

## **Adipocinas em transplante experimental: estudo da interação entre a leptina e o desenvolvimento de tolerância imunológica**

*Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira*

---

**Abstract:** Leptin, due to its action in the metabolism regulation, is a mediator of both immune and neuroendocrine responses. Fitting the role of leptin favoring Th1 polarization and the proliferation of regulatory T cells it is feasible that the lack of this adipokine may favor a state of immune regulation that might lead to a prolonged allograft survival. Owing to this lack of knowledge, our aim is to study the importance of leptin in the modulation of skin allograft immune responses and its role in the differentiation of Th17 and regulatory T cells.

### **INTRODUÇÃO:**

A obesidade, um dos problemas mais comuns da saúde pública nos dias atuais, sendo recentemente divulgado que aproximadamente 50% da população nacional está com sobrepeso, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de diversas patologias, como arteriosclerose e diabetes [1,2]. Além da associação entre obesidade e algumas doenças, importantes interações existem entre o metabolismo e o sistema imune, sendo essas interações orquestradas por uma complexa rede de fatores solúveis derivados tanto de células do sistema imune como por células do tecido adiposo. Dentre esses fatores a leptina tem despertado grande interesse na comunidade científica.

A leptina, devido a sua ação na regulação do metabolismo, é um mediador tanto de respostas neuroendócrinas como imunes [3]. Na literatura não há estudos de como a ausência da leptina e/ou sua modulação poderia agir no contexto do transplante. Uma polarização para um perfil Th2, na ausência da leptina ou por meio de sua neutralização, poderia auxiliar no estabelecimento de um estado de não agressão ao enxerto e fornecer subsídios que auxiliem no entendimento de como a resposta aloígena é regulada em indivíduos obesos. O papel das células Th17 no processo de rejeição do enxerto também não foi bem avaliado e inexistem dados na literatura de como a leptina poderia modular a diferenciação dessas células, uma vez que, como a IL-6, ativa STAT3, podendo modular a ontogenia de ambos os tipos celulares. Nesse sentido, é provável que a leptina possa inibir a diferenciação de células T reguladoras, favorecendo a diferenciação de células Th17.

Devido às ações da leptina no favorecimento de uma polarização Th1 e na proliferação de células T reguladoras é provável que a ausência dessa adipocina favoreça um estado de imunorregulação que tenha como desfecho um aumento da sobrevida do enxerto. Frente a essas lacunas de conhecimento nós propomos a estudar a importância da leptina na modulação da resposta imunológica em resposta ao transplante experimental de pele, seu papel na diferenciação de células T reguladoras/Th17 e sua interação com a regulação da expressão e função da HO-1 em modelos animais. Visamos contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos na imunorregulação da leptina e sua participação na resposta aloimune.

### **JUSTIFICATIVA E OBJETIVO**

A indução de tolerância em transplante de órgãos sólidos ainda representa um grande desafio na prática clínica. Dados experimentais demonstram que a tolerância pode ser atingida usando células com potencial regulador. Devido às ações da leptina no favorecimento de uma polarização Th1 e na proliferação de células T reguladoras é provável que a ausência dessa adipocina favoreça um estado de imunorregulação que tenha como desfecho um aumento da sobrevida do enxerto. Nós propomos a estudar o papel da leptina na sobrevivência do enxerto de pele e na geração/manutenção de células com potencial regulador e como a leptina pode modular a diferenciação de células T reguladoras e Th17. Nós daremos também especial atenção à interação leptina/resposta citoprotetora (HO-1) no



Ajudando as  
pessoas a viverem  
vidas saudáveis

desenvolvimento da resposta imune no transplante. Nosso objetivo é avaliar a importância da leptina na modulação da resposta imunológica em resposta ao transplante experimental de pele, seu papel na diferenciação de células T reguladoras/Th17 e sua interação com a regulação da expressão e função da HO-1 em modelos animais. Visamos contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos na imunoregulação da leptina e sua participação na resposta aloimune.

## **METODOLOGIA**

**Animais:** Os animais serão divididos em grupos para responder aos objetivos propostos: serão usados camundongos com o background H-2b e H-2k, isogênicos. Os seguintes animais serão utilizados: C57Bl/6J, C57Bl/6Foxp3gfp, CBA, C57Bl/6J-ob/ob-/-, C57Bl/6J-db/db-/- . Os animais serão fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da USP, do CEMIB/UNICAMP e da UNIFESP.

**Avaliação da ativação da via Leptina/Stat3/Akt por PhosFlow:** A fosforilação de STAT3 e de Akt serão avaliadas com os anticorpos anti-STAT3 (p705) e anti-Akt (pS473) (BD Biosciences) com os tampões PhosFlow Perm Buffer III, PhosFlow Fixation Buffer and Stain Buffer (BD Biosciences), conforme descrito pelo fabricante.

**Cultura mista de linfócitos:** Serão utilizadas como células respondedores, esplenócitos de animais receptores marcados com CFSE cultivados com esplenócitos de seus respectivos doadores irradiadas (5000 rads) e a proliferação avaliada por citometria de Fluxo . As citocinas presentes no sobrenadante serão dosadas por Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD Biosciences).

**Ensaio de diferenciação:** Células T naives de animais ob/ob e db/db serão primeiramente separadas por beads para obtenção de células T CD4+ com o Anti-Mouse CD4 Magnetic Particles (BD Bioscience) e, posteriormente, uma população CD4+CD62L+Foxp3gfp- sera separada por sorting usando o FACS Aria (BD) e utilizadas para protocolos de diferenciação tanto de células T reguladoras como de células Th17. A avaliação intracitoplasmáticas de citocinas serão avaliadas por citometria de fluxo multicolor com os anticorpos: anti-IFN $\gamma$  FITC, anti-IL-17 PE, anti-IL-4 PerCp Cy5.5, anti-IL-2 PECy7, anti-IL-10 APC, anti-TNF APC Cy7 e anti-CD4 Pacific Blue, e o kit BD Cytotfix/Cytoperm™(BD Biosciences).

**Identificação das citocinas presentes no soro:** essa análise será realizada por Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD Biosciences).

**Imunofenotipagem:** Imunofluorescência por citometria de fluxo: serão avaliados diversos marcadores em análises de citometria de fluxo multicolor, com combinações de até 8 anticorpos conjugados a diferentes fluorescências. Será usados os seguintes anticorpos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD69, anti-CD73, anti-CD31, anti-CD62L, anti-CD45, anti-CD14, anti-Gr1, anti-F4/80, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD40, anti-CD40L, anti-CD86, anti-CD80, anti-TLR2, anti-TLR4, anti-Ib, anti-NK1.1 (BD Biosciences). A aquisição das amostras será realizada no aparelho FACSCanto (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e a análise será feita através dos programas CellQuest e FACSDiva.

**Avaliação da expressão de Foxp3, T-bet, ROR $\gamma$ T, GATA-3 e CTLA-4 em células T CD4+,** por citometria de fluxo. As células serão incubadas com os anticorpos monoclonais de superfícies conjugados específicos (BD Biosciences). Os anticorpos anti-T-bet, GATA-3, Foxp3 e ROR $\gamma$ T (BD Biosciences) serão usados para análise multicolor dos fatores de transcrição e de CTLA-4 presentes em células T CD4+ com os seguintes kit e soluções, conforme descrito pelo fabricante: BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Buffer Set, Lysing Buffer and stain buffer (BD biosciences). Nesse momento o material será encaminhado para aquisição no citômetro FACSCanto (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

**Avaliação intracitoplasmática de citocinas em células T CD4+ presentes no linfonodo drenante:** anticorpos conjugados a diferentes fluorescências serão usados para análise multicolor das seguintes



Ajudando as  
pessoas a viverem  
vidas saudáveis

Concurso BD Biosciences Pesquisador SBI  
Projeto Vencedor 2010

citocinas: anti-IFNg FITC, anti-IL-17 PE, anti-IL-4 PerCp Cy5.5, anti-IL-2 PECy7, anti-IL-10 APC, anti-TNF APC Cy7 e anti-CD4 Pacific Blue, com o kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences), para avaliação de subpopulações celulares produtoras de citocinas.

Transplante de pele: O transplante de pele será realizado segundo a técnica descrita por Markees et al. (1997) [4], porém por nós modificada.

---

O concurso BD Biosciences Pesquisador SBI visa o reconhecimento e apoio aos pesquisadores que promovem o constante avanço científico através do incentivo à técnica de Citometria de Fluxo com Múltipla Marcação no Brasil.

Saiba mais em [bdbiosciences.com/br/pesquisador](http://bdbiosciences.com/br/pesquisador)