (~ 10^7 células por animal) e de hipotálamos de ratos Wistar, camundongos LEP^{db} (db/db) e C57BLKS/J usando TRIzol de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi feita usando 1,0 µg de RNA total com transcriptase reversa *SuperScript* (200 U/µl) e oligo (dT) (50mM) em 30 µl de volume de reação (5x RT buffer, 10 mM dNTP, e 40 U/l *RNAse free inhibitor*). As transcrições reversas envolveram uma incubação de 50 min a 42 °C e uma incubação de 15 min a 70 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose de 1,5% contendo brometo de etídio e visualizados por excitação sob luz ultravioleta. A foto-documentação foi realizada com *Nucleovision System* (NucleoTech, San Mateo, CA, USA) e a quantificação das bandas foi feita com o *Gel Expert Software* (NucleoTech). As primeiras fitas de cDNA foram amplificadas por PCR usando um *primer* da região transmembrana da seqüência do ObR (NCBI/NM 012596) complementar aos dois *primers* capazes de determinar as formas curtas e longas do receptor. A seqüência do *primer* da região transmembrana foi, 5' - CAG GGC TGT ATG TCA TTG - 3'; a seqüência do *primer* da forma curta foi, 5' - GTG CCC AGG AAC AAT TCT - 3'; e a seqüência do *primer* da forma longa foi, 5' - CCA GAG AAG TTA GCA CTG - 3'. Amplificações dos controles foram feitas na presença de polimerase e *template* de RNA, mas na ausência de transcriptase reversa. O m-RNA da β-actina foi amplificado em todas as amostras como controle de qualidade e quantidade de RNA usando os *primers* 5' - CGT AAA GAC CTC TAT TGC CAA - 3' e 5' - AGC CAT GCC AAA TGT GTC AT- 3', baseados na seqüência NCBI/NM 031144. As reações foram realizadas a 94°C por 2 min, seguidos por 50 ciclos, consistindo cada de 30 s a 92°C, 30 s a 50°C e 1 min a 72°C, seguidos por um ciclo único de extensão por 10 min a 72°C. A β-actina foi amplificada por um protocolo semelhante exceto que a reação foi limitada a 30 ciclos. Este método, com modificações menores foi usado previamente (Wang et al., 1996).

Imunohistoquímica

Três ratos controle foram anestesiados, e após a perda dos reflexos pediosos e corneanos, realizou-se toracotomia mediana com posterior canulação trans-cardíaca da aorta torácica. Os animais foram então perfundidos com cerca de 80 ml de solução fisiológica heparinizada (0,01% volume/volume), e a seguir 80 ml de paraformaldeído (Sigma) a 4%, dissolvido em água destilada pré-aquecida e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. Ambas as perfusões foram feitas com bomba de infusão, numa velocidade fixa de 4,0 ml/min. Em seguida o timo foi cuidadosamente retirado. O órgão foi então processado em álcool em diferentes concentrações (70%,80%,95% e 100%), xilol, e xilol/parafína. Logo após, o órgão foi incluído em bloco de parafína, onde foi seccionado em cortes de 5 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso, por cerca, de 24 h (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool e lavadas cerca de três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. Em seguida, foi iniciada a reação de imunofluorescência na qual, os cortes foram tratados com Triton X-100 por 10 min e novamente lavados três vezes com
PBS 0,1M, pH 7,4. As lâminas foram incubadas com solução contendo soro normal de cabra ou coelho a 2% por 30 min em temperatura ambiente e depois, expostas por 12h a 4°C, em câmara úmida, a um painel de anticorpos primários anti JAK-2 (1:20)/ObR (1:20), STAT-3 (1:20)/ObR (1:20) ou Akt (1:50)/ObR (1:20) e posteriormente incubadas com anticorpos secundários FITC-conjugados ou rodamina-conjugados. As imagens foram obtidas usando o Microscópio Laser Confocal (LSM510, Zeiss, New York, NY, USA). As especificidades dos anticorpos secundários foram testadas numa série de medidas de controles positivos e negativos. Descrição detalhada desta metodologia já foi publicada (Araujo et al., 2002).

Análise estatística

Todos os resultados numéricos estão expressos como média \pm SEM dos números indicados dos experimentos. Os resultados dos blots estão apresentados como comparações diretas das bandas nas auto-radiografías e quantificadas por densitometria usando o *Scion Image Software* (ScionCorp). Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student *two-tailed* não pareado ou por análise repetitiva de variância (one-way ou two-way ANOVA) seguida por *post hoc* análise de significância (Bonferroni test) quando apropriado, comparando os grupos experimentais e controle. O nível de significância foi estabelecido sendo *p*<0,05.

4- RESULTADOS

Time-course dos níveis sangüíneos de leptina após a administração de leptina exógena

O tratamento dos ratos com uma dose única de leptina exógena promoveu uma variação dos níveis sangüíneos do hormônio que alcançou um pico em 3.0 min e retornou aos níveis basais após 12 h (Tabela 1).

 Tabela 1- Time-course dos níveis sangüíneos de leptina após a administração de leptina exógena

	0.0 min	3.0 min	1.0 h	6.0 h	12.0 h
Saline treated	2.33	2.12	2.52	2.02	2.27
SEM (±)	0.33	0.12	0.54	0.45	0.44
Leptin treated	2.32	52.13*	29.88*	3.34*	2.89
SEM (±)	0.23	4.56	3.12	0.25	0.40

n = 4; *p<0.05 vs. saline treated; SEM, standard error of the mean Leptin (ng/mL)

A leptina inibe a apoptose tímica

O tratamento dos ratos com duas doses diárias de leptina (10^{-6} M) promoveu uma redução significativa da apoptose nas células tímicas, determinada pelo método de ELISA para detecção de nucleossomos- (~30% de inibição da apoptose, p<0,05) (Fig. 1A) e pelo método de anexina-V/citometria de fluxo (~15% inibição da apoptose, p<0,05) (Fig. 1B).

Figura 1



Figura 1- A leptina inibe a apoptose basal no timo. A apoptose das células tímicas foi avaliada pela determinação da formação de nucleossomos por ELISA (A), e pela determinação da expressão de anexina-V por citometria de fluxo; os parâmetros foram determinados pela avaliação da população celular tímica através de uma análise de citometria de fluxo de células não marcadas (gráfico superior) (B). Os métodos estão descritos na seção Materiais e métodos. Em todos os experimentos, n = 6, *p<0,05.</p>

A leptina ativa a sinalização de JAK-2/STAT-3 e IRS1/Akt no timo

A injeção aguda de uma dose única de leptina (10 M) induziu a fosforilação rápida em tirosina da quinase intracelular JAK-2 no tecido tímico (Fig. 2A, primeiro immunoblotting). Este efeito foi detectado após 1 min e durou por pelo menos 5 min. Em experimentos preliminares, para avaliar a dose-dependência deste fenômeno, os ratos foram agudamente tratados com uma dose única de leptina $(10^{-6}, 10^{-8} \text{ ou } 10^{-10} \text{ M})$ e o timo foi obtido após 3 min. A maior fosforilação em tirosina de JAK-2 foi obtida com a dose de 10^{-6} M (aumento de 3,5-vezes vs. controle, p<0,05), ressaltando-se que as doses de 10^{-6} M (aumento de 2,8-vezes vs. controle, p<0.05) e 10⁻¹⁰ M (aumento de 2,3-vezes vs. controle, p<0,05) foram, também, capazes de induzir ativação de JAK-2. O tratamento agudo com leptina, também, promoveu a fosforilação em tirosina de STAT-3 iniciando em 1 min, alcançando um pico em 3 min e durando por pelo menos 5 min (Fig. 2A, segundo immunoblotting). Para avaliar a capacidade da leptina em ativar a via de sinalização IRS1/Akt, os ratos foram tratados com uma dose única de leptina (10^{-6} M) e, após 2 (IRS1) ou 5 (Akt) min, o timo foi obtido. Como descrito na Figura 2A (dois immunoblottings na parte inferior), a leptina promoveu um aumento significativo na fosforilação em tirosina de IRS1 e na fosforilação em (Ser) de Akt. A magnitude do estimulo da leptina foi, de certa forma, menor de que o efeito da insulina sobre os mesmos transdutores do sinal.

Figura 2- A leptina ativa a transdução de sinal no timo. (A) Extratos de proteínas totais de timo foram usados em ensaios de imunoprecipitação (IP) (usando anticorpos anti- JAK-2, STAT-3 ou IRS1) e immunoblotting (IB) [usando anticorpos anti- fosfotirosina (pY) nas amostras de imunoprecipitado anti- JAK-2,-STAT-3 e -IRS1 ; ou anti-fosfo-(Ser⁴⁷³) Akt, em amostras não pré-imunoprecipitadas] para avaliar a transdução de sinal pela leptina. Os ratos foram anestesiadas e agudamente tratados com leptina (10⁻⁶M) ou insulina (10⁻⁶M). Os timos foram obtidos após decorridos os tempos conforme descrito na figura (experimentos anti-JAK-2 e anti-STAT-3) ou após 2 min para os experimentos de IRS1 e 5 min para os experimentos de Akt. (B) A co-expressão do ObR com JAK-2, STAT-3 e Akt foi determinada com microscopia confocal de dupla coloração. (C) A expressão das formas curta (ObR_{short}) e longa (ObR_{long}) do receptor da leptina foi determinada em hipotálamos e timócitos de ratos Wistar (W), camundongos Lep^{db} ou C57BLKS/J (C57), por reação de polimerase em cadeia de transcrição reversa . A expressão da β -actina foi usada como controle. (D) A co-expressão do ObR com CD4 e CD8; e a avaliação das sub-populações linfocíticas (CD4+/CD8+/CD3+) no timo foi realizada por citometria de fluxo. Os números dentro dos gráficos representam a proporção de células duplo positivas em cada grupo. Os números na margem direita representam a proporção das células triplo positivas em cada grupo. Em A, n = 4, *p<0.05 vs. Leptina (-)/Insulina (-); em B, as figuras são representativas de três experimentos independentes; em C as figuras são representativas de quatro experimentos independentes; em D, as figuras são representativas de seis experimentos independentes. SSC-Height, side scatter-height; FSC-Height, forward scatter height.



Figura 3



Figura 3- A expressão do ObR se reduz durante a maturação dos timócitos. Os timócitos foram divididos de acordo com o volume celular nos grupos R1-R3 (gráfico superior, os números representam a quantidade relativa das células em cada grupo). As células CD3 positivas de cada grupo foram avaliadas para a expressão de CD4, CD8 e ObR por citometria de fluxo. Em todos os experimentos n = 6. Os números dentro dos gráficos representam à proporção das células duplo positivas em cada grupo. Os números na margem direita representam à proporção das células triplo positivas em cada grupo. SSC-Height, side scatter-height; FSC-Height, forward scatter height.

O ObR é co-expresso com JAK-2, STAT-3 e Akt na maioria das células tímicas

Para avaliar a distribuição e a expressão célula-específica do ObR, nós utilizamos três métodos distintos. Na Figura 2B, a co-expressão do ObR com JAK-2 (painéis superiores), STAT-3 (painéis do meio), e Akt (painéis inferiores) está evidenciada por microscopia confocal de dupla coloração na maioria das células dos cortes tímicos fixados com paraformaldeído. De fato, a maioria das células do córtex e medula tímicos corou fortemente para todos os três antígenos testados. Adicionalmente, a expressão das formas longa e curta do ObR foi avaliada em timócitos isolados de ratos Wistar junto com a forma longa ausente no camundongo Lep, porém presente em sua cepa controle, C57BLKS/J. conforme mostrado na Figura 2C. A forma curta do ObR pode ser detectada no hipotálamo e em timócitos de todas as cepas avaliadas, enquanto que a forma longa pode ser detectada somente no hipotálamo e nos timócitos de ratos Wistar e camundongos C57BLKS/J. Adicionalmente, por meio de citometria de fluxo, observamos que a população celular predominante do timo, as células CD4 /CD8 duplo-positivas, corou consistentemente para o ObR (Fig. 2D). Também, foi observada a presença de um padrão distinto de expressão dos marcadores de superfície em subtipos celulares diferentes. Para tal, foram re-analizados timócitos CD3 positivos, agora subdivididos de acordo com o volume celular, sendo que esse parâmetro reflete a maturação celular. Como mostrado na Figura 3, há redução progressiva da expressão relativa do ObR nas células CD4 /CD8 duplo-positivas durante o processo de maturação.

Figura 4- Os efeitos dos inibidores de transdução do sinal. (A) Os ratos foram anestesiados e tratados com solução salina ou AG₄₉₀ (100 µl, 10⁻⁴ M). Após 30 min os animais receberam salina ou leptina (400 µl, 10⁻⁶ M). Após 1 min o timo foi obtido e usado nos ensaios de imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-JAK-2. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e submetidos a immunoblotting (IB) com anticorpos antifosfotirosina (pY). (B) Os ratos foram tratados durante três dias com IRS1_{ASO} (duas doses diárias de 4,0 nmol), e na manha do quarto dia o timo foi obtido e extratos de proteína total foram submetidos a separação por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e feito immunoblotting com anticorpos anti-IRS1. (C). Os ratos foram anestesiados e tratados com salina ou LY₂₉₄₀₀₂ (400 µl, 5.0 µM). Após 30 min os animais receberam salina ou leptina (400 µl, 10⁻⁶ M). Após 5 min o timo foi obtido e submetido à separação protéica por SDS-PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose e feito immunoblotting (IB) com anticorpos anti-fosfo (Ser⁴⁷³) Akt. Em D-F, os ratos foram tratados por três dias com duas doses diárias de AG₄₉₀ (100 µl, 10⁻⁴ M), LY_{294002} (400 µl, 5,0 µM), $IRS1_{ASO}$ (4,0 nmol) ou salina. Uma, quatro, oito ou doze horas após a dose da manha do terceiro dia, os ratos foram anestesiados e receberam uma dose aguda de salina ou leptina (400 µl, 10⁻⁶ M). Após 1 (JAK-2 e STAT-3, D), 2 (IRS1, D e F) ou 5 (Akt, E) minutos, os timos foram obtidos e usados nos experimentos de imunoprecipitação e immunoblotting para determinar a fosforilação em tirosina de JAK-2, STAT-3 e IRS1 (D), fosforilação em serina de Akt (E), ou a quantidade protéica de IRS1 (F). Em todos os experimentos n = 4, *p<0.05 vs. Ctr; §p<0.05 vs. tratados com leptina (em A e C).

Figura 4





$\boldsymbol{\nu}$				
	1.0 h	4.0 h	8.0 h	12.0 h
pJAK-2	-	-	-	Rep.
pSTAT-3			-	
pIRS-1	and the	102 4016 4018	i ini ini	COLUMN AND
Lep	- + +	- + +	- ++	- ++
AG ₄₉₀	+	+	+	+

В	IB: IRS-1			
			*	
ASU	723	656	198	
SEM	123	112	36	
	Ctr	SO	ASO	



E				
	1.0 h	4.0 h	8.0 h	12.0 h
p ⁴⁷³ Akt				-
Lep	- ++	- ++	- ++	- + +
LY 29400	2 +	+	+	+

F				
	1.0 h	4.0 h	8.0 h	12.0 h
IRS-1				Sec. 10
Lep	- ++	- ++	- + +	- + +
IRS-1 _{AS}	• +	+	+	+

Inibição de IRS1 e Akt, mas não de JAK-2 restaura a apoptose tímica inibida pela leptina

Para avaliar a participação das vias de sinalização JAK/STAT e IRS1/Akt na inibição da apoptose pela leptina no timo, utilizamos o inibidor da atividade tirosina quinase de JAK, AG₄₉₀ (Meydan et al., 1996; Wang et al., 1999); o inibidor da expressão de IRS1, IRS1_{ASO} (Araujo et al., 2005); e o inibidor da atividade da fosfatidilinositol 3-quinase, LY₂₉₄₀₀₂ (Vlahos et al., 1994). Nenhum dos esquemas de tratamento com os inibidores promoveu modificações na saúde ou no comportamento dos ratos. A eficácia do AG₄₉₀ foi testada pré-tratando os ratos com 100 μ l de solução AG₄₉₀ 10⁻⁴ M, e, após 30 min, por uma injeção com leptina. Como mostrado na Figura 4A, o AG490 reduziu significativamente a fosforilação em tirosina de JAK-2, induzida pela leptina. Para avaliar a eficácia do IRS1_{ASO}, os ratos foram tratados por três dias com duas doses diárias do IRS1_{ASO} (ou o controle sense, IRS1_{SO}) (4,0 nmol). Na manhã do quarto dia, o timo foi obtido e extratos protéicos totais foram usados em experimentos regulares de immunoblotting. Como mostrado na Figura 4B, IRS1_{ASO}, e não IRS1_{SO} aboliu, quase completamente, a expressão de IRS1 no timo. Finalmente, para avaliar a eficácia do LY₂₉₄₀₀₂, os ratos foram pré-tratados com uma dose de LY₂₉₄₀₀₂ (400 µl, 5,0 µM) e depois tratados com leptina (após 30 min). Após 5 min o timo foi obtido e usado em experimentos regulares de immunoblotting para avaliar a fosforilação em (Ser) da Akt. Conforme mostrado na Figura 4C, o LY₂₉₄₀₀₂ significativamente inibiu a ativação induzida pela leptina da Akt. Adicionalmente, todos os três inibidores foram efetivos na manutenção da inibição sobre os seus respectivos alvos durante o intervalo entre as doses (Fig. 4 D-F).

Em seguida, avaliamos os resultados dos tratamentos dos ratos com cada inibidor de transdução de sinal sobre o efeito da leptina em inibir a apoptose tímica. A Figura 5 (A-C) mostra que a inibição da expressão de IRS1 pelo $IRS1_{ASO}$ e a inibição da atividade da PI3-K pelo LY_{294002} foram, ambas, capazes de restaurar os níveis basais da apoptose, conforme a detecção por citometria de fluxo e ELISA para nucleossomos. O tratamento com AG₄₉₀, entretanto, não resultou em nenhuma modificação na inibição da apoptose pela leptina no timo, como mostrado por citometria de fluxo (Fig. 5A e 5B) e por ELISA para detecção de nucleossomos (Fig. 5C). Finalmente, usando timócitos recém isolados confirmaram-se os resultados obtidos em ratos vivos. Observamos que a inibição da atividade da PI3-K pelo LY₂₉₄₀₀₂ e a inibição da expressão de IRS1 pelo IRS1_{ASO} forma ambas capazes de suprimir os efeitos da leptina em inibir a apoptose (Fig. 6), enquanto que, a inibição da atividade de JAK-2 pelo AG₄₉₀ não exerceu nenhum efeito sobre a inibição da apoptose pela leptina (Fig. 6).

Figura 5



Figura 5- Os efeitos da inibição da transdução de sinal sobre a apoptose inibida pela leptina em timo de ratos vivos. A apoptose das células tímicas foi avaliada pela determinação de anexina-V por citometria de fluxo (A e B) e pela formação de nucleossomos por ELISA (C). Os métodos são descritos na seção Materiais e métodos. Em todos os experimentos n = 6, *p<0.05 vs. salina; §p<0.05 vs. leptina.</p>

Figura 6



Figura 6- Os efeitos da inibição da transdução de sinal sobre a apoptose inibida pela leptina em timócitos isolados. A apoptose em timócitos isolados foi avaliada pela determinação da formação de nucleossomos por ELISA. Os métodos são descritos na seção Materiais e métodos. Em todos os experimentos n = 4, *p<0.05 vs. salina; §p<0.05 vs. leptina.</p>

5- DISCUSSÃO

Uma série de estudos recentes revelou a participação da leptina na modulação de várias funções imunológicas (La Cava et al., 2004). Em particular, foi proposto que a ação da leptina no controle da apoptose de células do sistema imune contribui para a resposta imunológica inadequada em indivíduos desnutridos e para a patogênese das doenças auto-imunes (La Cava et al., 2004; Howard et al., 1999; Faggioni et al., 2001).

A leptina, um hormônio com características funcionais e moleculares de citocina, é produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco em proporção direta à massa corpórea do mesmo. Além desse tecido, a produção da leptina ocorre no estômago, em músculo esquelético, e na placenta (Masuzaki et al., 1997; Bado et a., 1998; Friedman, 2002). Em razão da identificação da leptina ter sido centrada na caracterização molecular de um modelo monogênico de obesidade, o camundongo ob/ob, os estudos inicias a respeito desse hormônio/citocina foram focados em suas propriedades envolvidas com o controle da fome e da adiposidade (Friedman, 2002). Foi somente a partir de 1998 (Lord et al., 1998) que estudos relativos à sua participação no controle de diversas funções do sistema imune passaram a ser desenvolvidos. De acordo com tais estudos, a leptina, atuando como citocina, é capaz de modular a homeostase do timo, favorecendo o aumento do número médio de timócitos, o que tem como base mecanística a inibição da apoptose (Lord et al., 1998). Além disso, a leptina participa da indução da proliferação e diferenciação de linfócitos T helper 1 e da produção de proteínas de resposta aguda como TNF- α e IL-1 β (Lord et al., 1998).

Em razão da importância clínica assumida pela resposta imune disfuncional durante estados nutricionais extremos, acredita-se que avanços na caracterização dos mecanismos e eventos que participam deste fenômeno possam contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais efetivas para situações como a imunodeficiência associada à desnutrição, a resposta imunológica inadequada observada em pacientes com diabetes mellitus, e algumas doenças auto-imunes nas quais a condição nutricional parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento e evolução do quadro (Chan et al., 1996; Faggione et al., 2001; Fox et al., 2005). Assim, o presente estudo teve como objetivo avançar na caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos no

controle da apoptose de células do timo exercido pela leptina. Para tal foram analisadas as vias de sinalização JAK-2/STAT-3 e IRS1/PI3-K/Akt.

Para avaliar se os protocolos de tratamento agudo e crônico com leptina exógena, eram capazes de prover níveis sanguíneos elevados do hormônio, realizamos uma avaliação de *time-course* dos níveis séricos de leptina após a injeção de uma dose única deste hormônio. Para o tempo de 3 min, leptina exógena foi injetada via veia cava para reproduzir o protocolo de tratamento agudo usado neste estudo. Para os tempos de 1, 6 e 12 h, a leptina foi administrada por injeção intraperitoneal como no protocolo crônico. Os resultados revelaram que tratamento com leptina exógena promoveu um aumento rápido e significativo dos níveis séricos do hormônio, que durou por, pelo menos, seis horas. Visto que, durante o tratamento crônico nós empregamos duas doses diárias do hormônio acreditamos que os ratos estavam hiperleptinêmicos durante a maior parte do período experimental.

A seguir, avaliamos a capacidade da leptina em modular a apoptose constitutiva de células do timo. Por meio de dois métodos distintos, observou-se que a leptina inibe a apoptose tímica basal de ratos jovens numa proporção de 15-30%. Estes números estão em acordo com um estudo prévio do efeito da leptina sobre a taxa da apoptose no timo (Howard et al., 1999). Em seguida, avaliamos a capacidade da leptina em induzir a ativação da sinalização de JAK-2/STAT-3 e IRS1/PI3-K/Akt no timo. É de conhecimento que os linfócitos, em particular as células CD4⁺, expressam a forma longa do receptor de leptina (Lord et al., 1998). Entretanto, nenhum estudo, até o momento, havia avaliado a expressão do ObR no timo e a sua co-expressão com proteínas envolvidas na transdução do sinal da leptina. Neste estudo, nós mostramos que a maioria das células do timo, incluindo a maioria dos timócitos CD4⁺/CD8⁺ expressa o ObR. Quando avaliamos a expressão do ObR em timócitos previamente separados por tamanho celular, observamos que durante o processo de maturação há uma redução progressiva da expressão relativa do ObR. Este fato nunca havia sido relatado anteriormente e pode ter implicações importantes sobre o papel da leptina na modulação da função imunológica durante as etapas mais precoces da vida. Depois, observamos que o ObR co-localiza com JAK-2, STAT-3 e Akt na maioria destas células. Quando os ratos foram tratados com leptina, ambas as vias de sinalização

JAK-2/STAT-3 e IRS1/Akt foram ativadas. Assim, podemos concluir que, em timo de ratos jovens, o ObR está expresso em quase todas as células e pode ser ativado pela leptina, gerando um sinal que é transduzido pela via clássica de sinalização da leptina (JAK/STAT) e por, pelo menos, uma via alternativa de sinalização (IRS1/Akt). Visto que a leptina pode ativar a sinalização via JAK-2/STAT-3 somente se a forma longa do receptor for presente (Bahrenberg et al., 2002), podemos concluir que, pelo menos uma fração do ObR detectado no timo é composta da forma longa do receptor. Tal fato foi explorado de forma complementar por RT-PCR que revelou a expressão tanto da forma longa como da forma curta do ObR no timo e hipotálamo da ratos Wistar e camundongos C57BLKS/J, mas somente a forma curta nestes mesmos tecidos em camundongos Lep^{db}.

Para avaliar a participação de cada uma das vias de sinalização (JAK/STAT e IRS1/PI3-K/Akt) na inibição pela leptina, da apoptose tímica, usamos inibidores específicos da transdução de sinal. A princípio, a eficácia dos inibidores foi testada por immunoblotting, e por meio de tais estudos observamos que AG₄₉₀, LY₂₉₄₀₀₂ e IRS1_{ASO} foram efetivos na sua capacidade de bloquear a transdução do sinal através de JAK-2, PI3-K e IRS1, respectivamente, por um período de tempo suficiente para garantir a eficácia do protocolo. Uma vez assegurada a inibição da sinalização via JAK, da expressão de IRS1 e da atividade da PI3-K, os ratos foram submetidos a diferentes protocolos de tratamento para testar a participação de cada cascata de sinalização no controle da apoptose. Utilizando esta abordagem, nós encontramos que a inibição da sinalização da JAK não interferiu na capacidade da leptina de inibir a apoptose. Entretanto, a inibição tanto da expressão de IRS1 e como da atividade da PI3-K foi, igualmente, efetiva em abolir o efeito inibitório da leptina sobre a apoptose no timo.

A ativação da Akt por um conjunto de diferentes sinais, fato conhecido há um longo tempo, exerce um efeito importante sobre o controle da apoptose em diferentes tipos celulares (Datta et al., 1999). A Akt ativada catalisa a fosforilação de Bad, um membro da família Bcl-2, inibindo a sua atividade e assim inibindo a apoptose (Datta et al., 1997). Em relação aos efeitos anti-apoptóticos da leptina, a participação da Akt já foi relatada em células de neuroblastoma (Russo et al., 2004), no fígado (Saxena et al., 2004) e em células de câncer de próstata (Somasundar et al., 2004). Inversamente, nenhum estudo forneceu

evidência irrefutável pelo requerimento da via de sinalização JAK/STAT na inibição da apoptose pela leptina. De fato, de acordo com Dunn e colaboradores (Dunn et al., 2005), agindo sobre os timócitos pela via JAK-2/STAT-3, a leptina regula o *feedback* negativo do sinal e não a apoptose tímica.

Após a ligação da leptina ao ObRb ocorre a fosforilação em tirosina da JAK-2 a ele associada. Uma vez ativa a JAK-2 recruta e fosforila a STAT-3 que se dimeriza e migra para o núcleo. Adicionalmente, em vários tipos celulares, a leptina é capaz de induzir a fosforilação em tirosina da IRS1, e a quinase resposável por tal evento é ainda desconhecida (Sánchez-Margalet et al., 2003; Niswender et al., 2003; Hegyi et al., 2004). Apesar da incerteza é possível que a própria JAK-2 seja esta quinase. Nesse contexto, Carvalheira et al. demonstraram que a IRS se associa à JAK-2 após estimulação com leptina em hepatócitos de ratos (Carvalheira et al.,2003). Mais ainda, a leptina ativa a PI3-K e a atividade desta está diretamente ligada a fosforilação de uma proteína com peso molecular correspondente a IRS1 (Sánchez-Margalet et al., 2003). A via IRS1/PI3-K é uma das principais vias de sinalização ativadas pela insulina e através desta via, e possivelmente outras, ocorre um cross-talk molecular entra a leptina e a insulina (Niswender et al., 2003; Hegyi et al., 2004). As próprias quinases JAK participam ativamente, em diferentes sistemas de sinalização, num complexo processo de *cross-talk*, prova disso a JAK-2 sendo ativada pela Angiotensina II através do seu receptor AT1 e, também pela insulina via seu receptor (Velloso et al., 2006).

O objetivo deste estudo era avaliar o efeito da leptina exógena sobre o ritmo basal da apoptose tímica durante os estágios iniciais da vida. Entretanto, visto que a maioria dos experimentos foi feita em animais vivos, não podemos descartar a possibilidade de que alguns dos efeitos aqui descritos foram devido a mecanismos indiretos. Um possível mecanismo indireto que poderia ter um papel aqui é a produção de hormônios adrenocorticóides. É bastante conhecido o papel dos glicocorticóides na indução da apoptose em células T (Ashwell et al., 2000). Visto que a leptina é capaz de inibir a função adrenocortical (Walker et al., 2004), é possível alegar que uma ação glicocortical defeituosa no timo dos ratos tratados com leptina poderia explicar a inibição da apoptose descrita aqui. Todavia, há pelo menos três pontos que podem contrapor esta possibilidade. Um primeiro refere-se ao fato da apoptose das células T induzida pelo glicocorticóide, dependente da via mitocôndria/Apaf-1/caspase-9 (Kuida et al., 1998; Yoshida et al., 1998), não pode ser inibida pela ativação da sinalização via PI3-K/Akt (Jamieson et al., 2000). O segundo ponto refere-se ao fato de que relatos prévios observarem os efeitos anti-apoptóticos da leptina em sistemas celulares isolados (Lord et al., 1998; Fujita et al., 2002), assim, ocorrendo de forma independente dos efeitos sistêmicos do hormônio sobre a função adrenocortical. Finalmente, em pelo menos um relato, foi mostrado que a leptina exógena é capaz de superar os efeitos pró-apoptóticos dos glicocorticóides (Fujita et al., 2002). Neste momento, não podemos rejeitar a possibilidade da interação da leptina com outros mecanismos envolvidos no controle da apoptose das células tímicas. Num futuro próximo, seria de grande interesse avaliar se a leptina é capaz de modular qualquer outro mecanismo envolvido no controle da sobrevivência dos timócitos e, também, determinar se a leptina inibe tipos específicos de morte celular programada no timo, tais como a morte por negligência ou a seleção negativa.

Deste modo, considerando os resultados deste estudo e os dados da literatura, concluímos que a leptina exerce um efeito anti-apoptótico sobre o timo de ratos jovens. Este efeito é mediado pela via de sinalização IRS1/PI3-K e é independente da ativação de JAK. Visto que o ObR não possui atividade tirosina quinase intrínseca, suspeitamos que uma quinase intracelular, não pertencente à família JAK, agiria como um intermediário entre o receptor de leptina e a proteína adaptadora IRS1.

6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- O receptor da leptina está presente nos timócitos, tanto na sua forma longa como na forma curta e a sua densidade relativa diminui progressivamente durante a maturação dos timócitos;
- O ObR se co-localiza com JAK-2 e STAT-3 e o tratamento com leptina provoca a fosforilação em tirosina de JAK-2 e o engajamento de STAT-3. O tratamento com leptina provoca, ainda, a fosforilação em tirosina de IRS1 e a fosforilação em serina Akt;
- O tratamento crônico com leptina reduz a apoptose tímica e este efeito não é inibido por um inibidor de JAK, mas por um inibidor de PI3-quinase e por um antisense para IRS1;
- Portanto, a leptina inibe a apoptose em células tímicas via um mecanismo independente da ativação de JAK-2, mas dependente da participação da via IRS1/PI 3-quinase.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (2000). Cellular and molecular immunology. Philadelphia: 4th Ed. W. B. Suanders.

Araujo, E. P., Amaral, M. E., Filiputti, E., De Souza, C. T., Laurito, T. L., Augusto, V. D., Saad, M. J., Boschero, A.C., Velloso, L. A., Carneiro, E. M. (2004). Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. J Endocrinol 181, 25-38.

Araujo, E. P., Amaral, M. E., Souza, C. T., Bordin, S., Ferreira, F., Saad, M. J., Boschero, A. C., Magalhaes, E. C., Velloso, L. A. (2002). Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. FEBS Lett 531, 437-42.

Araujo, E. P., De Souza, C. T., Gasparetti, A. L., Ueno, M., Boschero, A. C., Saad, M. J., Velloso, L. A. (2005). Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. Endocrinology 146, 1428-37.

Ashwell, J. D., Lu, F. W., Vacchio, M. S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. Annu Rev Immunol 18, 309-45.

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., Lewin, M. J. (1998). The stomach is a source of leptin. Nature 394, 790-3.

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, 859-72.

Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., Myers, M. G. Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 275, 14563-72.

Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., Flier,J. S. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels.Endocrinology 139, 3485-91.

Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., Ryan, I. (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. Clin Endocrinol Metab 81, 3419-23.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-54.

Bredesen, D.E., Rammohan, V. R., Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. Nature 443, 796-802.

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

Carvalheira, J. B., Ribeiro, E. B., Folli, F., Velloso, L. A., Saad, M. J. (2003). Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. Biol Chem 384, 151-9.

Chan, J., Tian, Y., Tanaka, K. E., Tsang, M. S., Yu, K., Salgame, P., Carroll, D., Kress, Y., Teitelbaum, R., Bloom, B. R. (1996). Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 93, 14857-61.

Chandra, R. K. (1980). Cell-mediated immunity in genetically obese (C57BL/6J *ob/ob*) mice. Am J Clin Nutr 33, 13-6.

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

Datta, S. R., Brunet, A., Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 13, 2905-27.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91, 231-41.

De Rosa, V., Procaccini, C., La Cava, A., Chieffi, P., Nicoletti, G. F., Fontana, S., Zappacosta, S., Matarese, G. (2006). Leptin neutralization interferes with pathogenic T cell autoreactivity in autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest 116, 447–55.

Duan, C., Li, M., Rui, L. (2004). SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. J Biol Chem 279, 43684-91.

Dunn, S. L., Bjornholm, M., Bates, S. H., Chen, Z., Seifert, M., Myers, M. G. Jr. (2005). Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. Mol Endocrinol 19, 925-38.

Faggioni, R., Feingold, K. R., Grunfeld, C. (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. Faseb J 15, 2565-71.

Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., DePaoli, A. M., O'Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest 110, 1093-103.

Flier, J. S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 116, 337-50.

Ferraroni, N. R., Geloneze, B., Mansour, E., Perroud, A. P., Muscelli, E. O., Tambascia, M., de Lima Zollner, R., Velloso, L. A. (2005). Severe hypoleptinaemia associated with insulin resistance in patients with common variable immunodeficiency. Clin Endocrinol 63, 63-5.

Fox, C. J., Hammerman, P.S., Thompson, C. B. (2005). Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. Nature Rev Immunol 5, 844-52.

Friedman, J. M. (2002). The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutr Rev 60, S1-14; discussion S68-84, 85-7.

Fujita, Y., Murakami, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Tanaka, M., Ozaki, S., Nakao, K., Mimori, T. (2002). Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. Clin Exp Immunol 128, 21-6.

Goldberg, A. C., Eliaschewitz, F. G., Montor, W. R., Baracho, G. V., Errante, P. R., Callero, M. A., Cardoso, M. R. A., Braga, P. E., Kalil, J., Sogayar, M. C., Rizzo, L. V. (2005). Exogenous leptin restores in vitro T cell proliferation and cytokine synthesis in patients with common variable immunodeficiency syndrome. Clin Immunol 114, 147-53.

Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., Friedman, J. M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. Science 269, 534-546.

Haniu, M., Arakawa, T., Bures, E. J., Young, Y., Hui, J. O., Rohde, M. F., Welcher, A. A., Horan, T. (1998). Human leptin receptor: Determination of disulfide structure and *N*-glycosylation sites of the extracellular domain. J Biol Chem 273, 28691-9.

Hegyi, K., Fülöp, K., Kovács, K., Tóth, S., Falus, A. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. Cell Biol Int 28, 159-69.

Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., Lechler, R. I., Bloom, S. R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. J Clin Invest 104, 1051-9.

Jamieson, C. A., Yamamoto, K. R. (2000). Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7319-24.

Kloek, C., Haq, A. K., Dunn, S. L., Lavery, H. J., Banks, A. S., Myers, M. G. Jr. (2002). Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. J Biol Chem 277, 41547-55.

Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell 94, 325-37.

La Cava, A., Alviggi, C., Matarese, G. (2004). Unreveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. J Mol Med 82, 4-11.

La Cava, A., Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol 4, 371-9.

Leibel, R. L., Rosenbaum, M., Hirsh, J. (1995). Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. N Engl J Med 332, 621-28.

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, 897-901.

Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Bloom, S. R., Lechler, R. I. (2002). Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. J Leukoc Biol 72, 330-38.

Luciano, E., Carneiro, E. M., Carvalho, C. R., Carvalheira, J. B., Peres, S. B., Reis, M. A., Saad, M. J., Boschero, A. C., Velloso, L. A. (2002). Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. Eur J Endocrinol 147, 149-57.

MacCuish, A. C., Urbaniak, S. J., Campbell, C. J., Duncan, L. J., Irvine, W. J. (1974). Phytohemagglutinin transformation and circulating lymphocyte subpopulations in insulindependent diabetic patients. Diabetes 23, 708-12.

Madej, T., Boguski, M. S., Bryant, S. H. (1995). Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. FEBS Lett. 373, 13-8.

Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Sanchez-Margalet, V. (2000). Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. Cell Immunol 199, 15-24.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., Nakao, K. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nat. Med. 3, 1029-33.

Matarese, G., Carrieri, P. B., La Cava, A., Perna, F., Sanna, V., De Rosa, V., Aufiero, D., Fontana, S., Zappacosta, S. (2005). Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. PNAS 102, 5150-5.

Matarese, G., Di Giacomo, A., Sanna, V., Graham, L. M., Howard, J. K., Di Tuoro, A., Bloom, S. R., Lechler, R. I., Zappacosta, S., Fontana, S. (2001). Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 166, 5909-16.

Matarese, G., La Cava, A. (2004). The intricate interface between immune system and metabolism. Trends Immunol 25, 193-200.

Matarese, G., Moschos, S., Mantzoros, C.S. (2005). Leptin in immunology. J Immunol 173, 3137-42.

Matarese, G., Sanna, V., Lechler, R. I., Sarvetnick, N., Fontana, S., Zappacosta, S., La Cava, A. (2002). Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. Diabetes 51, 1356-61.

Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J. S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., Levitzki, A., Roifman, C. M. (1996). Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. Nature 379, 645-8.

Niswender, K. D., Schwartz, M. W. (2003). Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. Front Neuroendocrinol 24, 1-10.

Oliveira, G. B., Pereira, F. G., Metze, K., Lorand-Metze, I. (2001). Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. Cytometry 46, 329-35.

O'Rourke, R.W., Kay, Lyle, T. E. A., Traxler, S. A., Deveney, C.W., Jobe, B. A., Roberts Jr, C. T., Marks, D., Rosenbaum, J. T. (2006). Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. Clin Exp Immunol 146, 39–46.

Pacifico, L., Di Renzo, L., Anania, C., Osborn, J. F., Ippoliti, F., Schiavo, E., Chiesa, C. (2006). Increased T-helper interferon-□-secreting cells in obese children. Eur J Endocrinol 154, 691–7.

Palacio, A., Lopez, M., Perez-Bravo, F., Monkeberg, F., Schlesinger, L. (2002). Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. J Clin Endocrinol Metab 87, 3040-46.

Pallaro, A. N., Roux, M. E., Slobodianik, N. H. (2001). Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. Nutrition 17, 724-8.

Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X. C., Matarese, G., Strom, T., Mantzoros, C. (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, 7745–52.

Pereira. M. A., Sannomiya, P., Leme, J. G. (1987). Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. Diabetes 36, 1307-14.

Prentice, A. M. (1999). The thymus: a barometer of malnutrition. Br J Nutr 81, 345-7.

Russo, V. C., Metaxas, S., Kobayashi, K., Harris, M., Werther, G. A. (2004). Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. Endocrinology 145, 4103-12.

Sánchez-Margalet, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. Clin Exp Immunol 133, 11-9.

Sanna, V., Di Giacomo, A., La Cava, A., Lechler, R. I., Fontana, S., Zappacosta, S., Matarese, G. (2003). Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. J Clin Invest 111, 241-50.

Sannomiya, P., Pereira, M. A., Garcia-Leme, J. (1990). Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattarctants. Agents Actions 30, 369-76.

Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Sánchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. Cell Immunol 194, 6-11.

Savino, W. (2002). The thymus gland is a target in malnutrition. Eur J Clin Nutr 56 Suppl 3, S46-9.

Saxena, N. K., Titus, M. A., Ding, X., Floyd, J., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Anania, F. A. (2004). Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. Faseb J 18, 1612-4.

Siegmund, B., Sennello, J. A., Jones-Carson, J., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Fantuzzi, G. (2004). Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. Gut 53, 965-72.

Somasundar, P., Frankenberry, K. A., Skinner, H., Vedula, G., McFadden, D. W., Riggs, D., Jackson, B., Vangilder, R. Hileman, S. M., Vona-Davis, L. C. (2004). Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. J Surg Res 118, 71-82.

Sone, M., Osamura, R. Y. (2001). Leptin and the pituitary. Pituitary 4, 15-23.

Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. J Biol Chem 272, 6093-6.

Tilg, H., Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nature Rev Immunol 6, 772-83.

Torpy, D. J., Bornstein, R., Chrousos, G. P. (1998). Leptin and interleukin-6 in sepsis. Horm Metab Res 30, 726-729.

Trumper, A., Trumper, K., Horsch, D. (2002). Mechanisms of mitogenic and antiapoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)cells. J Endocrinol 174, 233-46.

Vecchione, C., Maffei, A., Colella, S., Aretini, A., Poulet, R., Frati, G., Gentile, M. T., Fratta, L., Trimarco, V., Trimarco, B., Lembo, G. (2002). Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. Diabetes 51, 168-73.

Velloso, L. A., Folli, F., Perego, L., Saad, M. J. A. (2006). The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. Diabetes Metab Res Rev 22, 99-107.

Velloso, L. A., Kampe, O., Hallberg, A., Christmanson, L., Betsholtz, C., Karlsson, F.A. (1993). Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. J Clin Invest 91, 2084-90.

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods 243, 167-90.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem 269, 5241-8.

Walker, C. D., Salzmann, C., Long, H., Otis, M., Roberge, C., Gallo-Payet, N. (2004). Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. Endocr Res 30, 837-44.

Wang, L. H., Kirken, R. A., Erwin, R. A., Yu, C. R., Farrar, W. L. (1999). JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. J Immunol 162, 3897-904.

Wang, M. Y., Zhou, Y. T., Newgard, C. B., Unger, R. H. (1996). A novel leptin receptor isoform in rat. FEBS Lett 392, 87-90.

Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M., Mak, T. W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell 94, 739-50.

Zabeau, L., Lavens, D., Peelman, F., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J., Tavernier, J. (2003). The ins and outs of leptin receptor activation. FEBS Lett 546, 45-50.

Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A. P., Strasburger, C. J., Ross, R. J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. J Immunol 167, 4593-9.

Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J. P., Schevitz, R. W.(1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. Nature 387, 206-9.

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, 425-32.

Zhang, Y., Wilsey, J. T., Frase, C. D., Matheny, M. M., Bender, B. S., Zolotukhin, S., Scarpace, P. J. (2002). Peripheral but not central leptin prevents the immunosuppression associated with hypoleptinemia in rats. J Endocrinol 174, 455-61.

8-ANEXOS

Leptin Inhibits Apoptosis in Thymus through a Janus Kinase-2-Independent, Insulin Receptor Substrate-1/ Phosphatidylinositol-3 Kinase-Dependent Pathway

Eli Mansour, Fernanda G. Pereira, Eliana P. Araújo, Maria E. C. Amaral, Joseane Morari, Natasha R. Ferraroni, Diogenes S. Ferreira, Irene Lorand-Metze, and Lício A. Velloso

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13083-970 Campinas SP, Brazil

The cytokine-like hormone leptin is known to exert important functions on the modulation of immune responses. Some of these effects are dependent on the property of leptin to modulate the apoptosis of thymic cells. In the present study, we used Wistar rats to investigate the molecular mechanisms involved in leptin-dependent control of apoptosis in thymus. Apoptosis was evaluated by flow cytometry and ELISA for nucleosome determination, whereas signal transduction was evaluated by immunoprecipitation, immunoblot, and confocal microscopy. The Ob receptor (ObR) was expressed in most thymic cells and its relative amount reduced progressively during thymocyte maturation. ObR expression was colocalized with Janus kinase (JAK)-2 and signal transducer and activator of transcription-3, and an acute, *in vivo*, injection of

EPTIN, THE PRODUCT of the *ob* gene, is a cytokine-like → hormone, produced mostly by the adipose tissue in direct proportion to whole-body fat mass (1). In recent years a role for leptin in the regulation of immune response has been uncovered (2). Apparently leptin acts as a link between the nutritional status and the control of immune system activity (2). Under physiological conditions, the increase in body fat mass that follows a period of overeating, leads to an increased leptin activity in specialized neurons of the hypothalamus, inducing energy expenditure and reducing food intake (1, 3). In addition, leptin regulates different facets of the immune response, such as the promotion of an enhancement of peripheral T cell activity and proliferation (4, 5), activation of monocyte response (6,7), regulation of cytokine production (8), and modulation of immune response during autoimmunity (9).

Most leptin actions are delivered through the activation of the IL-6/gp 130-like Ob receptor (ObR) (10). Like other members of the class I cytokine family, the ObR lacks intrinsic tyrosine kinase activity and depends on the activation of an intracellular kinase to achieve full engagement of its intracellular signal transduction pathway (10). Upon leptin binding, the ObR engages Janus kinase (JAK)-2, inducing its auleptin promoted the tyrosine phosphorylation of JAK-2 and the engagement of signal transducer and activator of transcription-3. The treatment with leptin also led to the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)-1 and serine phosphorylation of Akt. Chronic treatment with leptin reduced thymic apoptosis, an effect that was not inhibited by the JAK inhibitor AG_{490} but was significantly inhibited by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY_{294002} and an antisense oligonucleotide to IRS-1. Thus, leptin inhibits the apoptosis of thymic cells through a mechanism that is independent of the activation of JAK-2 but depends on the engagement of the IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. (*Endocrinology* 147: 5470–5479, 2006)

tophosphorylation at tyrosine residues, which is followed by tyrosine phosphorylation of the ObR and subsequent recruitment, tyrosine phosphorylation, and induction of dimerization of signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, which migrates to the nucleus and finally regulates gene transcription (10–12). Besides its effects on the classical JAK/STAT signaling pathway, which provides a direct access to the nucleus, leptin activates several other intracellular signaling pathways such as the MAPK cascade (13–15), phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)/Akt (16), SH2-B (17) and insulin receptor substrate (IRS)-1 (18). Through these pathways, leptin may be integrated to a complex intracellular cross talk system that regulates functions such as cell growth, mitogenesis, metabolism, and apoptosis (1, 2, 19).

One of the most remarkable aspects of malnutrition is the atrophy of the thymus and the development of immunosuppression (20, 21). Starvation causes a loss of normal thymic architecture and reduces the number of cortical thymocytes by increasing the rate of apoptosis (22). In addition, starvation and chronic malnutrition promotes a fall in leptin levels (23), and this phenomenon has been proposed to play a role in the anomalous thymic morphology and function observed during nutritional deprivation states (22). This hypothesis has been further supported by the fact that both humans and rodents with defective leptin production present a significant restoration of different aspects of the immune response when treated with exogenous leptin (8, 22, 24) and that the treatment of leptin-deficient ob/ob mice with exogenous leptin reduces thymic atrophy by increasing its cellularity (22).

First Published Online July 27, 2006

Abbreviations: FITC, Fluorescein isothiocyanate isomer 1; RPE, phycoerythrin; IRS, insulin receptor substrate; JAK, Janus kinase; ObR, Ob receptor; PI 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; RT, reverse transcription; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (http:// www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.

Although the functional effects of leptin on thymic cellularity and apoptosis have been well characterized, the molecular mechanisms involved in this control are poorly understood. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the intracellular transduction pathways that participate in leptin-induced inhibition of apoptosis in the thymus of Wistar rats.

Materials and Methods

Experimental animals

Four-week-old male Wistar rats and Lep^{db} (db/db) and C57BLKS/J mice were obtained from the University of Campinas Breeding Center. The Lep^{db} (db/db) mice were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and are currently established as a colony at the University of Campinas Breeding Center. The animals were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. All experiments involving animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and approved by the University of Campinas Ethical Committee. Room temperature was maintained between 21 and 23 C with 12-h light, 12-h dark cycle. The animals were age matched for individual experiments and randomly distributed into treatment or control groups.

Materials

Antibodies against JAK-2 (sc-278), STAT-3 (sc-483), phosphotyrosine (sc-508), IRS-1 (sc-559) ObR (sc-8325), and phospho-(Ser⁴⁷³) Akt (sc-9271) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Conjugated mouse antirat CD3-fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC), CD4phycoerythrin (RPE), and CD8-RPE-Cy5 were from Serotec, Ltd. (Oxford, UK). ¹²⁵I-protein A Sepharose and nitrocellulose paper (Hybond ECL, 0.45 µm) were from Amersham (Buckinghamshire, UK). Protein A Sepharose 6 MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), and protein A Agarose (AG-Plus) (sc-2003) was from Santa Cruz Biotechnology. Leptin, the JAK inhibitor AG₄₉₀ (tyrphostin B42), and the PI 3-kinase inhibitor LY₂₉₄₀₀₂ were acquired from Calbiochem (La Jolla, CA). Sodium amobarbital was purchased from Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN). Tris base, phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, affinity-purified rabbit antimouse IgG, and BSA (fraction V) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). RPMI 1640 and reagents for cell culture were purchased from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Sense (5'-ACC CAC TCC TAT CCC G-3') (IRS-1_{SO}) and antisense (5'-CGG GAT AGG AGT GGG T-3') (IRS-1_{ASO}) phosphorthioate oligonucleotides specific for IRS-1 were produced by Invitrogen (25-27). Sequence was selected among three unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to block IRS-1 protein expression as evaluated by immunoblot of total protein extracts of thymus tissue using specific anti-IRS-1 antibodies. The oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the Rattus norvegicus IRS-1 coding sequence (NCBI/NM 012969). The nucleosome ELISA kit (catalog no. QIA25) was acquired from Oncogene Research Products (Boston, MA), and the flow cytometry annexin-V apoptosis detection kit (Apoptest K2350) was purchased from Dako Corp. (Carpinteria, CA). The leptin ELISA kit was purchased from Linco Research Inc. (St. Charles, MO). TRIzol reagent was purchased from Invitrogen, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase was from CLONTECH (Mountain View, CA).

Protocols for acute treatment with leptin and protein analysis by immunoprecipitation and immunoblotting

Rats were anesthetized by ip injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight) and submitted to the surgical procedure as soon as the anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed, and *in vivo* stimulation was obtained by the injection of 400 μ l saline (0.9% NaCl), insulin (10⁻⁶ M), or leptin (10⁻⁶, 10⁻⁸, or 10⁻¹⁰ M). After the predetermined elapsed time, the thymus was removed after a thoracotomy. The tissue was minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer [1% Triton X-100 and 100 mM Tris (pH 7.4) con-

taining 100 mm sodium pyrophosphate, 100 mm sodium fluoride, 10 mm EDTA, 10 mм sodium vanadate, 2 mм phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg aprotinin/ml] at 4 C with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec. The extracts were centrifuged at 9000 imesg and 4 C in a 70.1 Ti rotor (Beckman, Palo Alto, CA) for 20 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for immunoprecipitation with anti-JAK-2, -STAT-3, or -IRS-1 antibodies, and the technical procedures were performed as previously described (28, 29). Protein quantification in the supernatants was determined by the Bradford method (30). Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with antibodies antiphosphotyrosine. In direct immunoblotting experiments, total protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and antiphospho-(Ser473) Akt and anti-IRS-1 antibodies used for blotting. Visualization of specific protein bands was performed by incubating membranes with ¹²⁵ I-protein A followed by exposure to x-ray films (Kodak, Rochester, NY). In some experiments, the rats were pretreated with 100 μ l AG₄₉₀ 10⁻⁴ M or 400 μ l LY₂₉₄₀₀₂ 5.0 μ M and then submitted to acute treatment with leptin.

Protocols for chronic treatment with leptin and evaluation of apoptosis

For these experiments, the rats were randomly divided into eight groups and treated by ip injection according to one of the following protocols: 400 μ l saline; 400 μ l leptin (10⁻⁶ M); 100 μ l AG ₄₉₀ (10⁻⁴ M) + 400 μ l leptin; 400 μ l LY₂₉₄₀₀₂ (5 μ M) + 400 μ l leptin; 100 μ l IRS-1_{SO} $(4.0 \text{ nmol}) + 400 \mu \text{l leptin; } 100 \mu \text{l IRS-1}_{SO} (4.0 \text{ nmol}) + 400 \mu \text{l saline}$ solution; 100 μ l IRS-1_{ASO} (4.0 nmol) + 400 μ l leptin; or 100 μ l IRS-1_{ASO} $(4.0 \text{ nmol}) + 400 \mu \text{l}$ saline solution. The treatment consisted of two doses each day for 3 consecutive days. On the morning of the fourth day, the animals were anesthetized as described earlier, and the thymus was removed by thoracotomy. Suspensions of thymocytes in PBS/2% fetal calf serum (Cult Lab, Campinas, Brazil) were obtained using a Potter glass and used for apoptosis detection by flow cytometry. In some experiments fragments of thymus were used for nucleosome determination by ELISA. To evaluate the efficiency of the treatments with the three inhibitors to maintain continuous inhibition upon their respective targets, rats treated according to the protocols above were used 1.0, 4.0, 8.0, or 12.0 h after the dose in the morning of the third day of treatment to determine JAK-2, STAT-3, and IRS-1 tyrosine phosphorylation after AG_{490} treatment; Akt serine phosphorylation after LY_{294002} treatment; and IRS-1 protein expression after IRS-1_{ASO} treatment.

Short-term culture of thymocytes

To prepare isolated thymocytes, rats were anesthetized; thymuses were obtained and gently passed through a steel net. Cells were washed with and resuspended in ice-cold RPMI 1640 containing penicillin-streptomycin, t-glutamine, and 0.5% fetal calf serum. Twenty-four groups of 5.0 × 10⁶ cells were placed in 2.0-ml culture dishes and treated with leptin (10^{-8} M), AG₄₉₀ (10^{-6} M) + leptin (10^{-8} M), LY₂₉₄₀₀₂ (10^{-8} M) + leptin (10^{-8} M), or IRS-1_{ASO} (4.0 nmol) + leptin (10^{-8} M), or IRS-1_{ASO} (4.0 nmol) alone. Apoptosis was evaluated after 12 h using the ELISA nucleosome method.

Determination of blood leptin levels on a time course after exogenous leptin injection

Forty rats were randomly divided into five groups of eight rats each. The first group received no treatment. The second group was subdivided into two groups of four rats; the animals were anesthetized and received a dose of 400 μ l leptin 10⁻⁶ M or an equal volume of saline through the cava vein. Blood was collected from the tail vein at 3.0 min. The third, fourth, and fifth groups were also subdivided into groups of four rats and treated with an ip injection of 400 μ l leptin 10⁻⁶ M or an equal volume of saline, and blood was collected from the tail vein at 3.0 min. The third, fourth, and fifth groups were also subdivided into groups of four rats and treated with an ip injection of 400 μ l leptin 10⁻⁶ M or an equal volume of saline, and blood was collected from the tail vein at 1, 6, and 12 h, respectively. The rats were anesthetized before blood collection. Leptin was determined in the samples using a commercially available ELISA kit following the protocol suggested by the manufacturer (Linco Research).
Detection of apoptosis by flow cytometry

The thymocytes, prepared as described above, were tested for apoptosis using the annexin-V technique (31). Ninety-six microliters of a cell suspension at the final concentration of 1.0×10^6 cells/ml were incubated with 1.0 μ l FITC-conjugated annexin-V and 2.5 μ l propidium iodide, as suggested by the manufacturer. Cells were kept on ice and incubated in the dark for 10 min before diluting the cells to 250 μ l with binding buffer and analyzing using a FACScalibur flow cytometry analyzer and CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). A total of 10,000 cells were acquired. Unlabeled cells suspended in PBS were used as a negative control and for the determination of gates to be used in the apoptosis assays. Apoptotic cells were measured in the annexin-V-positive propidium iodide-negative quadrant and divided by the total number of cells in the gated region.

Detection of apoptosis by nucleosome ELISA

Rats were treated by ip injection as described for the chronic protocol with saline, leptin, AG_{490} , IRS-1_{ASO}, and/or IRS-1_{SO}. On the morning of the fourth day, the animals were anesthetized, and the thymus was removed by thoracotomy. Isolated thymocytes were treated as described above and used 12 h after treatment. Cells were lysed and centrifuged, and cytoplasmatic histone-associated DNA fragments were determined in the supernatant by ELISA (32), as suggested by the manufacturer.

Flow cytometry for determination of cell markers

Rats were anesthetized as described earlier and the thymus removed by thoracotomy. Suspensions $(1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml})$ of thymocytes in PBS/2% fetal bovine serum were obtained using a Potter glass. Samples of 100 μ l of the freshly prepared cell suspensions were incubated for 20 min in the dark, at room temperature, with 10 μ l of the following panels of antibodies: CD3FITC/CD4RPE/CD8RPE-Cy5 or CD4RPE/CD8RPE-Cy5/ObR (the ObR antibody was sc-8325 from Santa Cruz). Thereafter the cells were washed and incubated with FITC-conjugated secondary antibody. A three-color analysis was made using a FACScalibur, and the CellQuest software (Becton Dickinson) was used for quantitative analysis. In addition a cell volume analysis was used to evaluate the expression of cell markers in maturating cells.

RT-PCR

Total RNA was extracted from isolated thymocytes ($\sim 10^7$ cells/animal) and hypothalami of Wistar rats, Lep^{db} (db/db), and C57BLKS/J mice using TRIzol reagent according to the instructions of the manufacturer. Reverse transcription (RT) was carried out using 1.0 µg total RNA using SuperScript reverse transcriptase (200 U/ μ l) and oligo (dT) (50 mm) in a 30- μ l reaction volume (5 × RT buffer, 10 mm deoxynucleotide triphosphate, and $40 \text{ U}/\mu \text{l}$ Rnase-free inhibitor). The RTs involved a 50-min incubation at 42 C and a 15-min incubation at 70 C. The PCR products were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and visualized by excitation under UV light. Photodocumentation was performed using the Nucleovision system (NucleoTech, San Mateo, CA) and band quantification was performed using the Gel Expert software (NucleoTech). First-strand cDNA was PCR amplified using a primer from the transmembrane region of the ObR sequence (NCBI/NM 012596) opposed with two primers capable of determining the short or the long forms of the receptor. The sequence of the transmembrane region primer was 5'-CAG GGC TGT ATG TCA TTG-3'; the sequence of the primer for the short form was 5'-GTG CCC AGG AAC AAT TCT-3'; and the sequence of the primer for the long form was 5'-CCA GAG AAG TTA GCA CTG-3'. Control amplifications were carried out in the presence of RNA template and polymerase but in the absence of reverse transcriptase. The β -actin mRNA was amplified in all samples as control for quality and amount of RNA using the primers 5'-CGT AAA GAC CTC TAT TGC CAA-3' and 5'-AGC CAT GCC AAA TGT GTC AT-3', based on the sequence NCBI/NM 031144. Reactions were carried out at 94 C for 2 min, followed by 50 cycles, each consisting of 30 sec at 92 C, 30 sec at 50 C, and 1 min at 72 C, followed by single-cycle extension for 10 min at 72 C. β-Actin was amplified by a similar protocol except that the reaction was limited to 30 cycles. This method, with minor modifications, has been used previously (33).

Immunohistochemistry

Thymus fragments were obtained from three control rats. Hydrated, 5- μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue were stained by the double-staining fluorescence method. Sections were incubated for 30 min with 2% normal rabbit or normal goat sera at room temperature and then exposed for 12 h in a moister chamber at 4 C to the panel of primary antibodies against JAK-2 (1:20)/ObR (1:20), STAT-3 (1:20)/ObR (1:20), or Akt (1:50)/ObR (1:20) followed by incubation with FITC-conjugated and rhodamine-conjugated secondary antibodies. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510; Zeiss, New York, NY). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. Complete description of the method has been published elsewhere (25).

Statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean \pm SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD). Data were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t* test or repeatmeasures ANOVA (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate, comparing experimental and control groups. The level of significance was set at *P* < 0.05.

Results

Time course of blood leptin levels after exogenous leptin administration

The treatment of rats with a single dose of exogenous leptin promoted a variation of blood levels of the hormone that reached a peak at 3.0 min and returned to basal levels after 12 h (Table 1).

Leptin inhibits thymic apoptosis

The treatment of rats with two daily doses of leptin (10^{-6} M) promoted a significant reduction of apoptosis of thymic cells as determined by the nucleosome-ELISA detection method (~30% inhibition of apoptosis, P < 0.05) (Fig. 1A) and the annexin-V/flow cytometry method (~15% inhibition of apoptosis, P < 0.05) (Fig. 1B).

Leptin activates JAK-2/STAT-3 and IRS-1/Akt signaling in thymus

The acute injection of a single dose of leptin (10^{-6} M) induced the rapid tyrosine phosphorylation of the intracellular kinase JAK-2 in thymic tissue (Fig. 2A, first blot). This effect was detected at 1.0 min and lasted for at least 5.0 min. To evaluate the dose dependency of this phenomenon, rats were acutely treated with a single dose of leptin $(10^{-6}, 10^{-8}, \text{ or } 10^{-10} \text{ M})$, and the thymus was obtained after 3 min (data not shown). The highest tyrosine phosphorylation of JAK-2 was obtained with the dose of 10^{-6} M (3.5-fold increase *vs.*

TABLE 1. Time course of blood leptin levels after exogenous

 leptin administration

	0.0 min	3.0 min	1.0 h	6.0 h	12.0 h
Saline treated	2.33	2.12	2.52	2.02	2.27
$\text{SEM}(\pm)$	0.33	0.12	0.54	0.45	0.44
Leptin treated	2.32	52.13^{a}	29.88^{a}	3.34^{a}	2.89
$sem(\pm)$	0.23	4.56	3.12	0.25	0.40

n = 4.

^{*a*} P < 0.05 vs. saline treated.



FIG. 1. Leptin inhibits baseline apoptosis in thymus. Apoptosis of thymic cells was evaluated by determination of nucleosome formation by ELISA (A) and determination of annexin-V expression by flow cytometry (B); gates were determined by evaluating thymic cell population in a nonlabeled flow cytometry analysis (B, *upper graph*). Methods are described in *Materials and Methods*. In all experiments, n = 6; *, P < 0.05. ASU, Arbitrary scanning units.

control, P < 0.05), although the doses of 10^{-8} M (2.8-fold increase *vs.* control, P < 0.05) and 10^{-10} M (2.3-fold increase *vs.* control, P < 0.05) were also able to induce activation of JAK-2. The acute treatment with leptin also promoted the tyrosine phosphorylation of STAT-3 beginning at 1.0 min, reaching a peak at 3.0 min, and lasting for at least 5.0 min (Fig. 2A, second blot). To evaluate the ability of leptin to activate the IRS-1/Akt signaling pathway, rats were treated with a single dose of leptin (10^{-6} M), and after 2.0 (IRS-1) or 5.0 (Akt) min, the thymus was obtained. As depicted in Fig. 2A (two blots at the bottom), leptin promoted a significant increase in tyrosine phosphorylation of IRS-1 and (Ser⁴⁷³) phosphorylation of Akt. The magnitude of the leptin stimulus was somewhat smaller than the insulin effect on the same signal transducers.

ObR is coexpressed with JAK-2, STAT-3, and Akt in most thymic cells

To evaluate the distribution and cell-specific expression of the ObR, we used three distinct methods. In Fig. 2B, the coexpression of ObR with JAK-2 (upper panels), STAT-3 (middle panels), and Akt (lower panels) is seen by doublestaining confocal microscopy in most cells of the paraformaldehyde-fixed thymic sections. In fact, most cells of thymic cortex and medulla stained strongly for all the three antigens tested. In addition, the expressions of the long and short forms of the ObR were evaluated in isolated thymocytes of Wistar rats in parallel with long form defective Lep^{db} mouse and its strain control, C57BLKS/J. As shown in Fig. 2C, the short form of the ObR can be detected in hypothalamus and thymocytes of all strains evaluated, whereas the long form can be detected only in hypothalamus and thymocytes of Wistar rats and C57BLKS/J mice. Moreover, by flow cytometry, we observed that the predominant cell population of the thymus, the CD4⁺/CD8⁺ double-positive cells, stained consistently for the ObR (Fig. 2D). Also, it was observed the presence of a distinct pattern of expression of the antigens in different cell subsets. Therefore, we reanalyzed the CD3-positive thymocytes now subdivided according to the cell volume, a parameter that reflects cell maturation. As depicted in Fig. 3, there is a progressive reduction of relative ObR expression in $CD4^{\overline{+}}/\overline{CD8^{+}}$ double-positive cells during the process of maturation.

Inhibition of IRS-1 and Akt but not JAK-2 restores leptininhibited thymic apoptosis

To evaluate the participation of the JAK/STAT and IRS-1/Akt signaling pathways in the leptin-induced inhibition of apoptosis in thymus, we used the inhibitor of JAK tyrosine kinase activity, AG_{490} (34, 35); the inhibitor of IRS-1 expression, IRS-1_{ASO} (27); and the inhibitor of PI 3-kinase activity, LY_{294002} (36). None of the treatment regimens with the inhibitors promoted modifications in health or behavior of the rats. The effectiveness of AG_{490} was tested by pretreating rats with 100 μ l of a 10⁻⁴ M AG₄₉₀ solution followed, after 30 min, by an injection with leptin. As depicted in Fig. 4A, AG₄₉₀ significantly reduced the leptin-induced tyrosine phosphorylation of JAK-2. To evaluate the efficiency of IRS-1_{ASO}, rats were treated for 3 d with two daily doses of IRS-1_{ASO} (or the sense control, IRS- 1_{SO}) (4.0 nmol). On the morning of the fourth day, the thymus was obtained and total protein extracts were used in regular immunoblotting experiments. As shown in Fig. 4B, IRS-1_{ASO}, but not IRS-1_{SO}, almost completely abolished the expression of IRS-1 in thymus. Finally, to evaluate the effectiveness of LY₂₉₄₀₀₂, rats were pretreated with a dose of LY₂₉₄₀₀₂ (400 μ l, 5.0 μ M) and then treated with leptin (after 30 min). After 5 min the thymus was obtained and used in regular immunoblot experiments to evaluate the (Ser⁴⁷³) phosphorylation of Akt. As shown in Fig. 4C, LY₂₉₄₀₀₂ significantly inhibited leptin-induced activation of Akt. In addition, all three inhibitors were effective to maintain inhibition on their respective targets during the interval between doses (Fig. 4, D-F).



Downloaded from endo.endojournals.org on October 18, 2006



FIG. 3. *ObR* expression reduces during thymocyte maturation. Thymocytes were divided according to cell volume in groups R1-R3 (upper graph, numbers represent the relative amount of cells in each group). CD3-positive cells from each group were evaluated for CD4, CD8, and ObR expression by flow cytometry. In all experiments n = 6. Numbers within the graphs represent the proportion of double-positive cells in each group. Numbers in the right-hand margin represent the proportion of triple-positive cells in each group. SSC-Height, Side scatter-height; FSC-Height, forward scatter height.

Next, we evaluated the outcomes of the treatment of rats with each signal transduction inhibitor on the effect of leptin to inhibit thymic apoptosis. Figure 5 (A–C) shows that inhibition of IRS-1 expression by IRS-1_{ASO} and inhibition of PI 3-kinase activity by LY₂₉₄₀₀₂ were both able to restore baseline apoptosis levels, as detected by flow cytometry and nucleosome ELISA. The treatment with AG₄₉₀, however, resulted in no modification of the leptin-induced inhibition of

FIG. 2. Leptin activates signal transduction in thymus. A, Total protein extracts of thymus were used in immunoprecipitation (IP) (using JAK-2, STAT-3, or IRS-1 antibodies) and immunoblot (IB) [using phosphotyrosine (pY) antibodies in the anti-JAK-2, -STAT-3, and -IRS-1 immunoprecipitated samples or anti-phospho-(Ser⁴⁷³) Akt, in nonpreimmunoprecipitated samples] assays to evaluate leptin signal transduction. Rats were anesthetized and acutely treated with leptin (Lep; 10^{-6} M) or insulin (Ins; 10^{-6} M). Thymuses were obtained after the elapsed times as depicted in the figure (anti-JAK-2 and anti-STAT-3 experiments) or after 2.0 min for IRS-1 experiments and 5.0 min for Akt experiments. B, Coexpression of ObR with JAK-2, STAT-3, and Akt was determined by double-staining confocal microscopy. C, The expression of the short (ObR_{short}) and long (ObR_{long}) forms of the leptin receptor were determined in hypothalami and thymocytes of Wistar rats (W), Lep^{db}, or C57BLKS/J mice (C57) by RT PCR. The β -actin expression was used as control. D, Coexpression of ObR with CD4 and CD8; and evaluation of lymphocyte subpopulations (CD4⁺/CD3⁺) in thymus was performed by flow cytometry. *Numbers within the graphs* represent the proportion of double-positive cells in each group. *Numbers in the right-hand margin* represent the proportion of triple-positive cells in each group. In A, n = 4; *, P < 0.05 vs. leptin (-)/insulin (-); in B, the figures are representative of six independent experiments; in C the figures are representative of four independent experiments; in D, figures are representative of six independent experiments. SSC-Height, Side scatter height; FSC-Height, forward scatter height. ASU, Arbitrary scanning units.



FIG. 4. Effects of signal transduction inhibitors. A, Rats were anesthetized and treated with saline or AG_{490} (100 µl, 10^{-4} M). After 30 min the animals received either saline or leptin (Lep; 400 µl, 10^{-6} M). After 1.0 min, the thymus was obtained and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-JAK-2 antibodies. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted (IB) with antiphosphotyrosine (pY) antibodies. B, Rats were treated during 3 d with IRS-1_{ASO} (two daily doses of 4.0 nmol), and on the morning of the fourth day, the thymus was obtained, and total protein extracts were submitted to separation by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with anti-IRS-1 antibodies. C, Rats were anesthetized and treated with saline or LY₂₉₄₀₀₂ (400 µl, 5.0 µM). After 30 min the animals received either saline or leptin (400 µl, 10^{-6} M). After 5.0 min the thymus was obtained and submitted to protein separation by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes, and immunoblotting (IB) with anti-phospho (Ser⁴⁷³) Akt antibodies. D–F, Rats were treated for 3 d with two daily doses of AG₄₉₀ (100 µl, 10^{-4} M), LY₂₉₄₀₀₂ (400 µl, 5.0 µM), IRS-1_{ASO} (4.0 nmol), or saline. One, 4, 8, or 12 h after the dose in the morning of the third day, rats were anesthetized and received an acute dose of saline or leptin (400 µl, 10^{-6} M). After 1.0 (JAK-2 and STAT-3, D), 2.0 (IRS-1, D and F), or 5.0 (Akt, E) min, thymuses were obtained and used in immunoprecipitation and immunoblotting experiments to determine tyrosine phosphorylation of JAK-2, STAT-3, and IRS-1 (D), serine phosphorylation of Akt (E), or the protein amount of IRS-1 (F). In all experiments n = 4, *, P < 0.05 vs. control (Ctr); §, P < 0.05 vs. leptin treated (A and C). ASU, Arbitrary scanning units; SO, sense oligonucleotide; ASO, antisense oligonucleotide.

apoptosis in the thymus, as shown by flow cytometry (Fig. 5, A and B) and nucleosome detection ELISA (Fig. 5C).

Finally, using freshly isolated thymocytes, we confirmed the results obtained in living rats observing that inhibition of PI 3-kinase activity by LY_{294002} and inhibition of IRS-1 expression by IRS-1_{ASO} were both able to suppress the effect of leptin to inhibit apoptosis (Fig. 6), whereas the inhibition of JAK-2 activity by AG₄₉₀ exerted no effect on leptin-induced inhibition of apoptosis (Fig. 6).

Discussion

In recent years a series of studies have shown the participation of leptin in the modulation of several immunological functions (2). In particular, the role played by leptin in the control of apoptosis of cells of the immune system has been proposed to contribute to the defective immune response of nutrient-deprived individuals and in the pathogenesis of autoimmune diseases (2, 22, 23). Here we evaluated the participation of JAK-2/STAT-3 and IRS-1/PI 3-kinase/Akt signaling pathways in the modulation of thymic apoptosis by leptin.

To optimize the methods for acute and chronic treatment with exogenous leptin, we performed a time-course evaluation of blood leptin levels after the injection of a single dose of the hormone. For the time point of 3 min, exogenous leptin was injected through the cava vein to reproduce the acute treatment protocol used in this study. For the time points of 1, 6, and 12 h, leptin was delivered by ip injection as in the chronic protocol. The treatment with exogenous leptin promoted a rapid and significant increase of blood leptin levels, which lasted for at least 6 h. Because during the chronic treatment we used two daily doses of the hormone, we believe that the rats were hyperleptinemic during most of the experimental period.

Initially we showed, using two distinct methods, that leptin inhibits baseline thymic apoptosis of young rats by 15– 30%. These numbers are in agreement with a previous evaluation of the leptin effect on the rate of apoptosis in thymus



FIG. 5. Effect of signal transduction inhibition on leptin-induced apoptosis in thymus of living rats. Apoptosis of thymic cells was evaluated by determination of annexin-V by flow cytometry (A and B) and nucleosome formation by ELISA (C). Methods are described in *Materials and Methods*. In all experiments n = 6; *, P < 0.05 vs. saline (Sal); §, P < 0.05 vs. leptin (Lep).

(22). We next evaluated the capacity of leptin to induce the activation of JAK-2/STAT-3 and IRS-1/PI 3-kinase/Akt signaling in thymus. Lymphocytes, particularly CD4⁺ cells, are known to express the long form of the leptin receptor (4). However, no study so far has evaluated the expression of the ObR in thymus and its coexpression with proteins involved in transducing the leptin signal. Here we show that most cells of the thymus, including the majority of the $CD4^+/CD8^+$ thymocytes, express the ObR. When we evaluated ObR expression in thymocytes previously separated by cell size, we observed that during the process of maturation, there is a progressive reduction of relative ObR expression. This fact has never been reported before and may have an important implication for the role of leptin in the modulation of immune function during the earliest steps of life. Next, we observed that the ObR colocalizes with JAK-2, STAT-3, and Akt in most of these cells. When the rats were treated with leptin, both JAK-2/STAT-3 and IRS-1/Akt signaling pathways were activated. Thus, we can conclude that, in the thymus of young rats, the ObR is expressed in virtually all cells and may be activated by leptin, generating a signal that is transduced through the classical leptin signaling pathway (JAK/STAT) and at least one alternative pathway (IRS-1/Akt). Because leptin can activate JAK-2/STAT-3 signaling only if the long form of the receptor is present (37), we can conclude that at least a fraction of the ObR detected in thymus is composed of the long form of the receptor. This was further explored by RT-PCR that revealed the expression of both the long and the short forms of the ObR in thymus and hypothalamus of Wistar rats and C57BLKS/J mice but only the short form in the same tissues of Lep^{db} mice.

To evaluate the participation of each signaling pathway (JAK/STAT and IRS-1/PI 3-kinase/Akt) in the leptin-induced inhibition of thymic apoptosis, we used distinct inhibitors of signal transduction. Initially the effectiveness of the inhibitors was tested by immunoblot. Once the inhibition



FIG. 6. Effect of signal transduction inhibition on leptin-induced apoptosis in isolated thymocytes. Apoptosis of isolated thymocytes was evaluated by determination of nucleosome formation by ELISA. Methods are described in *Materials and Methods*. In all experiments n = 4; *, P < 0.05 vs. saline (Sal); §, P < 0.05 vs. leptin (Lep).

of JAK signaling, IRS-1 expression, and PI 3-kinase activity was assured, rats were submitted to different treatment protocols to test the participation of each signaling cascade in the control of apoptosis. Using these approaches, we found that the inhibition of JAK signaling did not interfere with the capacity of leptin to inhibit apoptosis. However, inhibition of IRS-1 expression and inhibition of PI 3-kinase activity were both equally effective in abolishing the inhibitory effect of leptin on apoptosis in thymus.

Activation of Akt by an array of different signals has been known for a long time to exert an important effect on the control of apoptosis in different cell types (38). Activated Akt catalyzes the phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad, inhibiting its activity and therefore inhibiting apoptosis (39). With respect to the antiapoptotic effects of leptin, the participation of Akt has been reported in neuroblastoma cells (40), liver (41), and prostate cancer cells (42). Conversely, no study has provided undisputed evidence for the requirement of the JAK/STAT signaling pathway in leptin-induced inhibition of apoptosis. In fact, according to Dunn *et al.* (14), leptin, acting in thymocytes through the JAK-2/STAT-3 pathway, regulates negative feedback of the signal but not thymic apoptosis.

The aim of this study was to evaluate the effect of exogenous leptin on the basal rate of thymic apoptosis during early steps of life. However, because most of the experiments were performed in living animals, we cannot discard the possibility that some of the effects herein described were due to indirect mechanisms. One possible indirect mechanism that could play a role in this scenario is the production of adrenocortical hormones. Glucocorticoids are well known for their role in the induction of T cell apoptosis (43). Because leptin is capable of inhibiting adrenocortical function (44), one could argue that defective glucocorticoid action in thymus of leptin-treated rats could explain the inhibition of apoptosis described here. However, there are at least three points that may oppose this possibility. The first one refers to the fact that glucocorticoid-induced T cell apoptosis, which depends on the mitochondria/Apaf-1/caspase-9

pathway (45, 46), cannot be inhibited by the activation of PI 3-kinase/Akt signaling (47). The second point refers to the fact that previous reports have observed the antiapoptotic effects of leptin in isolated cell systems (4, 48), thus occurring independently of the systemic effects of the hormone on adrenocortical function. Finally, in at least one report, it was shown that exogenous leptin is capable of overcoming the proapoptotic effects of glucocorticoids (48). At this time, we cannot reject the possibility of the interaction of leptin with other mechanisms involved in the control of thymic cellular apoptosis. In the near future, it will be of great interest to evaluate whether leptin is able to modulate any other mechanism involved in the control of thymocyte survival and also determine whether leptin inhibits specific types of programed cell death in thymus, such as death by neglect or negative selection.

Thus, taking together the results of the present study and the data of the literature, we conclude that leptin exerts an antiapoptotic effect in the thymus of young rats. This effect is mediated by an IRS-1/PI 3-kinase signaling cascade and is independent on JAK activation. Because the ObR has no intrinsic tyrosine kinase activity, we suspect that an intracellular kinase, other than JAK family members, acts as an intermediary between the leptin receptor and the docking protein IRS-1.

Acknowledgments

We thank Dr. N. Conran for English grammar editing.

Received February 22, 2006. Accepted July 17, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Licio A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas-State University of Campinas, 13083-970, Campinas SP, Brazil. E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Disclosure summary: all authors have nothing to declare.

References

- Friedman JM 2002 The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutr Rev 60:S1–S14; discussion S68–S84, S85–S87
- La Cava A, Matarese G 2004 The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol 4:371–379
- Flier JS 2004 Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 116:337–350
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI 1998 Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 394:897–901
- Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V 2000 Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. Cell Immunol 199:15–24
- Źarkesh-Esfahani H, Pockley AG, Wu Z, Hellewell PG, Weetman AP, Ross RJ 2004 Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-α. J Immunol 172:1809–1814
- Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ, Ross RJ 2001 High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. J Immunol 167:4593– 4599
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S 2002 Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest 110:1093–1103
- Matarese G, Sanna V, Lechler RI, Sarvetnick N, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A 2002 Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. Diabetes 51:1356–1361
- 10. Tartaglia LA 1997 The leptin receptor. J Biol Chem 272:6093-6096

Mansour et al. • Leptin and Apoptosis in Thymus

- 11. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J 2003 The ins and outs of leptin receptor activation. FEBS Lett 546:45–50
- Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers Jr MG 2002 Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. J Biol Chem 277:41547–41555
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS 1998 Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. Endocrinology 139:3485–3491
- Dunn SL, Bjornholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers Jr MG 2005 Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. Mol Endocrinol 19:925–938
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers Jr MG 2000 Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 275:14563–14572
- Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G 2002 Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. Diabetes 51:168–173
- Duan C, Li M, Rui L 2004 SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. J Biol Chem 279:43684–43691
- Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ 2003 Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. Biol Chem 384:151–159
- Matarese G, La Cava A 2004 The intricate interface between immune system and metabolism. Trends Immunol 25:193–200
- 20. Prentice AM 1999 The thymus: a barometer of malnutrition. Br J Nutr 81: 345–347
- Pallaro AN, Roux ME, Slobodianik NH 2001 Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. Nutrition 17: 724–728
- Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR 1999 Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. J Clin Invest 104:1051–1059
- Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C 2001 Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. FASEB J 15:2565–2571
- Ferraroni NR, Geloneze B, Mansour E, Perroud AP, Muscelli EO, Tambascia M, de Lima Zollner R, Velloso LA 2005 Severe hypoleptinaemia associated with insulin resistance in patients with common variable immunodeficiency. Clin Endocrinol (Oxf) 63:63–65
- Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhaes EC, Velloso LA 2002 Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. FEBS Lett 531:437–442
- Araujo ÉP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA, Carneiro EM 2004 Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. J Endocrinol 181:25–38
- Araujo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA 2005 Short-term *in vivo* inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. Endocrinology 146:1428–1437
- Velloso LA, Kampe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlsson FA 1993 Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. J Clin Invest 91:2084–2090
- 29. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA 2002 Endurance training improves re-

sponsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. Eur J Endocrinol 147:149–157

- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254
- Oliveira GB, Pereira FG, Metze K, Lorand-Metze I 2001 Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. Cytometry 46:329–335
- 32. Trumper A, Trumper K, Horsch D 2002 Mechanisms of mitogenic and antiapoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in β (INS-1)-cells. J Endocrinol 174:233–246
- Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH 1996 A novel leptin receptor isoform in rat. FEBS Lett 392:87–90
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM 1996 Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. Nature 379:645–648
- Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL 1999 JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. J Immunol 162:3897–3904
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF 1994 A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4one (LY294002). J Biol Chem 269:5241–5248
- Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, 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 16:859–872
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME 1999 Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 13:2905–2927
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME 1997 Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91:231–241
- Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA 2004 Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. Endocrinology 145:4103– 4112
- 41. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA 2004 Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. FASEB J 18:1612–1614
- Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, Jackson B, Vangilder R, Hileman SM, Vona-Davis LC 2004 Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. J Surg Res 118:71–82
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS 2000 Glucocorticoids in T cell development and function. Annu Rev Immunol 18:309–345
- 44. Walker CD, Salzmann C, Long H, Otis M, Roberge C, Gallo-Payet N 2004 Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. Endocr Res 30:837–844
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA 1998 Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell 94:325–337
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW 1998 Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell 94:739–750
- Jamieson CÅ, Yamamoto KR 2000 Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling. Proc Natl Acad Sci USA 97:7319–7324
- Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K, Mimori T 2002 Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. Clin Exp Immunol 128:21–26

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (http://www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.

Erratas:

Na legenda da Figura 5 (anexo) a frase correta é: Effect of signal trnasduction inhibition on leptin-induced inhibition of apoptosis in thymus of living rasts.

Na legenda da Figura 6 (anexo) a frase correta é: Effect of signal transduction inhibition on leptin-induced inhibition of apoptosis in isolated thymocytes.