



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

“Generación de mutantes de leptina humana como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad”

(Un enfoque específico de la W100E)

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED**

P R E S E N T A

M. en. C. Chimal Vega Brenda

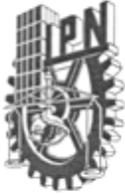
DIRECTORES DE TESIS

Dra. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Dra. en C. Norma Paniagua Castro



México D.F 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 10:00 horas del día 26 del mes de enero del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ENMyH para examinar la tesis titulada:

Generación de mutantes de leptina humana como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad

Presentada por el alumno:

Chimal	Vega	Brenda							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	A	1	0	0	6	6	2

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

D. en C. CLAUDIA GUADALUPE
BENITEZ CARDOZA
9190-ED-13

D. en C. NORMA PANIAGUA CASTRO
8549-EB-12

D. en C. LAURENCE MARCHAT
MARCHAU
9186-EF-13

D. en C. MARÍA EUGENIA JARAMILLO
FLORES
8359-EF-12

D. en C. ABSALOM ZAMORANO
CARIILLO
9003-ED-13

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

M. en C. Manuel Landereros Ledesma
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **26** del mes de **Enero** del año **2015**, el (la) que suscribe **Chimal Vega Brenda** alumno(a) del Programa de **Doctorado en Biotecnología**, con número de registro **A100662**, adscrito(a) al **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dra. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y Dra. en C. Norma Paniagua Castro** y cede los derechos del trabajo titulado **Generación de mutantes de leptina humana como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **beni1972uk@gmail.com**, **brendachimal27@hotmail.com**.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Brenda Chimal Vega

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Bioquímica y Biofísica Computacional de la Sección de estudios de Posgrado e Investigación (SEPI) de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional (ENMyH-IPN) bajo la dirección de la Dra. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y de la Dra. en C. Norma Paniagua Castro ambos profesores titulares del Posgrado en Biotecnología

Este proyecto fue apoyado por el programa de Becas de Doctorado del Consejo Nacional y Tecnología **(CONACyT)** con número de becario 232496, por el Programa Institucional para la Formación de Investigadores **(PIFI)**.

Agradezco a la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional **(SIP-IPN)** por el apoyo en los proyectos **20091074, 20060916, 20070141, 20120190**.

Agradezco a productos **MEDIX S. A. de C. V.** por el apoyo en este proyecto.

Agradecimientos

Principalmente a *Díos*, por estar siempre conmigo, por no dejarme caer por darme las fuerzas para salir adelante a pesar de las adversidades y sobre todo por hacerte presente en mi vida de una y mil formas. En ti confié y si tu conmigo quien contra mí (Romanos 8:13).

A mis padres *Hugo M Chimal Ríos y M. Dolores Vega Álvarez* muchas gracias por su amor incondicional, por estar conmigo siempre, por todo su apoyo en las buenas y en las malas, simplemente gracias por ser parte de mi vida Los Amo.

A mi hermanito *Hugo Ignacio*, gracias muñeco sabes que eres una parte fundamental en mi vida te amo.

A mi hermana *Karem*, *mís sobrinas y mí cuñado* que a pesar de la distancia siempre están conmigo. Los amo.

En especial quiero agradecer a la Dra. Claudia Benítez por todo su apoyo en todos los sentidos, por compartir sus conocimiento en el mundo de las proteínas, por su confianza, por su paciencia, su cariño y sobre todo por ayudarme a salir a flote cuando estaba a punto de hundirme, no tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, muchas gracias por estar en mi camino.

A mi comité tutorial

Dra. Norma Paniagua Castro

Dra. Maria Eugenia Jaramillo

Dra. Laurence Marchat

Dr. Absalom Zamorano

Por la asesoría, conocimiento y paciencia brindada en la realización de este trabajo muchas gracias.

A todos y cada uno mis compañeros por hacer más a mena mi estancia en el laboratorio y por todas sus experiencias compartidas.

Índice

Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	3
Índice de tablas	5
Resumen	6
Abstract	8

Capítulo 1

<i>Introducción</i>	10
1.1 Proteínas	11
1.1.1 Estructura de proteínas	11
1.1.2 Interacciones moleculares que mantienen la estabilidad de las proteínas	14
1.2 Plegamiento de proteínas	16
1.2.1 Estado nativo, parcialmente plegado y desplegado de las proteínas	17
1.2.2 Agentes desnaturalizantes	19
1.2.3 Técnicas experimentales para el estudio del plegamiento	20
1.2.4 Dicroísmo Circular (DC)	20
1.2.5 Fluorescencia (Fl)	22
1.3 Simulaciones por dinámica molecular	23
1.3.1 Campo de Fuerza OPLS AA	24
1.3.2 Gromacs	26
1.4 Obesidad	27
1.4.1 Leptina y factor de saciedad	28
1.4.2 Leptina humana	28
1.4.3 Estructura de la leptina	29
1.4.4 Funciones de la leptina humana	32
1.4.5 Mecanismo de acción de la leptina	34

1.4.6	Vía de señalización de la leptina	36
1.4.7	Resistencia a la leptina	40
1.4.8	Mutaciones en el gen de la leptina	42
1.5	Antecedentes	44
	Justificación	49
	Objetivos	50
	Objetivo general	50
	Objetivos particulares	50

Capítulo 2

	<i>Materiales y métodos</i>	51
2.1	Modelado por homología de la leptina humana WT y W100E	52
2.2	Análisis de los modos normales de vibración	53
2.3	Simulación de Dinámica Molecular	53
2.4	Predicción de tendencia desordenada	55
2.5	Subclonación de la leptina humana W100E en el vector de expresión pET 19 b modificado	55
2.6	Obtención de la mutante W100E	56
2.7	Sobreexpresión	57
2.8	Purificación por cromatografía de afinidad	57
2.9	Eliminación del tracto de histidinas por cromatografía de intercambio iónico	58
2.10	Análisis de la expresión y de la purificación mediante SDS-PAGE	59
2.11	Determinación de la concentración de proteína	59
2.12	Espectros de Dicroísmo Circular	60
2.13	Transiciones químicas por Dicroísmo Circular	60
2.14	Transiciones térmicas por Dicroísmo Circular	60
2.15	Replegamiento de la leptina humana W100E	61
2.16	Evaluación de la actividad de la leptina W100E en un modelo murino de obesidad	61

2.17	Análisis estadístico	62
2.18	Tratamiento de los datos para un médelo de desplegamiento de dos estados	63

Capítulo 3

	<i>Resultados</i>	68
	<i>Resultados in silico</i>	
3.1	Modelado de la leptina humana silvestre y W100E	70
3.1.2	Desviación Cuadrática Media (RMSD)	72
3.1.3	Radio de Giro (RG)	74
3.1.4	Área Superficial Expuesta al Solvente (SASA)	76
3.1.5	Raíz Cuadrada de la Fluctuación (RMSF)	77
3.1.6	Estructura Secundaria	80
3.1.7	Estado Nativo de la leptina silvestre y W100E	82
3.18	Reacción de desplegamiento de la leptina humana silvestre y W100E	85
3.1.9	Análisis de los modos normales de vibración	86
	<i>Resultados in vitro</i>	
3.2	Subclonación de la leptina humana variante soluble en el vector de expresión pET 19 b modificado	88
3.2.1	Obtención de la mutante W100E	91
3.2.2	Sobreexpresión de la mutante W100E en un sistema heterólogo	92
3.2.3	Purificación de la mutante W100E	92
3.2.4	Eliminación del tracto de histidinas	94
3.3	Espectros y transiciones de Dicroísmo Circular de la leptina humana W100E	96
3.3.1	Evaluación de la estructura secundaria	96
3.3.2	Transiciones de Desplegamiento térmico de la leptina humana W100E pH 8.0 y pH 2.0	97

3.3.3	Transiciones de Desplegamiento químico de la leptina humana W100E pH 8.0	99
3.3.4	Parámetros de Desnaturalización térmica y química de la leptina humana W100E	102
	<i>Resultados in vivo</i>	
3.4	Efecto de la mutante W100E sobre el peso corporal en modelo de ratón obeso	107
	<i>Capítulo 4</i>	
	<i>Discusión</i>	115
	<i>Capítulo 5</i>	
	<i>Conclusiones</i>	123
	<i>Capítulo 6</i>	
	<i>Perspectivas</i>	126
	<i>Capítulo 7</i>	
	<i>Bibliografía</i>	129
	<i>Apéndice</i>	138

Lista de abreviaturas

AGRP: Del inglés A Gouti-Related Protein

DM: Diabetes mellitus

db : Gen diabetes

DC: Dicroísmo Circular

ΔG : Cambio de Energía libre de Gibbs

ΔH : Cambio en la entalpia

HFHF: Dieta hipercalórica (por sus siglas en inglés “High-Fat/High-Fructose Diet”)

JAK2/STAT3: Janus kinase-2/ signal transducer and activator of transcription-3.

MC4R: Melanocortina-4 (del inglés Melanocortin 4-receptor)

MSH- α : Melanocito- α (del inglés α -melanocyte)

N: Estado Nativo

NYP: Neuropeptido Y (del inglés Neuropeptide Y)

Ob: Gen ob

ObR: Receptor de leptina

POMC: Proopiomelanocortina (del inglés pro-opiomelanocortin)

PPS: Prescission Protease

SDM: Simulación por Dinámica Molecular

T_m: Temperatura media a la cual ocurre el desplegamiento aparente

U: Estado desplegado (por sus siglas en inglés “Unfolded state”)

W100E: Sustitución de un triptófano por un ácido glutámico en la posición 100 de la leptina humana.

WT: Wild type

Lista de figuras

Figura N°		
1.1	Representación de los diferentes niveles de organización de los aminoácidos	13
1.2	Formación de una interacción iónica	15
1.3	Plegamiento y Desplegamiento de una proteína	18
1.4	Formula química y molecular de los desnaturalizantes químicos urea y cloruro de guanidinio	19
1.5	Espectros de DC en la región del UV-lejano	21
1.6	Espectros de emisión de fluorescencia de la enolasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en distintas concentraciones de urea.	22
1.7	Representación en listones de la estructura de la leptina humana W100E	31
1.8	Representación esquemática de la vía de señalización intracelular leptina-ObRb	39
2.1	Gráfico de van't Hoff	67
3.1	Estructura modelada de la leptina humana W100E	71
3.2	Desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de la leptina humana silvestre y W100E	73
3.3	Grado de compactación de la leptina humana silvestre y W100E	75
3.4	Área superficial accesible al solvente (SASA) de la leptina humana silvestre y W100E	76
3.5	Raíz cuadrada de la desviación fluctuante (RMSF) de la leptina humana silvestre y W100E.	79
3.6	Evolución de la estructura secundaria de la leptina humana silvestre y W100E	81
3.7	Imágenes representativas durante la trayectoria por SDM	83
3.8	Estructuras promedio de la leptina humana WT y W100E	84
3.9	Análisis electroforético de la sublocación de la leptina W100E en el vector de expresión pEt19b-m	89
3.10	Alineamiento de la secuencia de la leptina humana W100E subclonada en el vector de expresión pEt19b-m	90
3.11	Alineamiento de la leptina Silvestre y W100E observando la sustitución del aminoácido W por E.	91
3.12	SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de la leptina W100E	93
3.13	Análisis electroforético de la eliminación del tracto de histidinas	95
3.14	Evaluación de la estructura secundaria de la leptina Silvestre y W100E	96

3.15	Transiciones y espectros de DC de desplegamiento térmico de la leptina humana W100E	98
3.16	Espectro de DC de la leptina humana W100E en su forma nativa, parcialmente desplegada y desnaturalizada químicamente	99
3.17	Transición de desplegamiento químico de la leptina humana silvestre y W100E	101
3.18	Consumo de alimento durante 10 días de tratamiento con la leptina W100E	108
3.19	Peso corporal de ratones sometidos a dieta HFHF	109
3.20	Grasa retroperitoneal y epididimal de ratones sometidos a dieta HFHF	110
3.21	Perfil lipídico de ratones sometidos a dieta HFHF	111
3.22	Ingesta de alimento después de cinco días de tratamiento	112
3.23	Ganancia de peso corporal (rebote) siete días después del tratamiento	113

Índice de tablas

Tabla N°		
2.1	Composición de la dieta control y dieta HFHF	62
3.1	Parámetros termodinámicos de desplegamiento químico de la leptina humana W100E	104
3.2	Valores de los parámetros termodinámicos de diferentes proteínas estructuralmente parecidas a la leptina humana.	105

Resumen

La leptina es una hormona que se encarga de regular el equilibrio energético. Desde hace dos décadas de su descubrimiento varios esfuerzos se han realizado para comprender su papel en la regulación del metabolismo de la conducta alimentaria, la reproducción, homeostasis de la glucosa, la respuesta inmune, la formación de hueso, metabolismo de los lípidos, entre otros, pero su uso como agente terapéutico en pacientes obesos es aun limitada debido al síndrome de resistencia a la leptina. Para obtener su estructura cristalográfica fue necesario sustituir un triptófano por un ácido glutámico en la posición 100 (W100E), creando así una leptina mutante la cual se ha reportado que tiene una actividad biológica comparable con la actividad de la proteína silvestre (WT).

En este trabajo nosotros reportamos un estudio comparativo del espacio conformacional de la leptina WT y W100E, utilizando simulaciones de dinámica molecular a 300, 400 y 500 K, en donde detectamos diferencias entre las interacciones de las dos proteínas con efectos locales y distantes, resultando en cambios en su conformación, compactación del área expuesta a la superficie, potencial electrostático y comportamiento dinámico, así como también la serie de eventos que ocurren durante el desplegamiento de ambas construcciones.

Por otro lado, también evaluamos la estabilidad de la leptina humana W100E mediante el desplegamiento/plegamiento inducido químicamente y térmicamente a diferentes pH, utilizando la técnica espectroscópica de dicroísmo circular. Donde los resultados demuestran que el desplegamiento de la leptina humana W100E se lleva a cabo mediante un mecanismo de dos estados tanto química como térmicamente, se calcularon los parámetros termodinámicos (ΔG , ΔH , T_m y m) asociados con las reacciones del proceso de desplegamiento. También en este estudio nosotros determinamos el efecto de la leptina W100E donde observamos que esta

redujo la ingesta de alimentos, peso corporal y los niveles de triglicéridos, pero incremento los niveles de colesterol-HDL en ratones obesos sujetos a una dieta hipercalórica, por otro lado en ratones con dieta normal el tratamiento con leptina W100E se aumentó la ingesta de alimentos, pero no se aumentó el peso corporal y el colesterol total, sin embargo cuando se interrumpe el tratamiento detectamos un aumento significativo en el peso corporal en todos los grupos de ratones, aparte del grupo control, lo que indica un efecto rebote.

Todos estos resultados apoyan nuestra comprensión de la señalización, la estabilidad y la sensibilidad de la leptina y por lo consiguiente esto podría ser relevante para el uso potencial de la leptina en el tratamiento contra la obesidad y condiciones de sobrepeso.

Abstract

Leptin is a hormone that regulates energy balance. Since its discovery two decades ago, several efforts have been made to fully understand its role in metabolic regulation of feeding behavior, reproduction, glucose homeostasis, immune function, bone formation, lipid metabolism, among others, Its use as a therapeutic option in obese patients is still limited due to the syndrome known as leptin resistance. To obtain the crystallographic structure of leptin, it was necessary to substitute a tryptophan for a glutamic acid at position 100 (W100E), thus creating a mutant leptin that has been reported to have biological activity comparable to the activity of the wild type (WT) Here, we report a comparative study of the conformational space of WT and W100E leptin using molecular dynamics simulations performed at 300, 400, and 500 K. We detected differences between the interactions of the two proteins with local and distal effects, resulting in changes in the conformation, accessible surface area, compactness, electrostatic potential and dynamic behavior. Additionally, the series of unfolding events that occur when leptin is subjected to high temperature differs for the both constructs. On the other hand we evaluate the stability and folding/unfolding mechanism of human leptin W100E chemically and thermally induced at different pH, the unfolding reaction of leptin by means of circular dichroism, It has been found that leptin unfolds W100E performed using a two-state mechanism. The thermodynamic parameters associated to the unfolding reaction (ΔG , ΔH , T_m y m) have been estimated.

Also In this study, we determined that the treatment of a soluble form of human Leptin (W100E) reduced food intake, body weight and triglycerides levels, but increased HDL-cholesterol levels on obese mice subjected to high-fat/high-fructose diet. In contrast, treatment with soluble human Leptin increased food intake but did not increase body weight and total-

cholesterol in mice with normal diet. When stopping the treatment with human W100ELeptin, it was detected a significant increase in body weight in all groups of mice apart from the control, indicating a rebound effect.

The results contribute to the understanding signaling, stability and sensitivity this might be relevant in offering more evidence of the potential use of the leptin in the treatment against obesity and overweight conditions.

Capítulo 1
Introducción

1. Introducción

1.1 Proteínas

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes de las células vivas, así como las más versátiles y diversas que participan esencialmente en todos los procesos biológicos. Son moléculas poliméricas que se sintetizan en los ribosomas. Están formadas por la combinación de 20 aminoácidos diferentes y llevan a cabo una enorme cantidad de funciones diversas.

Cuando una proteína se pliega adquiere una estructura tridimensional única capaz de llevar a cabo su función biológica. Esta organización espacial es la clave para el entendimiento de la función.

1.1.1 Estructura de las proteínas

Todas las proteínas poseen una misma estructura química central, que consiste en una cadena de aminoácidos. La **estructura primaria** de una proteína está dada por la disposición lineal o secuencia de aminoácidos unidos por enlaces péptidicos (Fig. 1-A). Sin embargo, esta secuencia lineal de aminoácidos puede adoptar diferentes conformaciones en el espacio, mediante el plegamiento del polímero lineal, dando lugar a la **estructura secundaria** que consiste en arreglos locales que resultan de la interacción de aminoácidos cercanos de la cadena polipeptídica y que se estabilizan gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Los tipos de estructura secundaria más frecuentemente encontradas en una proteína son las hélices- α y hebras- β (**Mathews 2003**). Las hélices α se repiten cada 18 residuos que representan cinco vueltas, están estrechamente empaquetadas; de forma que no hay casi espacio libre dentro de ellas y todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior de la hélice ya que se estabilizan por puentes de hidrogeno. Cada hebra- β es un segmento

polipeptídico corto (5-8 residuos), casi totalmente extendido. La unión mediante enlaces de hidrógeno entre los átomos de hebras- β adyacentes forma una hoja- β . La planaridad del enlace péptidico fuerza a la hoja- β a plegarse; por ello, esta se conoce como hoja- β plegada (Fig 1-B-C). La **estructura terciaria** se describe como el conjunto de interacciones donde los segmentos de estructura secundaria interactúan entre si formando una estructura compacta dando origen a diferentes arreglos espaciales en la cadena polipeptídica y a diferentes patrones de interacción entre las hélices- α y las hebras- β . Sin embargo, como las interacciones son débiles, la estructura terciaria de una proteína no se mantiene fija, si no que sufre una fluctuación continúa y momentánea. Esta variación en la estructura tiene consecuencias importantes en el funcionamiento y regulación de las proteínas (Fig 1-D) (**Lesk 2000, Lodish 2005**). Finalmente La **estructura cuaternaria** se refiere a la interacción de dos o más polipéptidos o subunidades que pueden ser iguales o diferentes, unidas por fuerzas no covalentes para formar una proteína multimérica funcional (Fig 1-E) (**Lodish 2005**).

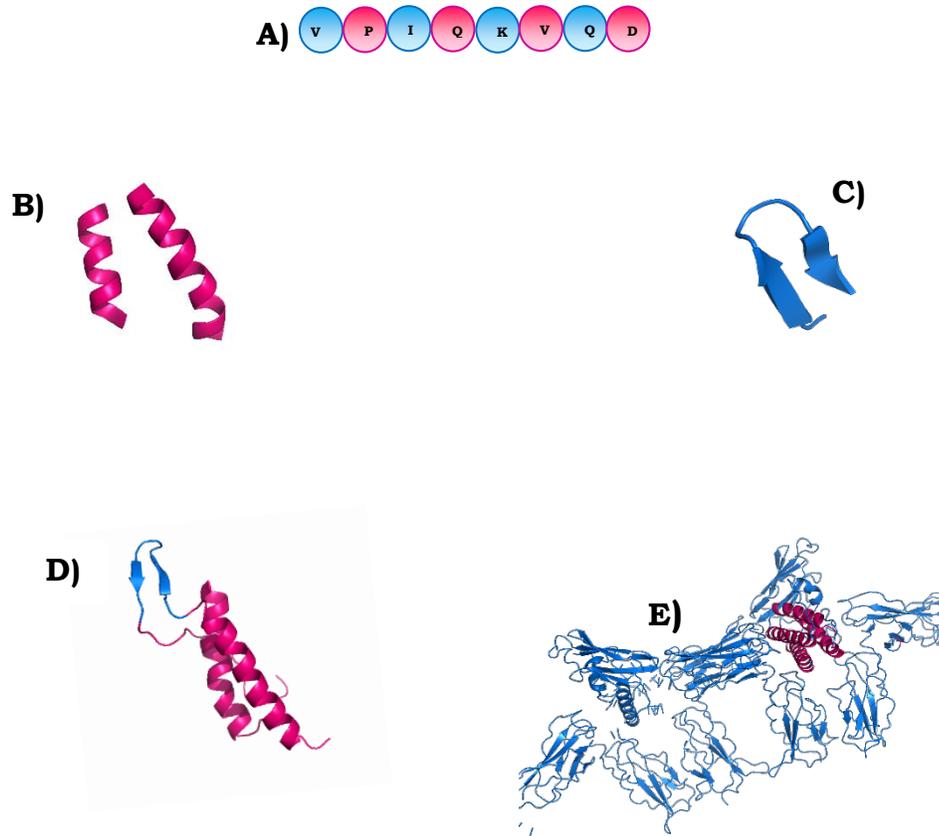


Figura 1.1 Representación de los diferentes niveles de organización de los aminoácidos de las proteínas A) estructura primaria, B-C) estructuras secundarias, D) estructura terciaria y E) estructura cuaternaria.

1.1.2 Interacciones moleculares que mantienen la estabilidad de las proteínas

Para que una proteína pueda mantener su conformación nativa es necesario que intervengan diversas interacciones no covalentes tanto entre los átomos de la proteína, así como con los átomos de los solventes que la rodean. Dentro de las principales interacciones **no covalentes** podemos mencionar las interacciones hidrofóbicas, polares, de Van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes salinos (interacciones iónicas); todas estas interacciones, a pesar de ser relativamente débiles, por su gran número contribuyen significativamente en la estabilización de la conformación nativa.

Las interacciones **hidrofóbicas** son de las principales fuerzas que mantienen la proteína nativa. Las moléculas no polares no contienen grupos cargados, ni poseen momento dipolar, por lo tanto no se hidratan, por lo que tienden a minimizar su interacción con las moléculas de agua, interaccionado fuertemente entre sí. Por lo tanto, los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas tienden a ocultarse del solvente acuoso en el interior de una proteína cuando esta se pliega (**Creighton 1993, 1999**).

Las interacciones **polares** surgen de la polarización de enlaces por la diferencia de electronegatividad entre dos átomos. Por otro lado, las interacciones de **Van der Waals** se originan cuando dos átomos cualesquiera se acercan mucho el uno al otro y crean una fuerza débil de atracción inespecífica, estas interacciones contribuyen de manera importante en la estabilidad de la proteína, principalmente en las hélices- α (la energía requerida para poder romper estas interacciones es de 1 kcal/mol). Por su parte, los **puentes de hidrógeno** son interacciones electrostáticas débiles entre dos átomos parcialmente cargados generalmente nitrógeno, oxígeno y flúor. Se forman cuando un átomo dona el hidrógeno unido covalentemente a él a un átomo electronegativo “aceptor”. Son abundantes, claves en la conformación de la estructura

secundaria y muy direccionales (su energía de disociación de enlace es aproximadamente de 1 a 9 kcal/mol) (**Solomons 2000**). Por otro lado, los **puentes salinos** o **interacciones iónicas** son el resultado de la atracción de un ión cargado positivamente (catión) por un ion cargado negativamente (anión). En las proteínas, los grupos que pueden presentar carga neta negativa, son las cadenas laterales de los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico, mientras que los residuos de histidina, lisina y arginina pueden presentar carga positiva (Fig. 1.2). En algunos casos las interacciones iónicas pueden ser muy importantes en la guía del plegamiento (fuerza de interacción superiores a 10 kcal/mol) (**Voet 2005, Dobson 2003, Gómez-Puyou 2003**).

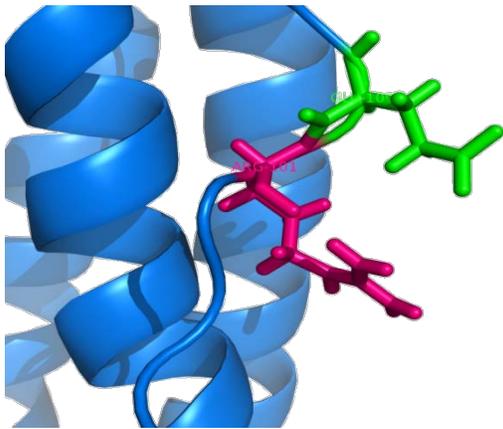


Figura 1.2. Representación de una interacción iónica entre la Arginina (Rosa) y el Ácido glutámico (verde).

Por otro lado, dentro de las interacciones de carácter **covalente** tenemos los puentes de disulfuro. Estos se forman entre dos residuos de cisteínas cuyas cadenas laterales se encuentran próximas en el espacio y en algunas proteínas son necesarios para mantener su estructura y función. Cabe mencionar que los puentes de disulfuro no siempre mejoran la cinética del plegamiento, ya que a lo largo del mismo se forman y han de romperse puentes de disulfuro no nativos y esto puede hacer muy lento el proceso de plegamiento. De hecho, proteínas que originalmente se pliegan en microsegundos pueden tardar minutos si existe la posibilidad de formar puentes de disulfuro no nativos en el plegamiento.

1.2 *Plegamiento de proteínas*

El plegamiento de proteínas es el proceso mediante el cual una proteína, adquiere su forma tridimensional específica, es decir su forma nativa **(N)** después de su biosíntesis en los ribosomas. La forma nativa es termodinámicamente estable y capaz de llevar a cabo su función biológica correctamente **(Baker 2000, Dobson 2003, Olivares 2004)**. Por tal razón la célula cuenta con mecanismos para evitar y revertir el plegamiento incorrecto de las proteínas. Sin embargo, el plegamiento es un proceso complejo, y el mecanismo por el cual una cadena polipeptídica dada adopta, dentro de un enorme número de conformaciones posibles, precisamente aquella que le permite llevar a cabo su función biológica, sigue sin ser comprendido. Por lo que este conocimiento podría tener un importante impacto biológico y médico, ya que sería posible el diseño de proteínas *de novo*, las cuales podrían realizar funciones altamente específicas, también podrían diseñarse fármacos y establecerse mecanismos de diversos procesos fisiopatológicos. Para poder entender cómo se lleva a cabo la reacción de plegamiento, los investigadores estudian los mecanismos de desplegamiento y replegamiento de las proteínas utilizando diferentes métodos **(Baker 2000, Dobson 2003, Hur & Darve 2003)**.

1.2.1 Estado nativo, parcialmente plegado y desplegado de las proteínas

Para poder estudiar en detalle la ruta de desplegamiento de una proteína, es necesario primero caracterizar los diferentes estados conformacionales que esta puede adoptar. Una proteína en su estado **desplegado** carece de una organización espacial bien definida, teniéndose una alta flexibilidad estructural y produciéndose giros y torsiones aleatorios en diferentes regiones de la cadena polipeptídica (**Mateu 2003**), contiene regiones con un cierto grado de estructura secundaria que puede ser nativa o no (**Dobson 2003, Shortle 2001**). Al producirse el plegamiento de la proteína, esta adquiere una estructura tridimensional bien definida, ordenada y relativamente rígida, conocida como el estado **plegado** o **nativo**. Esta conformación es la que tiene menor energía libre de Gibbs de acuerdo con la hipótesis termodinámica (**Anfinsen 1973**). Sin embargo, algunas proteínas presentan uno o más estados parcialmente plegados en su ruta de plegamiento/desplegamiento (Fig. 1.3), a los que se les denomina **intermediarios**. Comúnmente se ha descrito que los intermediarios son estructuras con mayor proximidad en conformación al estado nativo que al desplegado, en algunos casos con la mayoría de elementos de su estructura secundaria similar a la proteína nativa, pero con sus contactos terciarios debilitados. También se ha sugerido que la presencia de intermediarios depende principalmente de si las condiciones experimentales en las que se evalúa el plegamiento/desplegamiento permite su estabilización, pero que podrían ser un evento generalizado en el mecanismo de plegamiento de proteínas, aunque para la mayoría de las proteínas menores de 200 aminoácidos estos no se hayan observado (**Ferguson 1999**).

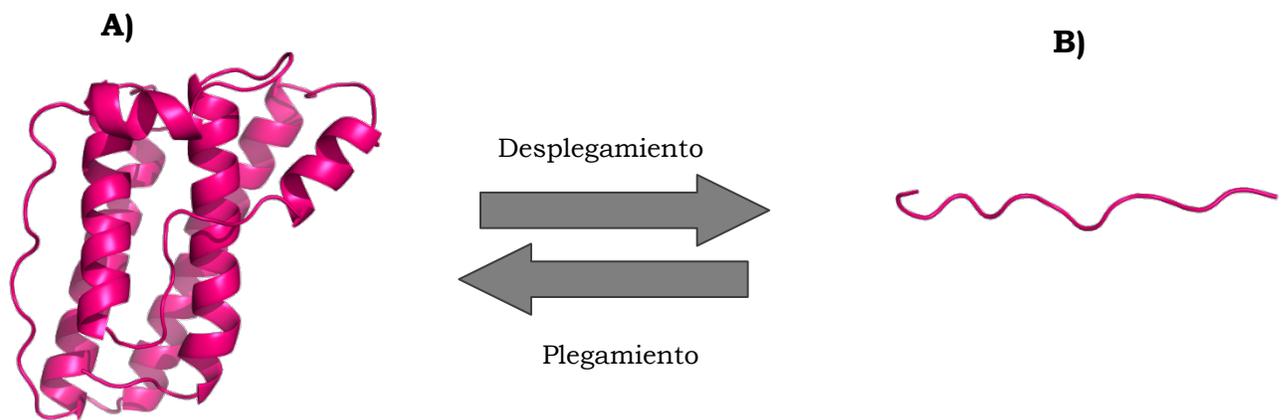


Figura 1.3 Plegamiento y desplegamiento de una proteína. A: Conformación nativa capaz de llevar a cabo su función biológica y B: conformación desplegada que carece de organización espacial bien definida.

1.2.2 Agentes desnaturizantes

La conformación nativa de una proteína puede perderse cuando el ambiente se modifica hacia condiciones que favorezcan el desplegamiento. Las variables pueden ser cambios en la temperatura, en el pH, la fuerza iónica de la solución, o bien aplicando alta presión o altas concentraciones de agentes químicos desnaturizantes como la urea, cloruro de guanidinio o tiocianato de guanidinio, siendo la urea y el cloruro de guanidinio los desnaturizantes más empleados (Fig. 1.4), ya que su efecto caotrópico se debe a que disoluciones concentradas de estas moléculas son mejores disolventes de los estados desplegados que el agua, por lo que desplazan la reacción del plegamiento hacia la forma desnaturizada (**Pace 1986,1997, Dill 1991, Möglich, 2005, Maxwell, 2007**).

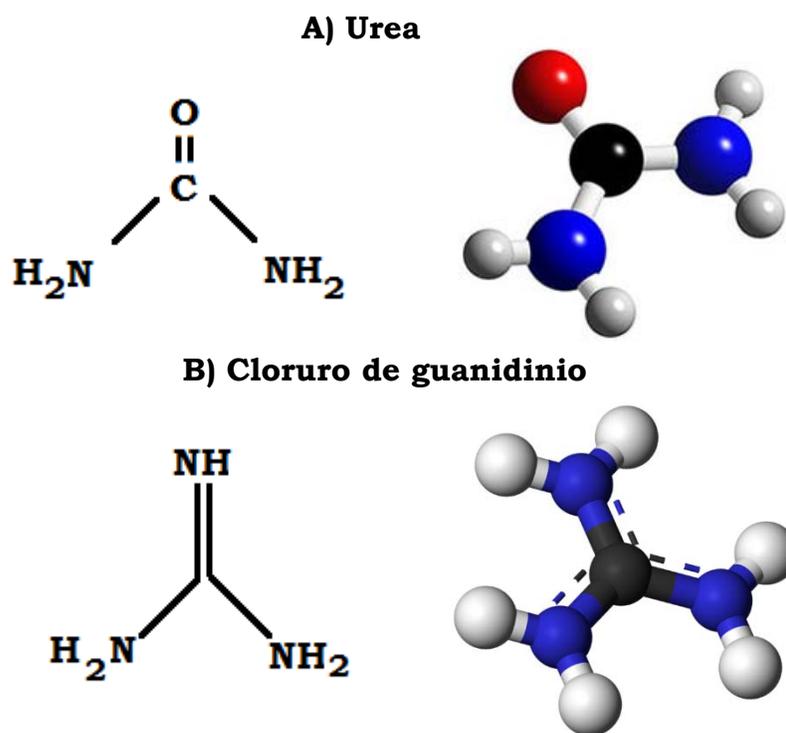


Figura 1.4: Formula química y representación molecular de los desnaturizantes químicos A) Urea y B) Cloruro de guanidinio.

1.2.3 Técnicas experimentales para el estudio del plegamiento

Por lo general, los cambios estructurales causados por el desplegamiento se pueden evaluar utilizando diversas técnicas espectroscópicas. Estas técnicas proveen información acerca de los cambios en el comportamiento de una proteína bajo diferentes condiciones de solvente, ayudan a determinar la estabilidad de una proteína y a su vez registrar las transiciones estructurales del desplegamiento y replegamiento bajo ciertas condiciones. Dentro de las técnicas espectroscópicas comúnmente utilizadas podemos mencionar el Dicroísmo Circular (DC), Fluorescencia, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), entre otras. Además, también se pueden utilizar simulaciones de dinámica molecular (SMD) para obtener una descripción a nivel atomista sobre el mecanismo de plegamiento de las proteínas. Actualmente es posible realizar las simulaciones de dinámica molecular con solvente explícito, lo que representa el método más prometedor para proporcionar esta directa de las interacciones físicas que estabilizan las proteínas, siempre y cuando las funciones de la energía o "campos de fuerza", y métodos para mejorar la toma de muestras de eventos de la reacción de plegamiento sean precisas

1.2.4 Dicroísmo Circular (DC)

El fenómeno de dicroísmo circular (DC) se basa en la absorción diferencial de los componentes polarizados a la izquierda y a la derecha de una molécula. Esta técnica en la región del UV cercano (250-300 nm) da información acerca del ambiente de la cadena lateral de los aminoácidos aromáticos así como de las posibles contribuciones de los puentes disulfuro. Por otro lado en la región del UV lejano (180-250 nm) permite evaluar y registrar los cambios en la estructura secundaria regular durante la reacción de plegamiento/desplegamiento. Cada uno de los diferentes

elementos de estructura secundaria regular, hélices- α y hebras- β , presentan espectros característicos de DC que se muestran en la figura 1.5. Para una proteína que consta de varios de estos elementos, el espectro de DC será una contribución de todos los elementos de estructura secundaria presentes en la misma, los espectros son reportados como elipticidad por residuo medio (θ_{MRW}) cuyas unidades son grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Estas unidades están normalizadas considerando la muestra (proteína), es decir el recorrido óptico del haz de luz y número de aminoácidos de cada proteína **(Pelton 2000, Miles 2004, Less 2006, Greenfield 2006)**.

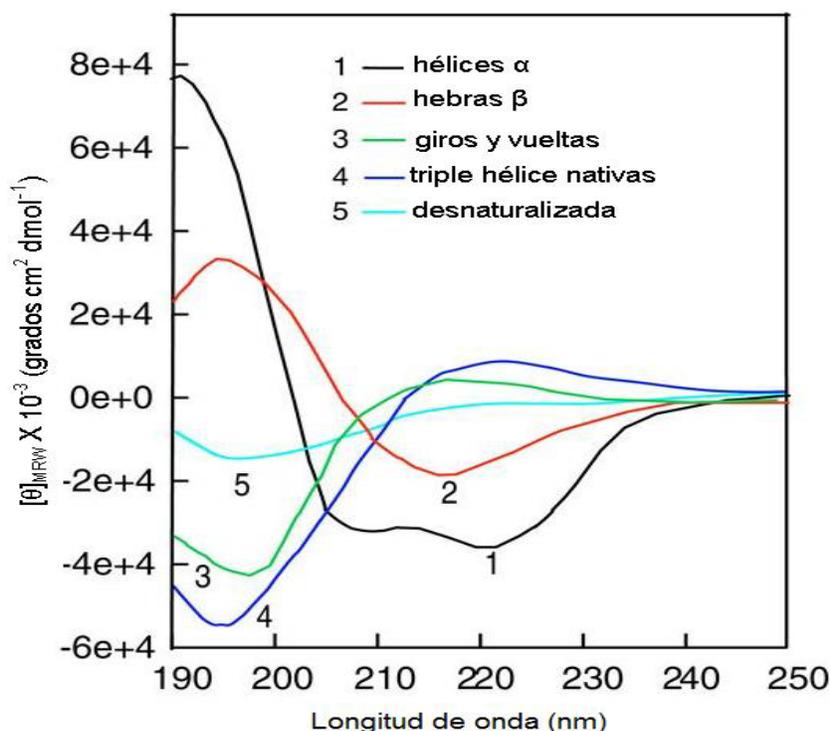


Figura 1.5 Espectros de DC en la región del UV-lejano. En color negro se representan el espectro característico de una proteína formada predominantemente por hélices- α en rojo el característico para las hebras- β -antiparalelas, en verde estructuras de giros y vueltas, en azul triple hélice nativas y en azul turquesa el espectro de la forma desnaturalizada de la proteína **(Greenfield 2006)**.

1.2.5 Fluorescencia (Fl)

La espectroscopia por emisión de fluorescencia se da por la absorción de luz por parte de ciertos componentes que son capaces de emitirla a determinadas longitudes de onda. En el caso del estudio de proteínas la fluorescencia se origina principalmente por el grado de exposición de los tres fluoróforos naturales fenilalanina, tirosina y triptófano. Sin embargo la mayor contribución en un espectro de fluorescencia de una proteína que contiene los tres tipos de aminoácidos mencionados es el triptófano. Si una proteína presenta todos sus residuos de triptófano en un ambiente hidrofóbico la emisión de fluorescencia generalmente se observará con un máximo de aproximadamente 320 nm; mientras que si se encuentra en un ambiente más polar, el máximo del espectro de emisión se desplaza hacia longitudes de onda mayores y su emisión de fluorescencia se presenta alrededor de los 340-360 nm. En la figura 1.6 podemos observar espectros de emisión de fluorescencia utilizando diferentes concentraciones de urea (**Pace 1986, Schmid 1992, Lakowicz 1999**).

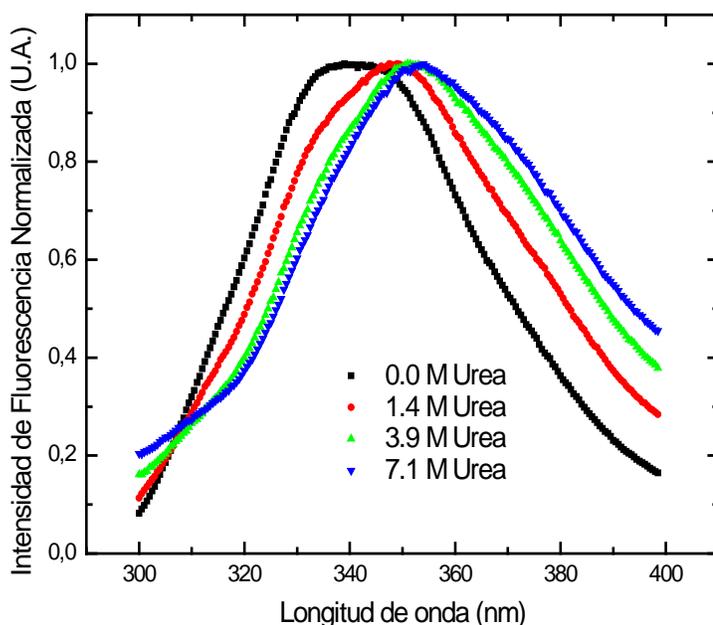


Figura 1.6. Espectros de emisión de fluorescencia de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* en distintas concentraciones de urea. (**Sanchez 2007**).

Es interesante señalar que no existe una técnica única que sea capaz de proporcionar toda la descripción detallada de los cambios conformacionales durante las etapas de plegamiento y desplegamiento, sino que generalmente es necesario combinar la información obtenida a través de distintas metodologías, dado que cada una de las técnicas puede monitorear distintas características del estado nativo. Otra de las limitantes más fuertes de las distintas técnicas utilizadas en los estudios de plegamiento es la resolución tanto espacial como temporal. Es por eso, que recientemente se han desarrollado sistemas de mezclado rápido como el flujo detenido, con dispositivos de tiempos muertos de reacción de hasta milisegundos. Esto es particularmente interesante en proteínas pequeñas (menores a 150 residuos) en los que los eventos de plegamiento y desplegamiento podrían llevarse a cabo en estos intervalos de tiempo.

En este trabajo nosotros utilizamos la técnica de DC para evaluar la estabilidad de la leptina humana a través de transiciones de desplegamiento térmico y químico.

1.3 Simulaciones por dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) se define como una técnica de simulación por computadora donde se sigue la evolución temporal de un conjunto de átomos que interactúan bajo cierto potencial definido y se mueven descritos por la interacción ecuaciones de movimiento con respecto al tiempo y están gobernadas por las leyes de Newton del movimiento.

Principalmente se basa en la segunda ley de Newton, donde la aceleración de un cuerpo es directamente proporcional a la fuerza neta que actúa sobre el e inversamente proporcional a su masa. Quedando la ecuación del movimiento en:

$$F = ma$$

Donde F es la fuerza ejercida por una molécula, m es la masa y a es la aceleración.

La DM necesita un juego de posiciones iniciales y velocidades para poder realizarse así como la evolución con respecto al tiempo. En términos gráficos los átomos de las moléculas se mueven dentro de una computadora, sus ecuaciones de movimiento se resuelven y se obtienen los parámetros macroscópicos que determinan las propiedades del sistema, de esta manera el sistema de simulación sugiere un comportamiento al que podría ocurrir en la realidad. De esta manera podríamos describir a las simulaciones como un microscopio virtual con alta resolución temporal y espacial, considerando que es posible obtener imágenes instantáneas de las estructuras, que no podrían tomarse en experimentos convencionales y permitiendo el acceso a todas las escalas de tiempo y movimiento con resolución atómica.

El estudio de desplegamiento de proteínas por simulación de dinámica molecular, consiste en el incremento de la temperatura con el propósito de superar las fuerzas entálpicas que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína. Se ha demostrado que las simulaciones a altas temperaturas aceleran las vías de desplegamiento. Es importante tener en cuenta que el uso de temperaturas elevadas en los ensayos de DM con respecto a las temperaturas utilizadas en los ensayos *in vitro* es debido a la escala accesible de tiempo que se tiene en cada ensayo, considerando que en las simulaciones se evalúan las etapas iniciales del proceso en intervalos de tiempo de nanosegundos (**Karplus 2003**).

1.3.1 Campo de fuerza OPLS AA

Un campo de fuerza involucra elegir un conjunto de ecuaciones y de parámetros, los cuales nos permiten medir la variación de la energía potencial de la molécula con respecto a las posiciones de los átomos que la componen.

El potencial optimizado para simulaciones en líquido de todos los átomos (OPLS-AA) se basa en campo de fuerza AMBER y fue desarrollado con la idea de usarlo para simulaciones de dinámica molecular de biomoléculas (**Aliseda 2011, Jorgensen 1996**).

$$\begin{aligned}
 E_{total} &= E_{enlazantes} + E_{angulos} + E_{diedros} + E_{no-enlazantes} \\
 E_{enlazantes} &= \sum_{enlazantes} K_r (r - r_0)^2 \\
 E_{angulos} &= \sum_{angulos} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 E_{diedros} &= \frac{V_1}{2} [1 + \cos(\phi - \phi_0)] + \frac{V_2}{2} [1 - \cos 2(\phi - \phi_0)] + \frac{V_3}{2} [1 \\
 &\quad + \cos 3(\phi - \phi_0)] + \frac{V_4}{2} [1 + \cos 4(\phi - \phi_0)] \\
 E_{no-enlazantes} &= \sum_{i>j} f_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_{ij}q_i e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

Con la combinación de reglas: $A_{ij} = \sqrt{A_{ii} A_{jj}}$ y $C_{ij} = \sqrt{C_{ii} C_{jj}}$

La forma funcional básica de un campo de fuerza en capsula términos relacionados con los átomos que están unidos por enlaces covalentes, y no covalentes, interacciones electrostáticas y de van der Waals. La descomposición específica de los términos depende del campo de fuerza, donde la forma general para la energía total en un campo de fuerza aditivo se puede describir como los componentes de las contribuciones covalentes y no covalentes se dan por las siguientes sumas:

$$E_{total} = E_{enlazantes} + E_{angulos} + E_{diedros} + E_{no-enlazantes}$$

1.3.2 *Gromacs*

Gromacs es un paquete versátil el cual simula las ecuaciones de Newton del movimiento para sistemas con cientos de millones de partículas, está diseñado principalmente para moléculas bioquímicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Fue desarrollado por Lidahl y colaboradores (<http://www.gromacs.org/>). Este programa utiliza las configuraciones espaciales de un archivo que contenga las coordenadas de los átomos del sistema a estudiar generalmente de un archivo en formato pdb igualmente necesita información de las interacciones de los átomos como ángulos de enlace, cargas y radios de van der Waals, se le alimentan parámetros para controlar la simulación como temperatura (T) velocidad inicial (V_i), Presión (P), números de pasos, Intervalos de tiempo para la integración de las ecuaciones de movimiento, etc. Gromacs es un conjunto de archivos ejecutables que permiten la preparación de los archivos que sirven para realizar la simulación por DM y el mismo la realiza.

1.4 *Obesidad*

La obesidad se define como un desorden metabólico que produce una acumulación excesiva de grasa corporal, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) está determinada por el índice de masa corporal (IMC), el cual se puede calcular al dividir el peso en kilogramos sobre el cuadro de la talla en metros (Kg/m^2). Un IMC menor a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, se define como peso normal, un IMC mayor a $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ se define como sobre peso, y un IMC mayor a $30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ como obesidad; la cual es considerada una enfermedad compleja y puede originarse por diferentes factores entre ellos podemos mencionar los factores ambientales (mala alimentación y el sedentarismo) y los factores genéticos siendo estos los más importantes, ya que estudios realizados en los miembros de una misma familia demostraron que la obesidad puede ser heredada en un 30% a un 70% de los casos, identificando en un análisis comparativo de genomas de familias con varios miembros obesos diversas regiones cromosómicas relacionadas con la obesidad por ejemplo los cromosomas 2p21-p23, 3q27, 4p15-p14, 4q31-q32, 6q22.31-q23.2, 7q31-q32, 10p11-p12, 11q14-q24, 12q23-q24 J, 19q13.33-q13.43, 20q11-q13, Xq24 **(Bell, 2005)**.

Por otro lado la obesidad también es considerada una patología grave que conlleva al desarrollo de múltiples enfermedades especialmente diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, cáncer y apoplejía consideradas las principales causas de muerte en México **(Bjorntorp, 1997, Kopelman, 2000, Bellanger, 2005, Sharma, 2005)**.

1.4.1. *Leptina y factor de saciedad*

La evidencia de un sistema fisiológico para la regulación homeostática del peso corporal se inició desde hace aproximadamente cuatro décadas, cuando el concepto de un factor de saciedad circulante se vio reforzada por el descubrimiento de mutaciones recesivas en el ratón, denominadas *ob* (obese) y *db* (diabetes), responsables de producir alteraciones tales como hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, gasto metabólico reducido, hipogonadismo, infertilidad y obesidad de inicio temprano que conduce a obesidad mórbida. De esta forma en la década de 1970 Coleman concluyó que los ratones *ob/ob* no producían un “factor de saciedad humoral” y que los ratones *db/db* no sintetizaban el producto adicional requerido para la respuesta a dicho factor. A los genes responsables de las mutaciones se les llamó *ob* y *db*, donde al producto del gen *OB* se le denominó leptina (del griego “leptos” que significa delgado) y al producto del gen *DB* es el receptor de la leptina, el cual es indispensable para su acción a nivel celular **(Ahima, 2000)**.

1.4.2 *Leptina humana*

La hormona leptina fue descubierta por Friedman en 1994, al clonar el gen *ob* en una línea celular de ratón obeso mutante donde el producto de dicho gen fue la leptina **(Halaas 1995, Zhang 1994, Considine 2001)**. El gen que codifica para leptina humana se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 específicamente en la banda 31.3 (7q31.3); el gen tiene más de 1500 pares de bases y tres exones separados por dos intrones, donde los exones 2 y 3 codifican la leptina, su región promotora está regulada por diversos elementos como el AMP cíclico o los glucocorticoides **(Ahima, 2000, Del Barrio 2002, San Miguel, 2005, Auwerx, 1998)**.

La leptina es una proteína de 146 aminoácidos que se produce a partir de un precursor de 167 aminoácidos el cual se trasloca a los microsomas eliminado el péptido señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, los cuales se separan antes de que dicha proteína pase a sangre (**Varnerin, 1998**). La proteína madura tiene un peso molecular de 16.2 kilodaltones (kDa) (**Jung-Hyun 2001, Chen-Jee 2010**). Se produce principalmente en tejido adiposo (**Sadowski 2002, Botella, 2001**) aquí la secreción se lleva a cabo a nivel subcutáneo. También se produce en hipotálamo, hipófisis, músculo esquelético, mucosa gástrica y epitelio mamario; también es sintetizada aunque en menor medida por células del hígado, estómago y placenta (**Houseknecht 1998**), por lo que su concentración en plasma se eleva durante el embarazo normal sobre todo en el segundo y tercer trimestre (**Del Barrio 2002, Ovies 1999, Sagawa 1997**).

1.4.3 Estructura de la leptina

La estructura tridimensional de la leptina presenta gran similitud entre las diversas especies, con un 84% de homología entre el humano y el ratón y un 83% entre el humano y la rata (**Zhang, 1997**). Estos residuos conservados pueden ser importantes para el mantenimiento de la integridad estructural de la proteína. Las cuatro regiones más conservadas son Asp9-Thr16, Met54-Ala59, Asp79-His88 y Tyr119-Gln130.

La leptina humana silvestre (en inglés wild-type, WT) presenta baja solubilidad en solventes acuosos, por lo que no ha sido posible encontrar condiciones experimentales para obtener su estructura cristalográfica por lo cual fue necesario obtener la mutante W100E la cual aumenta su solubilidad sin afectar su actividad biológica ya que es comparable a la WT. Esta proteína se pliega como un monómero formado por un conjunto de cuatro hélices- α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) similar al de las citocinas de clase I de hélice larga tales como: IL-6, IL-11, IL-12, LIF, G-CSF, CNTF y oncostatina

M, las cuales están conectadas por dos lazos largos ($\alpha 1-\alpha 2$ y $\alpha 3-\alpha 4$) y un lazo corto ($\alpha 2-\alpha 3$), ordenados en un conjunto helicoidal torcido hacia la izquierda (Figura 1.7). Las cuatro α -hélices están constituidas por $\alpha 1$, Pro2-His26; $\alpha 2$, Leu51-Ser67; $\alpha 3$, Arg71-Lys94 y $\alpha 4$, Ser120-Ser143. Los últimos cinco residuos de la hélice 4 (desde Gln139 a Ser143) forman una hélice 3_{10} torcida. Un gran centro cilíndrico hidrofóbico paralelo al eje del conjunto de hélices está formado por la mayoría de los residuos conservados (mencionados anteriormente) de las cuatro α -hélices que están frente a cada una. El conjunto de cuatro hélices adopta un plegamiento inusual arriba-arriba-abajo-abajo lo cual forma un empaquetado de dos capas de pares de hélices anti paralelas $\alpha 1$ y $\alpha 4$ contra $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Los residuos de Leu107-Glu115 forman la hélice E distorciónada, la cual se dobla pronunciadamente en medio de Gly111 y Gly112, empaquetándose casi perpendicularmente contra el conjunto de las cuatro hélices. Contiene un enlace de disulfuro intracatenario entre los aminoácidos 96 y 146 en la región carboxiterminal el cual es necesario para su actividad biológica ya que no solo estabiliza la proteína plegada, sino que también dirige la formación de la estructura anudada de la leptina (**Haglund 2013**).

Se ha sugerido que la leptina posee tres diferentes sitios de unión I, II y III que interactúan con el receptor de la leptina. El sitio de unión I, se encuentra en la región C-terminal de la hélice $\alpha 4$, se piensa que está involucrado en la unión con los dominios homólogos del receptor de citocina I ó II (CRH1 o CRH2) del receptor de leptina. El sitio de unión II, el cual se une al dominio CRH2 del receptor de leptina, está compuesto por los residuos de la superficie de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$. El sitio de unión III, el cual se une al dominio similar a inmunoglobulina (Ig) del receptor de leptina, está formado por residuos de la interfase entre el N-terminal de la hélice $\alpha 4$ y el lazo $\alpha 1-\alpha 2$. Aunque se piensa que el sitio de unión II es el principal sitio de unión con la afinidad más alta para el receptor de leptina, se ha sugerido que el sitio de unión III de la leptina es el responsable de la

formación de un complejo multimérico activo y la subsecuente activación del receptor (**Chen-Jee 2010**).

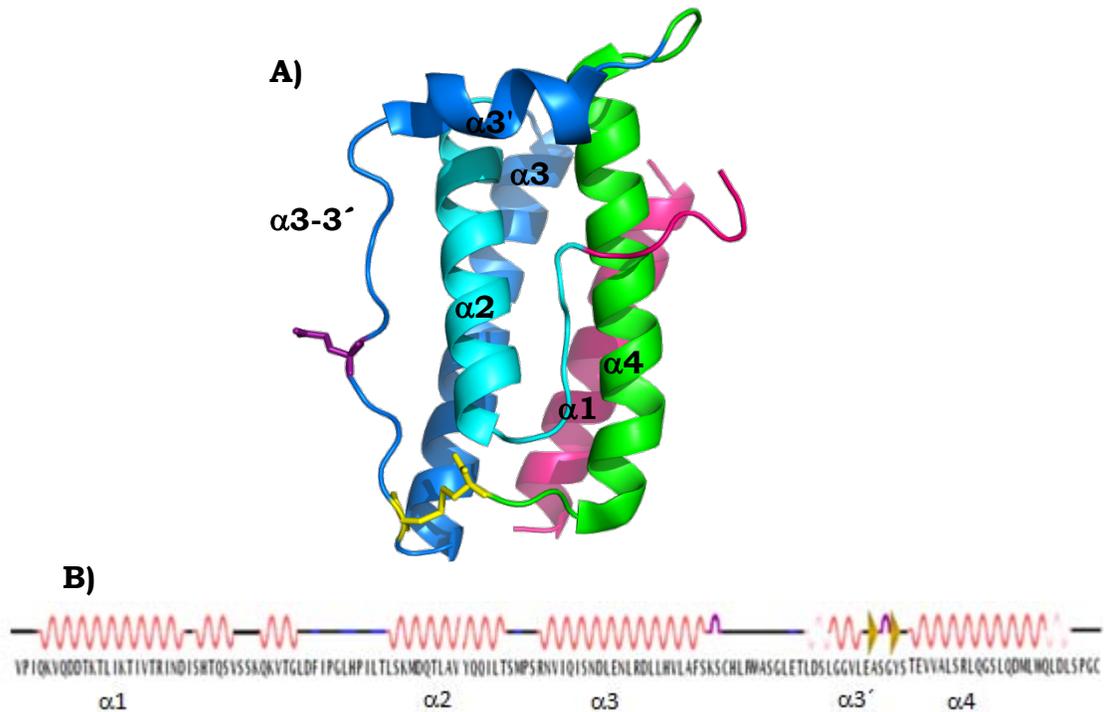


Figura 1.7 A) Representación en listones de la estructura de la leptina humana W100E (PDB 1AX8) en color rosa se representa la hélice $\alpha 1$, en cyan $\alpha 2$, en azul $\alpha 3$ y en verde $\alpha 4$, en color violeta se resalta al ácido glutámico en la posición 100 y en amarillo el puente de disulfuro entre los aminoácidos 96 y 146 (**Zhang 1997**). **B)** Representación de las estructuras primaria y secundaria en espiral indicando los principales dominios.

1.4.4 Funciones de la leptina humana

La leptina es una proteína que se ha visto relacionada con diversos padecimientos, sin embargo el descubrimiento de esta proteína ha tenido un profundo impacto en la comprensión de la obesidad. Además, varios estudios han demostrado el poderoso efecto estimulante de la leptina sobre el crecimiento, la proliferación y la migración de las células endoteliales, así como la acción promotora sobre la expresión de varios genes involucrados en la angiogénesis. También se ha encontrado correlación entre niveles elevados de leptina con la aparición de diversos tipos de cáncer **(Somasundar, 2004)**. Posiblemente, este es el fundamento de las asociaciones epidemiológicas entre la obesidad y el cáncer, establecidas de forma evidente en cáncer de seno y de colon. Además, con relación al cáncer de próstata se ha demostrado que niveles aumentados de leptina inciden no sólo sobre el desarrollo de malignidad **(Stattin, 2001)** sino sobre un peor pronóstico y enfermedad extra prostática, cuando la lesión maligna ya está establecida **(Chang, 2001)**. También la hiperleptinemia concurre con un mayor riesgo de cáncer de seno **(Tessitore, 2004)** ya que, parece existir una sinergia con los estrógenos, porque la leptina induce actividad en la aromatasa, enzima encargada de transformar otros esteroides en estrógenos dentro del tejido mamario. Adicionalmente, se han encontrado receptores para la leptina en las células cancerosas de seno y éstas a su vez poseen receptores estrogénicos, por lo que la hormona puede estimular su proliferación **(Dieudonne, 2002)**.

Por otro lado, se ha demostrado que la leptina promueve el crecimiento de las células epiteliales normales y malignas **(Hardwick, 2001)** lo que concuerda con la presencia de receptores hormonales expresados a todo lo largo del tracto gastrointestinal **(Morton, 1998)**. En este sentido, se dispone de evidencia sobre la relación existente entre hiperleptinemia y carcinomas de colon **(Stattin, 2003)** y de esófago **(Somasundar, 2003)**. También se ha observado que aumenta la expresión de leptina por

presencia del *Helicobacter pylori*, reconocido por su potencial carcinogénico **(Azuma, 2001)**.

En varias líneas celulares leucémicas linfoides y mieloides, ha sido identificando el mRNA de algunos subtipos del receptor de leptina, lo que explica que la hormona puede estimular la proliferación de dichas células tanto *in vivo* como *in vitro* **(Cioffi, 1996)**. Y se ha propuesto una posible relación entre la hiperleptinemia y el cáncer de vejiga **(Yuan, 2004)**. También se ha visto implicada a la leptina como modulador de la respuesta inmune, estimulando la producción de citocinas y la proliferación de linfocitos T CD4 **(Matarese, 2002)**, así como también en el desarrollo y actividad del sistema nervioso central (SNC). En estudios recientes se ha demostrado que el receptor de la leptina se expresa en otras áreas del cerebro no relacionadas directamente con el control alimentario, tales como cerebelo, corteza periforme y corteza cerebral donde la función de la leptina aún se desconoce.

En el hipotálamo, área crítica para el aprendizaje y la memoria, la leptina favorece la potenciación a corto y largo plazo, mediada por receptores de glutamato mediante mecanismos relacionados con la activación de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) **(Shanley, 2001)**.

Algunos investigadores han postulado que la hiperleptinemia es la explicación de la relación entre la obesidad y las enfermedades cardiovasculares **(Sowers, 2003)**. La leptina produce un aumento significativo de la actividad simpática, gracias a su acción central sobre el hipotálamo, posiblemente debido a que estimula la liberación de melanocortina y de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Así pues, la leptina es un posible regulador del tono vascular y por ende de la presión arterial, mediante sus efectos centrales sistémicos y periféricos locales. Aunque dichos efectos en apariencia se contrarrestan, pueden llegar a complementarse dentro del proceso de regulación global. Este hecho tendría relevancia en la patogénesis de la hipertensión arterial, que

ha sido usualmente asociada con la hiperleptinemia (**Coatmellec 2003**). También han intentado relacionar las enfermedades psiquiátricas con la leptina, motivados quizás por las asociaciones establecidas previamente entre algunas de ellas y la obesidad. Algunos estudios han hallado relación entre la hiperleptinemia y entidades tales como trastorno de personalidad limítrofe (**Atmaca, 2002**), esquizofrenia e intento de suicidio (**Atmaca, 2003**). Otros han vinculado la hipoleptinemia con la depresión (**Miller, 2003**) y con el síndrome de estrés postraumático persistente (**Liao, 2004**). Aunque los significados fisiopatológicos y clínicos de tales relaciones aún no se ha establecido con claridad.

1.4.5 Mecanismo de acción de la leptina

Este mecanismo se enfoca principalmente con la obesidad, la cual es causada por perturbaciones en el balance entre la ingesta de alimento y el gasto de energía, que es regulado por un complejo sistema fisiológico que requiere la integración de muchas señales periféricas y coordinación central en el cerebro.

La leptina es secretada principalmente, en el tejido adiposo posteriormente pasa al torrente circulatorio, viajando al hipotálamo donde se une con su receptor (LEPRb) el cual se produce en mayor cantidad en el núcleo arqueado provocando una disminución en la ingesta alimenticia y un aumento en el gasto energético ocasionando pérdida de peso (**Elmqvist, 1998**).

El núcleo arqueado es el principal sitio de acción de la leptina en el hipotálamo y tiene un papel esencial en este sistema que comprende dos poblaciones de neuronas blanco de la leptina: la primera forma parte de la vía orexigénica (inductora del apetito) y está constituida por neuronas productoras de AGRP (*del inglés A Gouti-Related Protein*) y neuropéptido Y (NPY). Varios estudios han demostrado que el aumento de NPY lleva a un aumento de la sensación de hambre y con ello a la hiperfagia y obesidad.

También hay evidencias de que la leptina impide la formación de NPY evitando indirectamente la obesidad. La segunda forma parte de la vía anorexigénica (inductora de saciedad) y comprende neuronas secretoras de proopiomelanocortina (POMC) y de su producto la hormona estimulante de melanocito-alfa (α MSH), así como por neuronas que liberan CART (*del inglés Cocaine and -amphetamine-Regulated transcript*). La POMC es procesada post-transcripcionalmente para producir un número de hormonas en el eje adrenal-pituitario-hipotalámico, tal como α MSH, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y endorfina. Estos neuropéptidos derivados de POMC, son agonistas fisiológicos del receptor de melanocortina-4 (MC4R). Normalmente la síntesis hipotalámica de α MSH es estimulada por un incremento del nivel de leptina y la señal generada por α MSH en MC4R, promueve el gasto de energía y decrece la ingesta de comida **(Bell 2005)**.

A partir de estos estudios se infiere que la leptina inhibe la vía orexigénica y estimula la vía anorexigénica. También interactúa con otras poblaciones de células reguladoras del apetito, como las neuronas que producen endocannabinoides, hormona concentradora de la melatonina y orexinas. Los individuos obesos, aunque presentan un alto nivel de leptina desarrollan de forma simultánea una resistencia a la acción de la hormona, posiblemente a causa del funcionamiento inadecuado de las cascadas de señalización intracelular asociadas con el receptor activado. Este hecho no permite que la hormona ejerza su acción anorexigénica y que además la leptina, *per se* no tenga utilidad clínica **(Bell 2005, Frühbeck 2006 Bates 2003, Sahu 2011, Zhang, 2006)**.

1.4.6 *Vía de señalización de la leptina*

Se han descrito diversas vías de señalización de la leptina. Una de las mejores descritas hasta el momento involucra a la cinasa Janus-2 (JAK2) y al transductor de señales y activador de la transcripción-3 (STAT3). A continuación se describen algunas de las conocidas, hasta el momento y otra vía involucra a fosfatidilinositol cinasa-3 (PI3K) y a la fosfodieterasa 3B (PED3B) (**Sahu, 2011**).

Vía JAK2-STAT-3: Esta vía es esencial para la transducción de señales de leptina, ya que la interrupción de esta vía en ratones resulta en un incremento en la ingesta de alimentos y acumulación de tejido adiposo (**Haynes, 2005**). El receptor de leptina pertenece a la familia de las citocinas clase 1 (receptores de IL-6). Los receptores de citocinas no poseen actividad enzimática intrínseca, pero realizan la señalización a través de la unión no covalente con un miembro de la familia de cinasas Janus. Se han identificado cuatro miembros de la familia JAK (JAK1-3 y Tyk2). ObRb se asocia y activa JAK2, el cual se requiere para la señalización de ObRb (**Bates, 2003**). ObRb, como todos los receptores de citocina funcionales contiene un motivo rico en prolina “Caja1 (Box 1)” que se requiere para la interacción y activación de JAKs. Adicionalmente, secuencias menos conservadas que se localizan en el extremo C-terminal de Box 1, referidas como “Caja 2 (Box 2)”, también son importantes para las interacciones con JAKs y probablemente funcionan en la selectividad de las isoformas de JAK. En el caso de ObRb, los residuos 31-36 componen la Caja 2. La región Caja2 presenta un motivo conservado que media la asociación con JAK2, el cual no se encuentra en las isoformas de ObR cortas. El ObRb no ligado existe como un homodímero preformado, la unión de leptina altera la conformación de éste, el cual permite la transfosforilación y activación intracelular de JAK2 asociado a ObRb. JAK2 activado fosforila a su vez a otros residuos de tirosina en el complejo ObRb-JAK2 para mediar la

cascada de señalización descendiente (**Bates, 2003**). El complejo ObRb-JAK2 activado recluta a STAT3. STAT3 se fosforila, dimeriza y transloca del citoplasma al núcleo donde se une con genes específicos como POMC (propiomelanocortina) y NPY/AGRP (*del inglés A Gouti-Related Protein*) neuropéptido Y) para regular su expresión (Figura 1.8). La leptina también estimula a SOCS3, (suppressor of cytokine signaling 3), el cual actúa como inhibidor de actividad de JAK2. Hay mucha evidencia que sugiere que la señalización de leptina a través de STAT3 es crítica para el mantenimiento normal de la homeostasis energética. La leptina también estimula la fosforilación de STAT5 en el hipotálamo, la eliminación de STAT5 en el cerebro provoca resistencia a la leptina, hiperfagia y obesidad, aunque en menor efecto que la eliminación de STAT3, lo que sugiere una contribución de la vía de STAT5 en la homeostasis energética y regulación del peso corporal (**Sahu, 2011, Bates, 2003**).

La vía PI3K-PDE3B-cAMP ha demostrado que además de la señalización de la leptina a través del mecanismo JAK2-STAT3, podría también llevarse a cabo un vía de señalización que involucra la estimulación de PI3K. Algunas de las evidencias experimentales para apoyar esta vía de señalización son:

- (i) la señalización vía PI3K en el núcleo ventromedial del hipotálamo se requiere para la homeostasis de energía bajo condiciones normales
- (ii) la supresión de la leptina en la lipogénesis del tejido adiposo blanco es dependiente de la señalización hipotalámica de PI3K, y
- (iii) la señalización vía PI3K en las neuronas POMC del hipotálamo contribuye a la regulación de la homeostasis de la glucosa

En este mecanismo, la leptina también podría activar a PI3K y a la fosfodiesterasa-3B (PDE3B), y reduce los niveles de AMP cíclico (cAMP). La

disminución de los niveles de cAMP podrían estar relacionados con la activación de STAT3 por la leptina, ya que la inhibición de PDE3B invierte este efecto de la leptina en el hipotálamo. También la activación de PDE3B por la leptina podría modificar (aumentar o disminuir) los niveles de expresión de POMC, NPY y otros genes. SOCS3 actúa como un regulador negativo tanto de la STAT3 y las vías PI3K de señalización de la leptina en el hipotálamo, un mecanismo que juega un papel significativo en el desarrollo de resistencia a la leptina central y la obesidad inducida por la dieta.

Aún falta por determinar la relación entre las vías de señalización de la leptina, por ejemplo si las vías JAK2-STAT3 y PI3K-PDE3B-cAMP podrían llevarse a cabo en las mismas neuronas y en su caso como se coordina dicha señalización tanto en condiciones normales como fisiopatológicas **(Sahu, 2011)**.

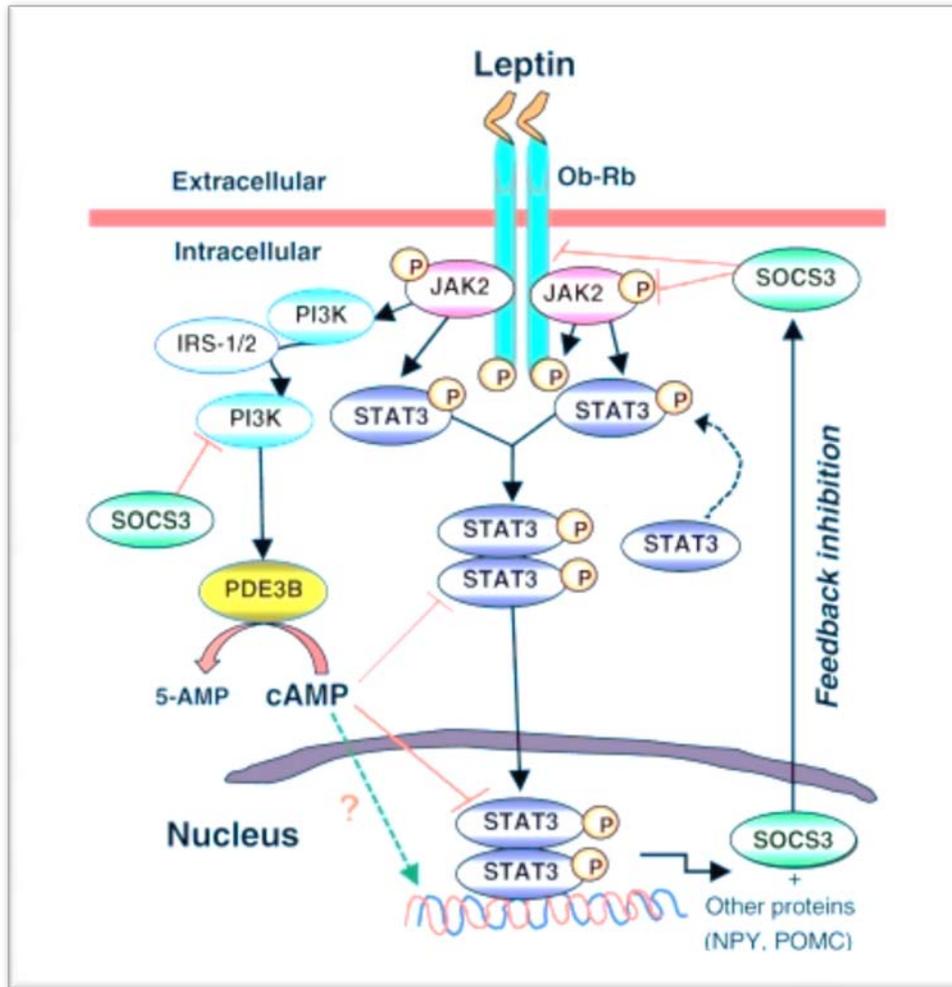


Figura 1.8 Representación esquemática de las vías de señalización intracelular leptina-ObRb.

1.4.7 Resistencia a la leptina

El fenómeno de resistencia a la leptina surge debido a que la mayoría de los pacientes obesos presentan altos niveles de leptina circulante y no responden a la administración de esta. **(Sahu, 2011)**.

Se han propuesto dos hipótesis importantes de resistencia a la leptina para explicar la obesidad, la obstrucción de la entrada de leptina en la barrera hemato-encefálica y la extinción de la cascada de señalización intracelular de las isoformas largas de los receptores de leptina en el hipotálamo **(Sayta, 2008)**.

La leptina se detecta en dos componentes del cerebro: en el fluido cerebroespinal y en el parénquima. Su localización en estos sitios deriva de la circulación periférica y síntesis dentro del cerebro. La isoforma corta del receptor de la leptina se localiza en el endotelio de la vasculatura y epitelio del plexo coroideo de los órganos circunventriculares⁹, probablemente transportando la leptina a través de la barrera hemato-encefálica (BBB, del inglés blood-to-brain barrier), siendo de esta forma un sistema de transporte unidireccional de leptina. Existe una variedad de factores endógenos que modifican la dinámica de la entrada de leptina a través de la barrera. Uno de ellos es la entrada de la leptina en el cerebro esta temporalmente correlacionada con las fluctuaciones circadianas de los niveles de leptina, el transporte reducido de leptina a través de la BBB asociado a niveles bajos de leptina circulante debido a privación de la alimentación o restricción calórica también se ha observado que el envejecimiento en ratones afecta la disponibilidad de leptina en el sistema nervioso central. Lo que sugiere que la resistencia a leptina se puede adquirir. También se ha visto que en roedores obesos jóvenes y humanos hiperleptinemicos con dietas altamente energéticas, el suministro de leptina se encuentra reducido a varios sitios hipotalámicos y extrahipotalámicos, que ciertas hormonas circulantes modulan el sistema de transporte de la BBB afectando la disponibilidad de leptina en el SNC. Por ejemplo:

agonistas α -adrenérgicos epinefrina, insulina y glucosa aumentan y los triglicéridos inhiben el transporte de leptina a través de la BBB. Finalmente a pesar de que en la obesidad los niveles séricos de leptina se encuentran elevados, la concentración de leptina periférica es próxima a cuatro veces más alta en obesos comparada con individuos delgados; los niveles de leptina en el fluido cerebroespinal (CSF) no parecen estar elevados apropiadamente observándose una proporción reducida entre la leptina de CSF y leptina periférica en los individuos con obesidad. Esto se debe posiblemente a una saturación en el mecanismo de transporte debido a altos niveles de leptina y una resistencia de los receptores de leptina de la BBB adquirida en la obesidad, reduciéndose de esta manera el transporte a través de la misma. En presencia de hiperleptinemia, la respuesta esperada es una disminución en la ingesta calórica y un aumento en el gasto energético, sin embargo en la mayoría de los seres humanos con obesidad es probable que no haya una producción de leptina endógena. Una segunda implicación es que la administración exógena de leptina para tratar la obesidad podría ser inefectiva ya que la leptina endógena ha saturado el sistema de transporte **(Satya 2008; Banks 1999, Schulz 2004, Caro 1996)**.

La resistencia a la leptina también puede ser resultado de la inducción de SOCS3, y/o activación de la proteína tirosina fosfatasa-1B. La leptina activa las vías JAK2/STAT3 al unirse a al receptor de leptina. Adicionalmente la leptina activa SOCS3, supresor de la señalización de citocina-3, el cual reduce la señalización intracelular inhibiendo la actividad de JAK2. SOCS3 pertenece a la familia de inhibidores inducibles por citocinas de la señalización que incluye a las proteínas que contienen un dominio SH2 inducible por citocina (CIS) y SOCS1-7. La sobreexpresión de SOCS-3 se ha propuesto como mecanismo potencial de resistencia a la leptina ya que provoca la disminución de la señalización intracelular inducida por la leptina, provocando alimentación excesiva y reducción del

gasto energético. Otra vía inhibitoria involucra a PTP-1B. Se ha demostrado que tanto SOCS3 y PTP1B disminuyen la sensibilidad y respuesta a leptina en estudios *in vitro* e *in vivo* (**Ahima 2004, Satya 2001, Hölter 2007**).

1.4.8 Mutaciones en el gen de la leptina

Cabe mencionar que las mutaciones en el gen que codifica para leptina son poco frecuentes, sin embargo se han reportado algunas: Tal es el caso en dos adultos turcos quienes presentaban obesidad mórbida, hipogonadotropismo, hipogonadismo y niveles bajos de leptina en suero identificando subsecuentemente una mutación Mendeliana recesiva en el gen de la leptina que consiste en la sustitución de C-T en el codón 105 del gen de la leptina, resultando en Arg-Trp en la proteína madura (posición R84W) la mutación produce una proteína que es procesada anormalmente durante su vía secretoria y por lo tanto no es secretada en el medio. (**Paz-Filho 2010**), esta sustitución también se observó en ratones C57B1/6J *ob/ob*, donde se sustituye una C-T dando como resultando un codón de paro en donde en lugar de producir una Arg produce una proteína que es incapaz de ser secretada (**Ahima 2000**).

Por otro lado la primera deficiencia congénita se identificó en dos niños con obesidad extrema y con el mismo pedegree consanguíneo de origen pakistaní, presentaban un fenotipo similar al de los ratones *ob/ob*: obesidad severa, hiperfagia, hiperinsulinemia y niveles circulantes de leptina no detectables, sin embargo los pacientes a diferencia de los ratones no mostraban hipercortisolemia, hiperglicemia o alteración del crecimiento lineal. En análisis de secuenciación en ambos pacientes mostraron ser homocigotos para una mutación en el marco de lectura del gen de la leptina que consiste en la delección de un nucleótido de guanina normalmente presente en el codón 133. La mutación interrumpe el marco de lectura del gen de la leptina, introduciendo 14 aminoácidos aberrantes después del

residuo Gly132 en el polipéptido nativo, seguido de un codón de paro prematuro, donde la leptina que se produce es incapaz de ser secretada por los adipocitos, **(Montague, 1997)**

Otra mutación reportada es la de un paciente egipcio que presentaba niveles muy bajos de leptina sérica, hiperfagia, obesidad severa, hiperinsulinemia además de alteración en el almacenamiento de glucógeno experimentos de secuenciación directa de la región codificante del gen de la leptina reveló una mutación con cambio de sentido, N103K (N82K de la proteína madura) resultado en la sustitución de asparagina (AAC) por lisina (AAA) en el codón 103. Las mutaciones N82K y R84W se encuentran en la región que es responsable de la unión al receptor y actividad biológica **(Mazen, 2009)**. La mutación N82K es la única mutación humana que se ha demostrado que interrumpe la unión con el receptor **(Chen-Jee, 2010)**. En pacientes rusos se han encontrado las sustituciones S120C y C120 estas impiden la formación del puente de disulfuro alterando la actividad de la leptina **(Chekhranova, 2008)**.

Recientemente se identificó una nueva mutación en el gen de la leptina L72S (L51S de la proteína madura) en una portadora homocigota, la cual presentaba niveles séricos indetectables de leptina, hiperinsulinemia, incremento de transaminasas, dislipidemia e hipogonadismo hipogonadotrópico con detención del desarrollo pubertal. En contraste con las demás publicaciones de pacientes con obesidad debido a mutaciones en el gen de la leptina, esta paciente mostraba obesidad leve (debido a control en la ingesta calórica) y sensibilidad normal de células T **(Fischer-Posovszky 2010)**.

1.5 Antecedentes

La leptina humana es una hormona que se ha visto implicada en diversos procesos fisiopatológicos y se ha propuesto como agente terapéutico para la pérdida de peso. Se han reportado diversos estudios que han demostrado que la administración de leptina exógena, resulta en la disminución de tejido graso tanto en animales como en humanos, que presentan una deficiencia genética de leptina.

Por otro lado hay pocos reportes en la literatura de estudios relacionados con la estabilidad de la leptina y por lo tanto se desconocen factores o condiciones que puedan afectar la estabilidad conformacional y estructural de dicha proteína. El único reporte donde se ha evaluado la estabilidad de la leptina mediante el desplegamiento inducido por cloruro de guanidinio (GdnHCl) y medido por fluorescencia, describe a la reacción de desplegamiento de la leptina con un modelo de dos estados (Nativo, N y desnaturalizado, U, $N \rightarrow U$) con un cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) de $1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la WT reducida y de $3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la WT oxidada observado que el puente de disulfuro no solo estabiliza la proteína sino que también describe la estructura anudada de la proteína (**Haglund, 2012**).

Uno de los problemas más comunes actualmente es la obesidad, y el descubrimiento de la hormona leptina ha tenido un profundo impacto en la comprensión de esta, debido principalmente a la reducción de peso por efecto de la leptina en ratones incapaces de producir la hormona leptina (ratón *ob/ob*), sin embargo la utilización de esta hormona como tratamiento en los seres humanos es limitada.

No obstante en 1997, Montague y cols. reportaron dos niños de origen pakistaní con gran consanguinidad, que presentaban déficit de leptina, hiperfagia y obesidad severa (**Montague, 1997**), posteriormente Sadaf Farooqi y col, en el 2002 identificaron otro niño de origen pakistaní con déficit de leptina, estos niños fueron tratados entre 10 y 50 meses con R-metHuLeptin (recombinant methionyl Human Leptin) administrada

subcutáneamente una vez al día, donde la dosis inicial se calculó para alcanzar el 10% previsto a la concentración de leptina sérica según la edad, el género, y el porcentaje de grasa corporal, tras dos semanas de tratamiento los tres niños perdieron peso y esta pérdida prosiguió y se mantuvo durante todo el tiempo de tratamiento, aunque aparecieron algunas etapas refractarias a la pérdida de peso. En los tres niños disminuyó la hiperfagia en los dos primeros meses de tratamiento pasado este tiempo coincidían períodos donde ganaban peso por aumento de la ingesta; sin embargo, esto se solucionaba aumentando la dosis de leptina subcutánea. Otro hecho remarcable tras la administración de leptina es la disminución de las concentraciones de insulina plasmática así como la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos. La presencia de niveles adecuados de leptina en humanos es imprescindible para un correcto desarrollo puberal ya que el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal se ve influenciado por la leptina circulante. Otro campo en el que la leptina parece tener un papel fundamental es en el sistema inmunológico. Estudios recientes demuestran que la administración de leptina podría mejorar estados de inmunodeficiencia **(Farooqi, 2002)**.

Por otro lado, se realizó, un estudio en donde también se utilizó como tratamiento la leptina recombinante, esta se administró en ratones hembra *ob/ob* con déficit de leptina, aplicándoles subcutáneamente 0.15 mg/kg/día de leptina recombinante, donde se observó después de 13 días de tratamiento la pérdida de peso en un 30% **(Zamorano 1997)**.

Otro estudio reportó que la administración intraperitoneal de leptina de ratón y leptina humana recombinante (5 µg/g/día) en el ratón *ob/ob* producía una reducción de peso de aproximadamente el 30% después de 33 días de tratamiento, sin aparente toxicidad. La eficacia de la proteína humana recombinante fue equivalente a la proteína de ratón recombinante observándose una pérdida de peso debida exclusivamente a la reducción de tejido adiposo **(Halaas 1995)**. Otro estudio probó los efectos de la leptina de

ratón recombinante en ratones *ob/ob* y en ratones con obesidad inducida por dieta (DOI) observando una pérdida de peso dependiente de la dosis administrada, sin embargo, el tratamiento con la proteína recombinante al ser probado en ratones control de peso normal mostró solo una leve reducción en la ingesta de comida (**Campfield, 1995**). Por otra parte realizaron transferencia de adenovirus, con el gen insertado de leptina en ratas normales y de igual forma observaron una disminución del tejido graso dentro de los primeros 7 días además observaron que la pérdida de grasa durante la hiperleptinemia no se acompañó de elevación plasmática de ácidos grasos libres o cuerpos cetónicos. Sugiriendo que los ácidos grasos son oxidados dentro de los adipocitos de las ratas hiperleptinémicas, y de esta forma la hiperleptinemia inducida puede convertir los adipocitos de ser células almacenadoras de grasa en células quemadoras de grasa (**Wang, 1999**).

Por otro lado, se reportó que la administración exógena de leptina, en tres pacientes adultos con la mutación R84W, resulta en la pérdida de peso, normalización endocrina y se produjo una reducción del 50% de la ingesta alimenticia. Observándose que la leptina reduce la activación del cerebro en las regiones ligadas con el hambre y aumenta la activación de las regiones ligadas a la inhibición y saciedad (**Baicy, 2007**).

La terapia con leptina en pacientes con deficiencia congénita de esta hormona muestra resultados muy notorios. Sin embargo, las mutaciones que provocan deficiencia en la síntesis de leptina son muy raras, por lo que la mayoría de las personas obesas presentan concentraciones altas de leptina sérica lo que sugiere que la administración exógena de leptina podría resultar inefectiva para su uso en el tratamiento de obesidad.

Sin embargo, un estudio realizado en individuos con un amplio rango de pesos corporales, mostró que los individuos tanto delgados como obesos respondieron a la administración exógena de leptina, recombinant methionyl human leptin (rL metreleptin). Se observó una relación de

respuesta dependiente de la dosis con la pérdida de peso. Basado en este estudio, se demostró que la administración exógena de leptina induce la pérdida de peso en sujetos con obesidad aun con concentraciones elevadas de leptina endógena. Estos resultados no sugieren una resistencia a la leptina absoluta en individuos obesos con leptina endógena elevada, sino que dosis más altas de leptina exógena pueden requerirse para proveer la señal suficiente para la pérdida de peso en sujetos con mayor adiposidad **(Heymsfield, 1999)**.

En general, se ha observado una baja eficiencia empleando leptina recombinante debido a su limitada solubilidad a pH fisiológico lo cual puede contribuir a la precipitación de la proteína en el sitio de inyección, así como a la vida media de la proteína recombinante circulante muy corta.

Recientemente se han realizado estudios donde utilizan a la leptina como agente terapéutico contra la diabetes mellitus tipo I. La diabetes *mellitus* (DM) es un síndrome donde se altera el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. Se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre y la baja producción de la hormona insulina, la cual es secretada en las células β del páncreas.

Actualmente la DM es clasificada según la OMS en diabetes *mellitus* tipo I, diabetes *mellitus* tipo II y diabetes gestacional, por otro lado la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la clasifica en diabetes *mellitus* tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional y otros tipos de diabetes como diabetes tipo 3A defecto genético de las células β , tipo 3B resistencia a la insulina determinada genéticamente, 3C enfermedades del páncreas, 3D causadas por defectos hormonales y 3E causada por compuestos químicos o fármacos.

Es importante mencionar que la diabetes *mellitus* tipo I es una de las enfermedades más comunes en niños la cual suele empezar a los 14 años de edad y se caracteriza por la nula producción de insulina debido a la

destrucción autoinmune de las células del páncreas que se origina principalmente por factores genéticos y puede empezar de manera muy brusca en días o semanas con secuelas esenciales como hiperglucemia, aumento de la utilización de las grasas como fines energéticos y la síntesis de colesterol en el hígado y reducción de las proteínas orgánicas (**Barnard 2010**) comúnmente su tratamiento se basa en la administración de insulina vía subcutánea Sin embargo, estudios recientes han revelado que la hormona leptina juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa ya que la leptina podría sustituir a la insulina en el control de los niveles de glucosa en sangre en pacientes con diabetes *mellitus* tipo I generando, inclusive menos efectos secundarios. Esto se comprobó en un modelo animal de diabetes *mellitus* tipo I, en el que se realizaron estudios de control de glucosa empleando por un lado un tratamiento a base de leptina y por otro uno basado en la utilización de insulina donde pudieron observarse reducciones similares de glucosa en sangre, así como de otros metabolitos característicos de hiperglicemia en orina, tales como glucosa y cuerpos cetónicos. En este estudio se evaluó también el efecto de leptina sobre la capacidad de insulina de reducir los niveles de glucosa, encontrándose una potenciación del efecto de insulina; observaron que combinar dosis bajas de leptina y dosis bajas de insulina generan un efecto similar al encontrado cuando se emplean altas dosis de insulina únicamente, sugiriendo que leptina puede utilizarse como complemento en terapias convencionales de insulina. Los roedores tratados con leptina presentaron además bajos niveles de ácidos grasos y enzimas de la biosíntesis del colesterol, que los controles tratados con insulina. Es importante destacar que dado que leptina ha permitido reducir la utilización de insulina y ha mostrado una alta capacidad para disminuir niveles de glucosa en sangre, podría pensarse en un uso potencial en terapias con pacientes que requieren altas concentraciones de insulina para regular sus niveles de azúcar.

Justificación

La leptina humana es una hormona que se ha visto implicada en diversos procesos fisiopatológicos y se ha propuesto que puede tener un uso terapéutico potencial, en el tratamiento de la obesidad.

Sin embargo la utilización de esta hormona como tratamiento en los seres humanos aún es limitada, ya que se desconocen los factores y las condiciones que pueden afectar su estabilidad conformacional y por lo tanto su función biológica.

Por ello, en este trabajo proponemos generar variantes de la leptina humana realizando un enfoque específico de la mutante W100E y analizar su estabilidad en distintos ambientes fisicoquímicos. Así como también evaluar el efecto de estas mutantes y con ello facilitar el uso de la leptina en el tratamiento de la obesidad.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la estructura, la estabilidad y la función de la leptina humana silvestre y su mutante W100E para su posible uso en el tratamiento de la obesidad

Objetivos particulares

1. Analizar la estructura tridimensional y el espacio conformacional de la leptina humana y su mutante W100E, identificando aminoácidos importantes para su estabilidad y funcionalidad
2. Describir la estabilidad el mecanismo de plegamiento/desplegamiento de la leptina humana silvestre y su mutante W100E mediante técnicas *in vitro* e *in silico*.
3. Evaluar el efecto de las mutantes específicamente de la mutante W100E de la leptina humana sobre el peso corporal y perfil lipídico en un modelo murino de obesidad.

Nota: Paralelamente al cumplimiento de estos objetivos, en este trabajo de tesis se obtuvieron un conjunto de mutantes de la leptina humana con mayores efectos de reducción de ingesta y peso corporal en los ratones y que también se estudió su conformación, estabilidad y espacio conformacional. Sin embargo, los resultados referentes a dichas mutantes no se presentan en este documento debido a que están en un proceso de protección intelectual y posterior posible transferencia de tecnología a una empresa farmacéutica interesada.

Capítulo 2
Materiales y métodos

2. Materiales y Métodos

2.1. Modelado por homología de la leptina humana WT y W100E

Para obtener las coordenadas iniciales de la leptina humana WT y W100E nosotros construimos modelos tridimensionales utilizando el servidor I-TASSER (**Zhang Y. 2008**). Utilizando como templado la estructura cristalográfica de la leptina W100E reportada en el protein data bank (PDB) código: 1AX8 (**Zhang, 1997**), I-TASSER predice la estructura completa de la leptina por la combinación de hebras y modelado *Ab initio* donde la secuencia de cada construcción es sometida independientemente por al servidor I-TASSER obteniendo cinco modelos para cada proteína. También se predijo la estructura utilizando los programas Modeller (**https://salilab.org/modeller/**, **N. Eswar., 2006, Webb. 2014**) y MOE (**Molecular Operating Environmet versión 2008.10.**) para efectos de comparación.

Para elegir el mejor modelo fue necesario evaluar la calidad estereoquímica analizando diferentes criterios, tales como gráficos de Ramachandran (**Laskowski, 1993, 1996**), desviación cuadrática media (RMSD) así como también se evaluó la propensión de las cadenas del modelo a estar ocultas o expuestas al solvente mediante el servidor SOLVX (**Holm, 1992**). Otro criterio a evaluar es el perfil tridimensional de acuerdo al entorno de cada aminoácido, tomando en cuenta el entorno de 68 proteínas bien estructuradas que constituyen una base de datos y la cual se divide en tres contribuciones: 1) fracción de área oculta, 2) fracción de área debida a átomos polares y 3) estructura secundaria de los vecinos VERIFY3D (**Lüthy, 1992**). También se evaluó el grado de compactación del modelo con respecto al grado de compactación de una proteína bien plegada de acuerdo

a la base de datos del servidor ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment). Finalmente el servidor PROCHECK analiza las características geométricas de un modelo desde la construcción de su mapa de Ramachandran, hasta el cálculo teórico de la resolución que tendría la estructura del modelo si se hubiera obtenido por difracción de rayos X. Por otro lado permite identificar los aminoácidos que no cumplen con los valores de longitud de enlace, ángulo entre tres átomos y ángulos diedros phi, psi y omega (**Laskowski, 1993, 1996**). El potencial electrostático de la superficie de las moléculas fue calculado por la ecuación de Poisson Boltzman y por el plugin del programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

2.2 Análisis de los modos normales de vibración

Los modos normales de vibración de baja frecuencia fueron analizados usando un modelo en red implementado con el “rotation-translation-block” mediante el servidor ElNemo. Este servidor identifica los cambios conformacionales de una proteína (**Suhre, Sanejouand. 2004**). En este trabajo los modos normales de vibración se realizaron para ambos modelos de leptina utilizando los siguientes parámetros: DQMIN= -100, DQMAX= 100, DQSTEP= 20 y NRBL= auto, nosotros analizamos las características estructurales, colectividad de los movimientos atómicos de un total de 106 modos normales de baja frecuencia.

2.3 Simulación de Dinámica Molecular

Las SDM fueron realizadas con GROMACS 4 (**Hess, 2008**) usando el campo de fuerza OPLS-AA (**Jorgensen 1998**). Se utilizó el algoritmo denominado “salto de rana” para la integración de las ecuaciones de Newton y se aplicaron condiciones de contorno periódicas. La proteína fue solvatada en una caja rectangular de SPC de agua (**Berendsen, 1981**), con una distancia mínima de 1 nm de la proteína al borde de la caja. Para obtener una carga

neutra en el sistema se agregaron cuatro iones Na^+ tanto para la W100E y WT. Los tamaños totales del sistema fueron de 23073 y 23160 átomos incluyendo 6933 y 6536 moléculas de agua para W100E y WT respectivamente; todos los puentes fueron construidos usando LINCS (**Hess, 1997**). Durante la minimización de energía se utilizó el algoritmo de máxima pendiente y la convergencia se alcanzó en 200 pasos, además de que el equilibrio del sistema se llevó a cabo en 500 pasos (10 ps) de DM con átomos de proteína restringidas y condiciones de NVT con un tamaño de caja de 5,73, 6,003 y 6,868 para W100E y 5.72, 5.785 y 6.963 para WT. Posteriormente, ambos sistemas fueron sometidos al mismo protocolo, a partir de 20 ns de DM a 300 K, sin fijación alguna de átomos. El resultado se utiliza como punto de partida de 20 ns de MD a 400 K, y el resultado de esto fue usado como partida punto de 20 ns de MD a 500 K. Las SDM se realizaron con un paso de tiempo de 2 fs en condiciones de NPT de modo que el tamaño de la caja podría fluctuar para mantener la presión a un valor constante y las coordenadas para todo el sistema se salvaban cada 250 pasos. El algoritmo PME (**Essmann, 1995**) se utilizó para las interacciones electrostáticas con un punto de corte de 1 nm, y una rejilla recíproca de 0,12 células se utilizó con el fin cuarto de interpolación B-spline. Un solo punto de corte de 1 nm se utilizó para el cálculo de las interacciones de van der Waals. La temperatura y la presión de acoplamiento se llevaron a cabo con el algoritmo Nose'-Hoover (**Nose' 1984, Hoover, 1985**) y el algoritmo Parrinello-Rahman, (**Parrinello, 1981, Nose', 1983**) respectivamente. Después de la estabilización del sistema, en todos los casos, la energía potencial se conserva durante las simulaciones MD. Las herramientas de análisis incluidos en GROMACS se utilizaron para calcular el RMSD, FMR, R_g y SASA. La evolución de la estructura secundaria se siguió usando el programa DSSP (**Kabsch 1983**). Las representaciones gráficas de los modelos se obtuvieron usando VMD 1.9.1 (**Humphrey 1996**).

2.4 Predicción de tendencia desordenada

Se realizó la predicción de regiones desordenadas intrínsecamente no estructuradas tanto para la leptina WT y W100E usando el algoritmo IUPred que se basa en las que se basa en la suposición de que las regiones intrínsecamente desordenadas o proteínas no son propensos a veces debido a su incapacidad para formar suficientes estabilizadores interacciones inter-residuo (**Dosztányi, 2005**). Se empleó el conjunto de parámetros adecuados para la predicción de regiones desordenadas cortas.

2.5 Subclonación de la leptina humana W100E en el vector de expresión pET19 b modificado.

El gen que codifica para la leptina humana variante soluble (W100E) se encuentra clonado en el vector de expresión pET-28a, entre los sitios de restricción NdeI y XhoI. Dicho gen se subclonó al vector de expresión pET19b modificado (pET19bm), que contiene un gen de resistencia a Ampicilina, un sitio poli-linker, la secuencia del Operón lac controlada por el promotor T7. Además presenta un tracto de 10 histidinas en el extremo N-terminal el cual permite la purificación de la proteína recombinante por medio de cromatografía de afinidad a Níquel. También cuenta con un sitio de proteólisis para la proteasa denominada Prescission Protease (PPS, GE Healthcare) que permite la eliminación del tracto.

Para realizar la subclonación fue necesario obtener el plásmido pET-28a que contiene clonado el gen de la leptina por medio del GeneJET Plasmid Miniprep Kit a partir de un precultivo líquido (5 ml) en medio Luria Bertani. El plásmido purificado fue sometido a restricción enzimática utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI (Fast Digest, Thermo Scientific). El producto liberado fue purificado a partir del gel de agarosa utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit, el mismo procedimiento se realizó para

obtener el vector de expresión pET19bm liberado. Ambos productos fueron ligados utilizando 2.5 U de la enzima T4 DNA-ligase.

El producto de ligación se utilizó para transformar por choque térmico a las bacterias DH5- α competentes, de las colonias crecidas se extrajo el DNA plasmídico y se realizó restricción enzimática con las enzimas NdeI y XhoI, los plásmidos que liberaron un producto de ~438 pb aproximadamente se analizaron por secuenciación, una vez comprobada la subclonación, el plásmido se utilizó para la obtención de la mutantes.

Todas la enzimas y kits utilizados para la subclonación fueron de la casa comercial Fermentas-Thermo scientific.

2.6 Obtención de la mutante W100E

La secuencia de DNA que codifica para la leptina humana fue mutada por medio de mutagénesis dirigida utilizando el kit QUIKCHANGE® Site-directed Mutagenesis Kit de QIAGEN donde se sustituyó un triptófano (codón TTG) en la posición 100 por un ácido glutámico (codón GAG), usando los oligonucleotidos Fw 5' AGC TGC CAC TTG CCG GAG GCC TCT GGC CTG GAG 3' y Rv 5' CTC CAG GCC AGA GGC CTC CGG CAA GTG GCA GCT 3' por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Las enzimas utilizadas para la obtención de las mutantes fueron de la casa comercial Fermentas-Thermo scientific y el DNA plasmídico se secuenció para comprobar la obtención de la mutante W100E, la cual se tradujo utilizando el programa BioEdit (Ibis Biosciencie).

2.7 Sobreexpresión

Para la sobreexpresión de leptina W100E se utilizó el plásmido de una de las clonas positivas con la secuencia correcta, para transformar células competentes *E. coli* cepa BL21pLYSDE3 en medio LB complementado con $100 \mu\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. Las bacterias transformadas se incubaron a 37°C a 200 rpm, la sobreproducción de la proteína se indujo cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm (1 cm de recorrido óptico) era cercana a 0.6 mediante la adición del inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídico (IPTG), a una concentración final de 1.0 mM. El crecimiento celular se continuó por 18 horas a 37°C simultáneamente. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos, donde el paquete celular obtenido se resuspendió en buffer de lisis para purificación de proteínas en condiciones nativas 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 8.0, consecutivamente se rompieron las células por medio de sonicación, utilizando un equipo ultrasonic processor, a una frecuencia de 60%, aplicando de 6 a 8 ciclos con una duración de 10 segundos con intervalos de reposo de 10 segundos, el lisado celular se centrifugo a 12,000 rpm durante 1 h, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se almacenó a -80°C para su purificación.

2.8 Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación de las mutante W100E se realizó a partir de los cuerpos de inclusión mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Niquel-Agarosa (Ni-NTA Agarose de Qiagen) previamente equilibrada con buffer de unión (50 mM de imidazol, 50 mM NaCl y PBS 1X). Se aplicó el dializado en una relación ($V_{\text{columna}}: V_{\text{muestra}}$) (1:5) y se lavó la columna utilizando 40 ml del buffer de unión. Posteriormente se eluyó con buffer de elución (250 mM de imidazol, 50mM NaCl, y PBS 1X) complementado con

0.2 mM de glutatión oxidado y 2 mM de glutatión reducido pH 8.0. La unión, lavados y elución se llevaron a cabo con un flujo de 1.0 ml/min.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico de las marcas US Biological, Probiotek, J. T. Baker, Sigma y Research Organics. En la preparación de todas las soluciones se utilizó agua bidestilada, desionizada y filtrada.

2.9 Eliminación del tracto de histidinas por cromatografía de intercambio iónico

Para remover el tracto de histidinas, la proteína purificada fue dializada con buffer de fosfatos (10 mM KH_2PO_4 , 10 mM K_2HPO_4 pH 8.0) y tratada con la proteína de fusión PPS PreScission Protease (GE Healthcare Life Science) adicionando un promedio de 30 a 100 μl por 40 ml de proteína, el corte fue realizado de 16-18 hrs a 4°C, el corte del tracto de histidinas se analizó mediante SDS-PAGE (Sección 2.10), después de observar el corte de la proteína esta fue filtrada usando un filtro de 0.22 μm y se separó por cromatografía de intercambio iónico de alta resolución utilizando el equipo 1220 Infinity LC HPLC (Agilent Technologies). La proteína concentrada y filtrada fue cargada en una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) pre-equilibrada con buffer de fosfatos pH 8.0 y se eluyó con un gradiente de 0 a 1.0 M de NaCl en el mismo buffer. El flujo que se utilizó fue de 0.5 mL/min y se mantuvo durante todo el proceso cromatográfico.

2.10 Análisis de la expresión y de la purificación mediante SDS-PAGE.

Tanto la expresión de las proteínas, como los productos de cada una de las etapas de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE, 16% utilizando poliacrilamida AB-3 (49.5% T, 3% C). Para la ruptura de puentes disulfuro y estructura secundaria, se utilizó amortiguador de muestra al 6 % de β -mercaptoetanol y SDS en baño maría a 95° C por 10 min. El corrimiento se hizo a 90 volts constantes en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System de la marca BioRad conectada a una fuente de poder PowerPac Basic de la misma marca. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (G-250) blue silver.

2.11 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína (leptina recombinante) se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm empleando el coeficiente de extinción $\epsilon = 0.53 \text{ mg ml}^{-1}$ valor estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la leptina humana asumiendo que se forma el puente de disulfuro, utilizando el sitio **<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>**.

Se utilizó un espectrofotómetro de luz UV-Vis marca SCINCO modelo S-3100 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico, a partir de 1 ml de proteína.

2.12 Espectros de Dicroísmo Circular

Las mediciones de Dicroísmo Circular (DC) se realizaron en un espectropolarímetro JASCO modelo J-815 que cuenta con un porta celdas tipo peltier. Para la obtención de los espectros se utilizó una celda de cuarzo de 10.00 mm de recorrido óptico utilizando un volumen de reacción de 3 ml con una concentración final de 25 µg/ml, obteniendo la línea base correspondiente de la solución amortiguadora. Se obtuvieron espectros a una señal de elipticidad de 250 a 220 nm. Los resultados se reportan como elipticidad molar por residuo medio $[\theta]_{MRW}$.

2.13 Transiciones químicas por Dicroísmo Circular

Se prepararon 80 alícuotas con una concentración final de Leptina humana de 25 µg/ml, y concentraciones crecientes de Urea desde 0 M hasta 8 M con intervalos de 0.1 M en cada alícuota, después de homogenizarse las muestras fueron incubadas en baño maría a 25° C, registrándose los espectros de Dicroísmo Circular a las 3 horas. Se eligió la longitud de onda de 225 nm para evaluar los cambios en estructura secundaria.

2.14 Transiciones térmicas por Dicroísmo Circular

Las transiciones de desnaturalización térmica se siguieron mediante monitoreo continuo de cambios en la elipticidad a una longitud de onda fija de 220 nm, con un aumento en la temperatura de la muestra (25° C-95°C) a velocidad constante, utilizando una celda de 1.0 cm de recorrido óptico. La concentración final de leptina fue de 25 µg/ml a pH 8.0 y pH 2.0 en buffer de fosfatos.

2.15 Replegamiento de la leptina humana W100E

Para evaluar el replegamiento de la leptina humana W100E la muestra fue sometida a calentamiento térmico y posteriormente se enfrió. Se preparó la muestra con una concentración final de leptina de 25 µg/ml a pH 8.0 y pH 2.0 en buffer de fosfatos, posteriormente esta se sometió a desplegamiento térmico de 25-95°C y posteriormente la solución se enfrió mediante un enfriado rápido hasta 25° C.

2.16 Evaluación de la actividad de la leptina W100E en un modelo murino de obesidad

Se usaron ratones *Mus musculus* cepa CD-1, machos, recién destetados, de 25 a 30 g de peso corporal se alojaron en una habitación a una temperatura constante de 22 ±1 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs (luces encendidas 9:00 am), fueron alimentados con una dieta rica en grasa y fructosa solución (60%) (Cedrosa SA México) administrándose diariamente, por 6 semanas la composición de la dieta se presenta en la Tabla 2.1. El consumo de alimento se midió diariamente y el peso corporal se midió una vez cada dos días. Se mantuvo por separado, cada ratón en su jaula con agua y dieta/alimento *ad libitum*.

Después de las 6 semanas de tratamiento con la dieta alta en grasa y fructuosa, se administró la mutante W100E durante 10 días por vía subcutánea a una dosis de 30 µg/ml.

	Control (%)*	HF (%) **
Proteína	28.05	18.23
Grasa	12.14	7.89
Manteca de Cerdo	0	35.00
Carbohidratos	59.81	38.88
Total	100	100
Calorias (kcal)	467.5	314.5

* Lab Chow 5012 dieta

** Fructosa (60%) administrada por vía intragastrica (2.4 kcal)

Posteriormente 10 días después del tratamiento se obtuvo la muestra sanguínea mediante punción ocular, se separó el suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos. Los niveles totales de colesterol (CT), colesterol HDL, (C-HDL) y triglicéridos (TGs) se determinaron utilizando el el analizador automático Selectra (Modelo Vitalab 2) y el kit comercial (RANDOX). Después de todo el tratamiento, los animales se mantuvieron en ayunas durante ocho horas, posteriormente se sacrificaron para pesar la grasa retroperitoneal y periepididimal.

2.17 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido con la prueba post hoc Holm Sidak con una significación establecida en $p < 0,05$. El consumo de alimentos se analizó mediante ANOVA de dos vías repetidas, seguido con la prueba post hoc de Tukey, con una significación establecida en $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Sigma Stat (10.0).

2.18 Tratamiento de los datos para un modelo de desplegamiento de dos estados

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, esta configuración se conoce como estructura primaria (estado desplegado), dicha estructura transita por una serie de estados en los cuales su configuración espacial se modifica hasta alcanzar un estado energético estable con una estructura tridimensional característica conocida como estado nativo y solamente esta conformación le permite a la proteína llevar a cabo su función biológica (**Olivares 2004, Molina 2006**). Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual se adquiere la estructura nativa, sin embargo se sabe que dicha estructura puede perderse por cambios en el ambiente, ya sean por factores físicos como la temperatura, cambios en el pH, la presión o por factores químicos utilizando altas concentraciones de urea, cloruro de guanidinio entre otros (**Fersht 1999**). Cuando se induce el desplegamiento por la adición de un agente desnaturizante la conformación de la proteína nativa cambia dependiendo de la concentración del desnaturizante, muchas proteínas se desnaturizan en un proceso de dos estados, del nativo (N) al desnaturizado (U), sin la presencia de intermediarios aparentes. La desnaturización puede ser reversible, es decir, la proteína desnaturizada puede recuperar su estructura nativa al encontrar un medio donde se favorezca esta conformación. Y si se encuentran condiciones de reversibilidad en la reacción de plegamiento/desplegamiento es posible estudiar el proceso de desnaturización en el equilibrio. En este caso, el proceso se puede describir mediante el modelo relativamente sencillo: (**Creighton 1993, Bieri 2000, Rojo 1998**)



Donde K_{N-U} representa la constante de equilibrio del proceso y puede obtenerse del cociente de las concentraciones molares de las especies químicas involucradas.

$$K_{N-U} = \frac{[N]}{[U]} \quad (2)$$

donde $[U]$, es la concentración molar de proteína desplegada y $[N]$ la concentración molar de proteína nativa.

Tanto la concentración de proteína en su conformación nativa como desnaturalizada se puede determinar mediante sus propiedades biofísicas o espectroscópicas, como la elipticidad o la intensidad de fluorescencia. Para poder seguir el comportamiento de desnaturalización y medir indirectamente la transición se define el parámetro “ y ” como el observable (en este caso dicroísmo circular), cuyo valor se modifica de acuerdo a los cambios que ocurren en la conformación de la molécula. “ y_N ” es el valor de elipticidad característico para el estado nativo mientras que “ y_U ” es el valor de la señal para el estado desplegado. Estos valores se pueden obtener mediante la extrapolación lineal en cualquier punto de la transición y dependen de la concentración del agente desnaturalizante. De esta manera para un mecanismo de dos estados se definen:

$$Pt = [N] + [U] \quad (3)$$

donde Pt es la proteína total mientras que las fracciones de proteína nativa (f_N) y desnaturalizada (f_U) se calculan a partir de:

$$f_N = \frac{[N]}{[Pt]} \quad (4)$$

$$fU = \frac{[U]}{[Pt]} \quad (5)$$

Y por lo tanto:

$$fN + fU = 1.0 \quad (6)$$

Además el observable “**y**” se considera como la suma de las contribuciones de la señales de cada una de las especies presentes:

$$y = yNfN + yUfU \quad (7)$$

Combinando las ecuaciones 6 y 7:

$$fN = YU - Y/YU - YN \quad (8)$$

$$fU = Y - YN/YU - YN \quad (9)$$

donde la constante de equilibrio para este modelo es:

$$K_{N-U} = \frac{[fU]}{1-fU} \quad (10)$$

De esta manera al conocer la constante de equilibrio asociada a la reacción de desplegamiento K_{N-U} es posible conocer el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG_{N-U}) el cual se describe como:

$$\Delta G_{N-U} = RT \ln K_{N-U} \quad (11)$$

donde **R** es la constante de los gases y **T** la temperatura en Kelvin (**Bieri 2000**).

Asumiendo que el valor ΔG depende de manera lineal de la concentración de desnaturalizante entonces:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta G^{H_2O} - m [Urea] \quad (12)$$

donde ΔG^{H_2O} es el cambio de energía libre en ausencia de desnaturalizante; es decir en agua y m es una constante de proporcionalidad relacionada con el cambio de exposición al solvente entre dos conformaciones de la proteína.

Cabe señalar que valores bajos en m indica que la proteína no cambió mucho su área de exposición al solvente después del proceso de desnaturalización, también puede indicarnos que el proceso ocurre en varios pasos y no en una sola transición.

Por definición se sabe:

$$\Delta G_U = \Delta H_U + T\Delta S_U \quad (13)$$

donde ΔH_U es el cambio de entalpía del desplegamiento, T es la temperatura y ΔS_U es el cambio de entropía de la reacción. Re-arreglando las ecuaciones 11 y 13 se obtiene:

$$\ln K_U = -(\Delta H_U/R)(1/T) + \Delta S_U/R \quad (14)$$

Al graficar $\ln K$ vs $(1/T)$ podemos obtener una línea recta con pendiente $-(\Delta H/R)$ denominándose Gráfico de van't Hoff (Figura 2.1):

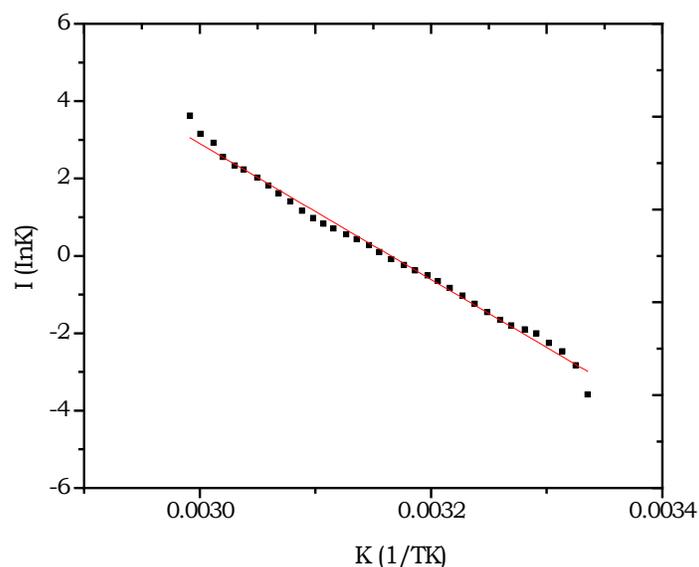


Figura 2.1. Gráfico de van't Hoff. El eje de las Y gráfica $\ln K$ y el eje de las X, el inverso de la temperatura. Los puntos representan los datos experimentales de la reacción de desplegamiento térmico y la línea en rojo corresponde al ajuste de la ecuación de la recta.

De acuerdo al modelo de dos estados, la T_m se define como la temperatura a la cual el 50 % de las moléculas se encuentran en la conformación nativa y el otro 50 %, en forma denaturalizada. La T_m corresponde al valor de la temperatura cuando $\Delta G=0$. Por esto, la determinación de los parámetros termodinámicos como ΔG , ΔH , K , T_m , pueden ser obtenidos de una transición de desplegamiento térmico.

Capítulo 3
Resultados

Resultados in sílico

3.1. Modelado de la leptina humana silvestre y W100E

Se analizó la secuencia de aminoácidos de la leptina humana y se comparó con la secuencia de la estructura cristalográfica (PDB ID 1AX8), esta estructura carece de 16 aminoácidos de los residuos 25 al 38. Por lo que, las coordenadas para esta región se generan con cálculos *Ab initio*. Se obtuvieron las estructuras de la leptina silvestre y W100E usando diferentes modeladores y de acuerdo al mapa de Ramachandran, valores de RMSD, así como el análisis estructural de cada uno de los modelos, se encontró que los mejores modelos fueron proporcionados por el servidor I-TASSER (Figura 3.1 A), ya que cumplen con todos los parámetros estereoquímicos evaluados, además de que sus ángulos diedros están dentro de las áreas permitidas para formar la estructura secundaria en las proteínas. Se observaron diferencias en la predicción de la estructura secundaria en los residuos 25-38, para cada una de las construcciones de leptina humana. Para la leptina silvestre esta región fue modelada como un loop, mientras que en la mutante W100E se observa la formación de una α -hélice involucrando los residuos 34 al 41. Se realizó una inspección a fondo de esta región en todos los modelos proporcionados por el servidor I-TASSER y todos los modelos obtenidos confirman que los residuos 34-41 adquieren la conformación de hélice en la leptina W100E. Por el contrario, en la misma región, los aminoácidos de la proteína silvestre muestran tendencia a formar un lazo desordenado en todos los modelos generados por el servidor I-TASSER. Los programas MOE y modeller confirman estas tendencias para cada una de las construcciones de la leptina.

También se calculó el potencial electrostático de superficie de la leptina silvestre y de la mutante W100E observando una región altamente positiva cerca de la posición 100, por el contrario en la W100E esta región se torna más negativa Figura 3.1. (B, C).

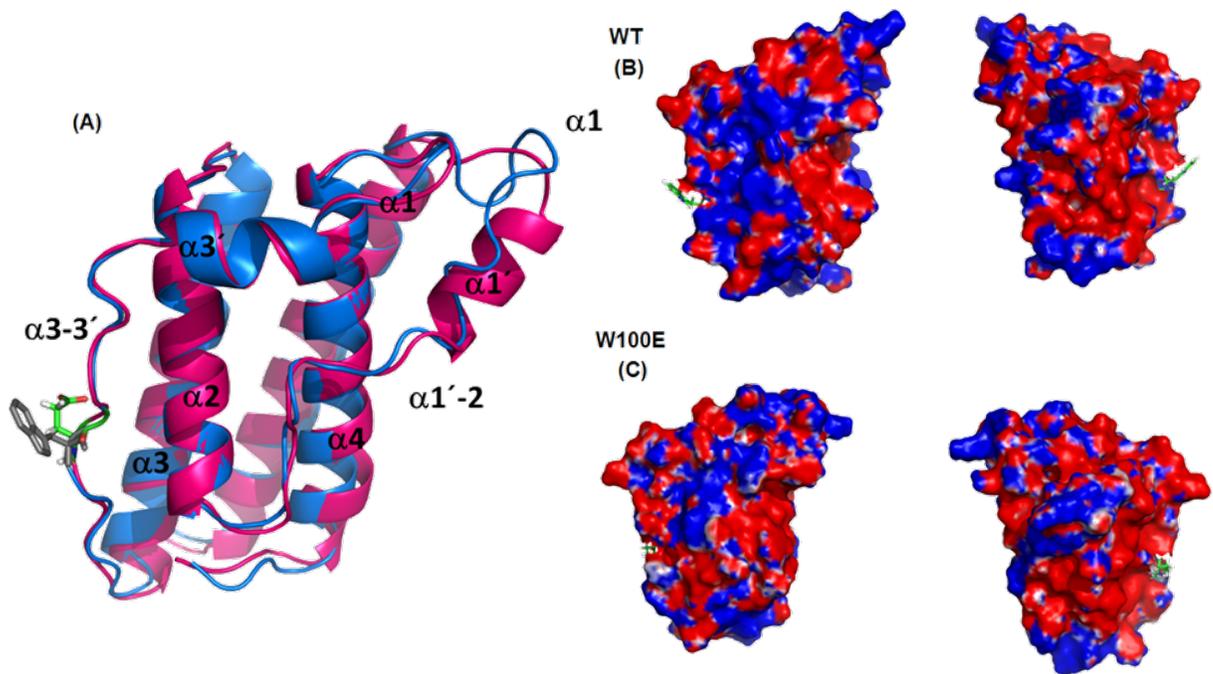


Figura.3.1. Estructura modelada de la leptina (A) Estructura superpuesta silvestre (azul) y W100E (rosa). La mutación en la posición 100 es indicada. (B) potencial de superficie electrostática de la silvestre y (C) potencial de superficie electrostática de la leptina W100E.

Los mejores modelos generados por el servidor I-TASSER para cada una de las construcciones se utilizaron como coordenadas iniciales para las simulaciones de dinámica molecular a 300K, 400 y 500 K, como se describió en la sección de materiales y métodos. Se analizaron diversos parámetros geométricos que se describen a continuación.

3.1.2. *Desviación Cuadrática Media (RMSD)*

En el análisis de la desviación cuadrática media de los carbonos alfa (RMSD: Root Mean Square Deviation) se compararon los movimientos globales de los modelos Figura 3.2 A y B inicialmente los valores de RMSD α incrementan durante el período de equilibrio tras el calentamiento del sistema en la simulación de DM. En promedio para ambas proteínas los RMSD α fueron aproximadamente entre 0.2 y 0.4 nm a 300 y 400 K, sin embargo se observan algunas diferencias en las curvas para cada proteína.

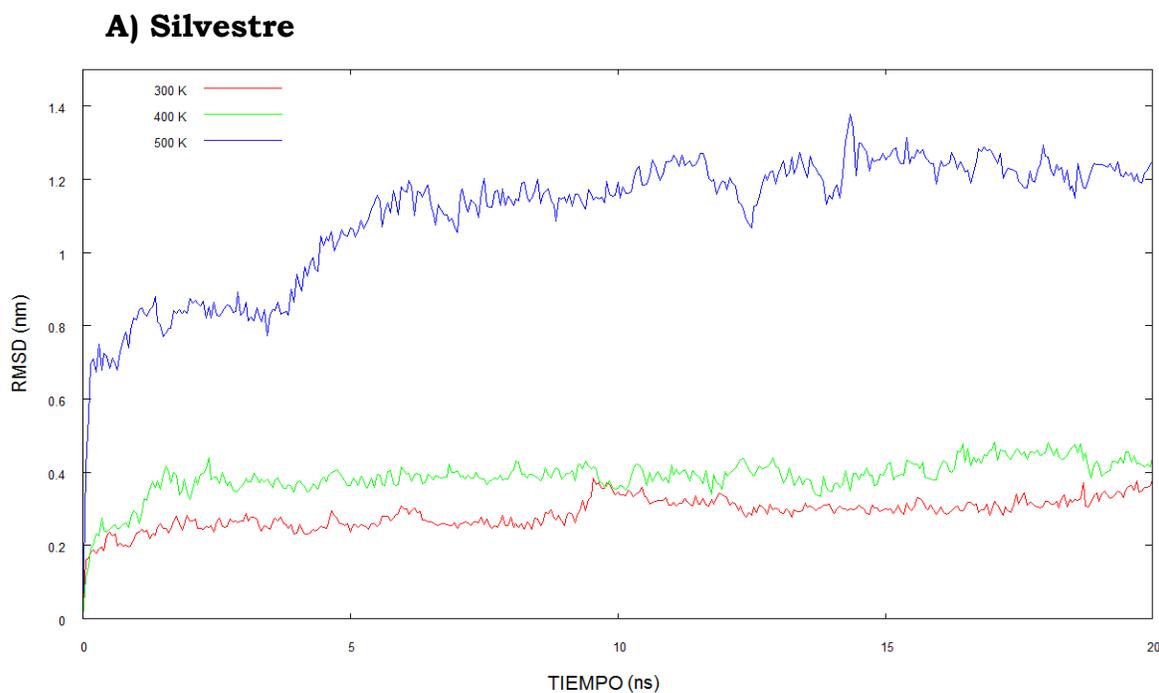
Se observó que la leptina silvestre a 300 K muestra una meseta larga con un valor de RMSD alrededor de 0.22 nm, con un incremento abrupto en el valor de RMSD que llega aproximadamente 0.38 nm cerca de los 9.5 ns. Este cambio abrupto coincide con cambios en el contenido de estructura secundaria de dos hélices, donde la hélice α_3 se pierde parcialmente mientras que la hélice α_2 se vuelve más estructurada. Al mismo tiempo también se observó una reducción en el SASA. Mientras que para la leptina W100E a 300 K no se observó ningún incremento rápido en los valores de RMSD α , lo que se observa es una pendiente durante el transcurso de la SDM.

A 400 K para la proteína silvestre los valores de RMSD α son alrededor de 0.24 nm en los primeros 1.2 ns de simulación, aproximadamente en este tiempo los valores de RMSD α incrementan alrededor de 0.4 nm y se mantienen así hasta el final de la trayectoria.

Con respecto a la W100E a 400 K se observa que el RMSD α oscila entre 0.2 a 0.25 desde el inicio de la simulación y hasta 9.5 ns. En este tiempo se detecta un incremento en los valores de RMSD α para alcanzar 0.4 nm y se mantiene cercano a ese valor el resto de la simulación.

A 500 K para ambas proteínas se observa un incremento importante de 0.4 a 1.4 nm de $\text{RMSD}\alpha$. Para la silvestre el equilibrio se alcanza a los 5 ns, por el contrario para la proteína W100E se observa una meseta larga durante los primeros 5 ns del experimento, entre 0.7 a 0.8 nm. Se observa y muestra un incremento lento aproximadamente a los 8.5 ns hasta alcanzar un valor de $\text{RMSD}\alpha$ alrededor de 1.2 a 1.3 nm cerca de los 17.5 ns.

En promedio la leptina silvestre muestra una rápida estabilización en las tres temperaturas comparada con la W100E, lo que demuestra que, aparte de las diferencias en la estructura secundaria la leptina W100E también promueve los movimientos continuos a lo largo de la SDM.



B) W100E

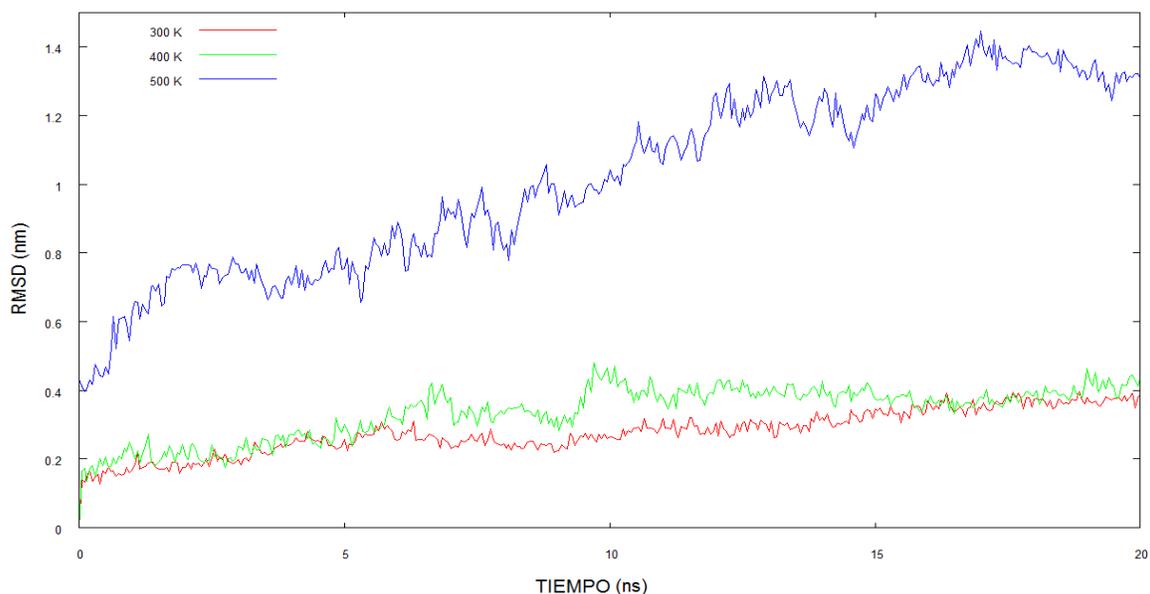


Figura 3.2. Desplazamiento cuadrático medio de los carbonos- α de la leptina humana silvestre (A) y W100E (B) a tres diferentes temperaturas de simulación. El color rojo representa a la temperatura de 300 K, la curva de color verde representa a 400 K y la curva de color azul representa a 500 K.

3.1.3. Radio de Giro (RG)

La fluctuación de los valores del RG nos dan evidencia de los movimientos conformacionales de la totalidad de la proteína y del grado de expansión de la misma. El radio de giro de la leptina silvestre y de la mutante W100E se muestran en la Figura 3.3 A y B. A 300 y 400 K los valores empiezan en 1.55 nm para ambas proteínas. Esto confirma que la mutación no afecta la compactación de la proteína. En las SDM a 300 y 400 K fluctuaciones de los valores de RG entre 1.55 y 1.62 nm. Mientras que los valores a 500 K para ambas proteínas muestran una importante fluctuación de 1.6 a 1.72 nm, particularmente para la silvestre esta inicia aproximadamente en 1.65 nm y termina en 1.45 nm, esto significa una pequeña reducción en el elongamiento global de la molécula. Curiosamente esta construcción muestra valores de RG por debajo de 1.55 nm por periodos largos durante

la segunda mitad de la simulación. Por el contrario la W100E muestra valores de RG cerca de 1.65 nm indicando eventos alternos de expansión y contracción de la molécula. Finalmente a 500 K la W100E parece ser menos compacta que la silvestre.

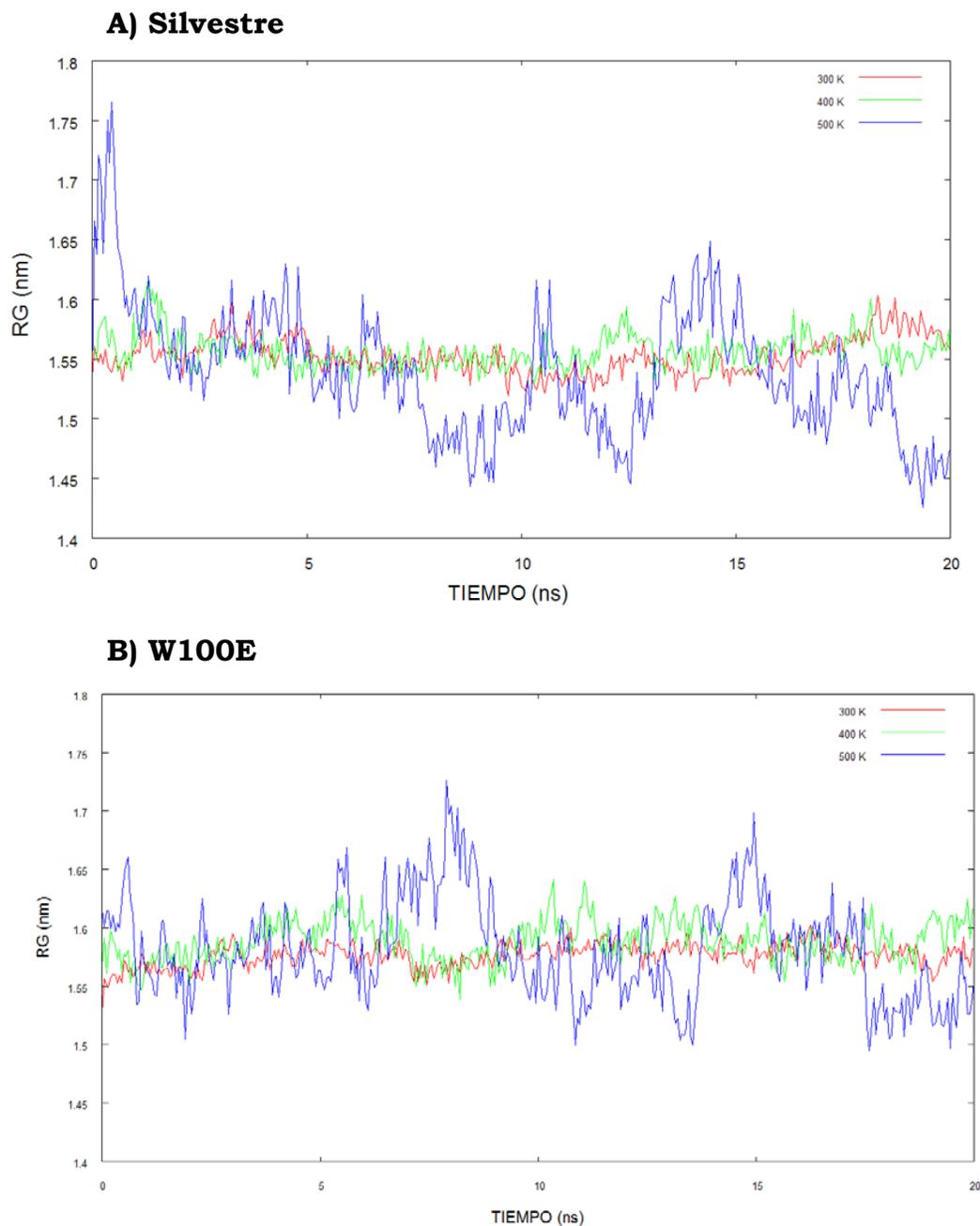
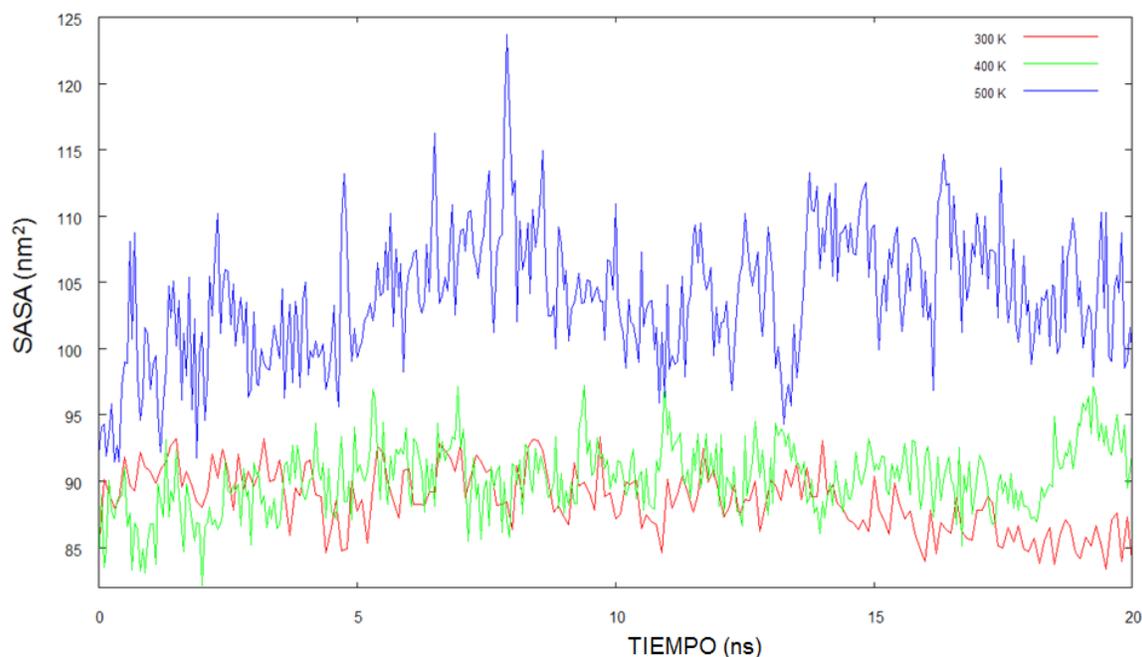


Figura 3.3. Grado de compactación de la leptina humana silvestre (A) y W100E (B) a diferentes temperaturas de simulación.

3.1.4. Área Superficial Expuesta al Solvente (SASA)

Los valores de SASA para la proteína silvestre están delimitados entre 85 y 97 nm², a 300 K, observándose los valores más bajos entre 10 y 15 ns. A 400 K los valores oscilan entre 86 y 93 nm² y a 500 K se muestra un incremento que oscila alrededor de 95 nm². Por otro lado, para la mutante W100E a 300 K se muestra un incremento en los valores de SASA entre 85 y 97 nm² pero con oscilaciones de alta frecuencia comparándola con la silvestre, mientras que a 400 K los valores oscilan entre 83 y 95 nm² mostrando valores más altos durante los dos últimos nanosegundos de la simulación. A 500 K se muestra un importante incremento en el área expuesta al solvente los valores oscilan alrededor de 110 nm², y algunos puntos llegan a más de 115 y 120 nm².

A) Silvestre



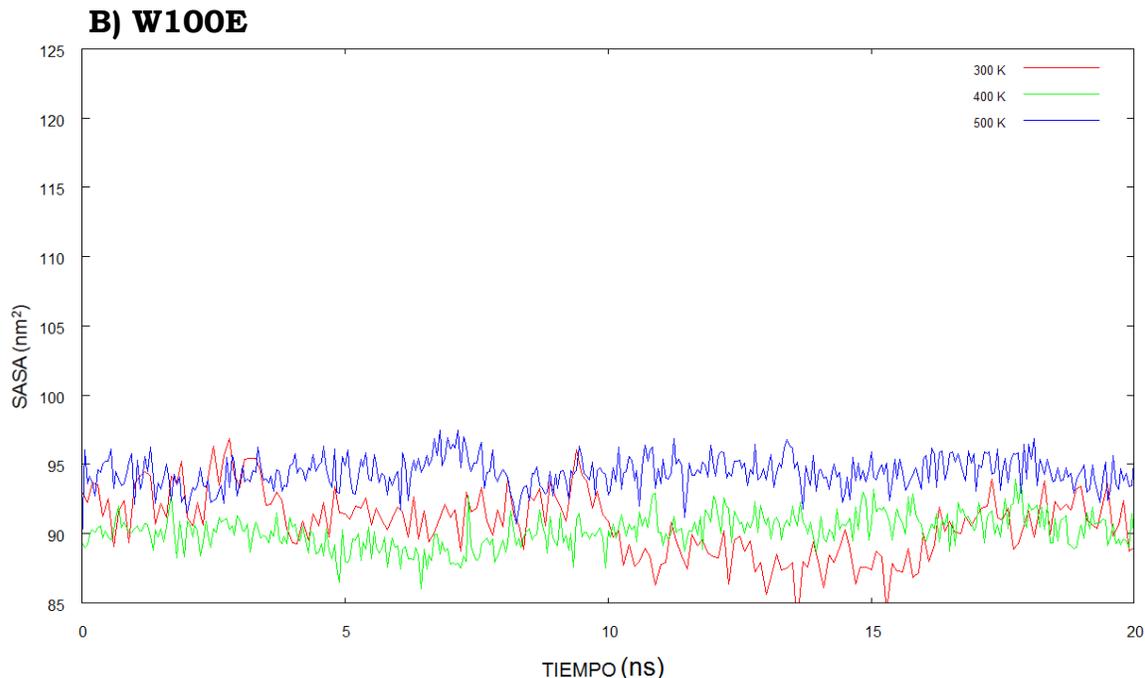


Figura 3.4 Área superficial accesible al solvente de la proteína silvestre (A) y W100E (B) a tres diferentes temperaturas

3.1.5. Raíz Cuadrada de la Fluctuación (RMSF)

En el análisis del RMSF (Root Means Square Fluctuation) a 300 y 400 K se observaron valores más pequeños para las regiones estructuradas comparadas con los loops en ambas proteínas. Las regiones no estructuradas se observan en los mismos intervalos en la leptina mutante como en la silvestre. Los valores de RMSF para ambas proteínas dentro de las regiones estructuradas se observan entre 0.1 nm y 0.2 nm a 300 y 400 K respectivamente. Sin embargo, observamos algunos cambios en el perfil de cada proteína, particularmente a 300 K es donde se ven mayores diferencias. La leptina silvestre muestra valores alrededor de 0.35 nm de los residuos 25 al 39. Mientras que, en la leptina W100E se observa una zona de alta flexibilidad en los residuos 25 al 31, donde se muestran

valores ligeramente más altos hasta 0.4 nm. Otra región flexible involucra los residuos 100 al 118. La mutante W100E muestra valores mayores de RMSF de esta región en comparación con la silvestre. En cuanto a la SDM a 400 K se aprecia que los residuos 43 al 50 en la WT muestran un incremento en el RMSF, sin embargo esto no se observa en la mutante. En la mutante se observa un incremento en la movilidad entre los residuos 65 al 95 y 100 al 120. A 500 K para ambas proteínas el RMSF muestra valores por encima de 0.4 nm. Para la W100E se observan valores mayores de RMSF en los residuos 1-17 el resto de la proteína muestra una fluctuación global entre 0.5 a 0.9 nm. A esta temperatura la proteína silvestre muestra un RMSF fluctuante entre 0.5 y 14 nm. Particularmente la mutante muestra valores más altos en la región N-terminal (residuos 1-17) y en la región entre los residuos 60 al 70 y del 105 al 120, mientras que la leptina silvestre muestra mayor fluctuación en la región N-terminal y C-terminal entre los residuos 75 al 82. Es importante mencionar que en esta región corresponde a la hélice-3. Esta hélice junto con la hélice-1 son las que interaccionan principalmente con el receptor. En resumen la leptina W100E muestra más exposición al solvente (mayor SASA) es más expandida (mayor RG) y presenta mayores tiempos para alcanzar el equilibrio durante la simulación.

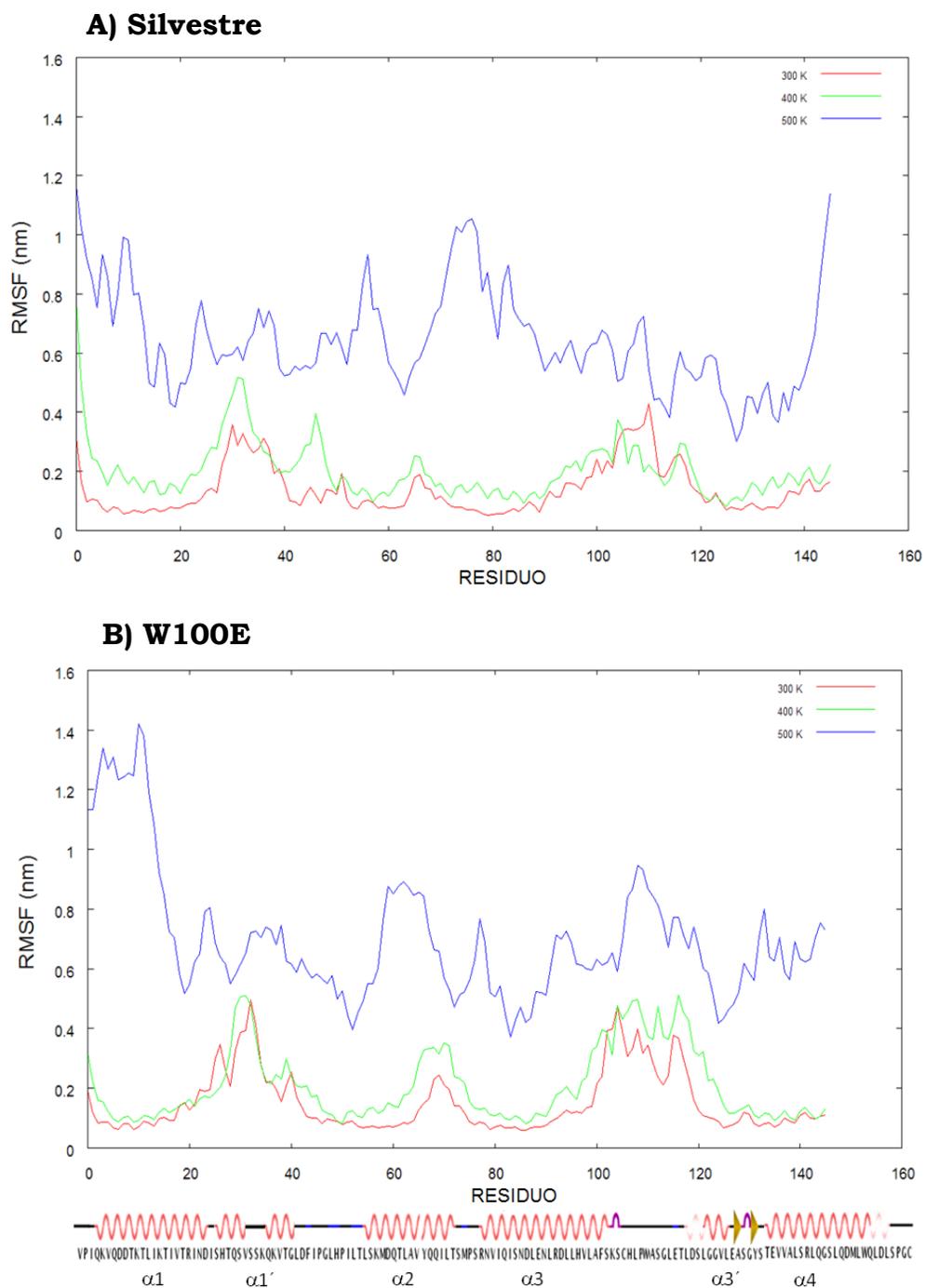


Figura 3.5. Raíz cuadrada de la desviación fluctuante de los α -carbonos las coordenadas se muestran como función del número de residuos en la parte inferior, se incluye una representación de la estructura secundaria para los principales dominios. Los colores indican la temperatura de la simulación de DM; 300 (rojo), 400 (verde) y 500 K (azul).

3.1.6. Estructura secundaria

Los cambios de la estructura secundaria en el transcurso de las SDM tanto de la leptina silvestre como de la mutante W100E se muestran en la figura 4.3. A 300 K en ambas proteínas se observa la conservación de estructura secundaria. En la proteína silvestre (figura 3.6 A) la hélice $\alpha 1$ (residuos 3 - 25) se mantienen durante toda la simulación, sin embargo en la W100E la región C-terminal de la misma hélice ($\alpha 1$) se observa pérdida del contenido helicoidal adoptando la conformación de giro durante al menos un tercio del tiempo de la simulación. Por el contrario la hélice $\alpha 2$ parece ser más estable durante la simulación a 300 K para ambas proteínas. La hélice $\alpha 3$ es la región más estructurada y estable para ambas proteínas. Mientras que la hélice $\alpha 4$ de la leptina silvestre parece perder su contenido helicoidal alrededor del aminoácido 130 durante el resto de la SDM. Por el contrario para la mutante W100E la hélice $\alpha 4$ presenta mayor estabilidad durante la SDM. Los residuos de la posición 110 tienen una tendencia a adoptar una conformación helicoidal en ambas proteínas, pero esta susceptibilidad es más persistente en la leptina W100E. A 400 K (Figura 3.6 B y E) ambas proteínas muestran altas fluctuaciones en sus hélices. En la proteína silvestre los residuos 28-38 tiene cierta propensión y adoptan la conformación de láminas β durante aproximadamente el 20% del período de la SDM. Esta tendencia se observa de manera más persistente en la W100E (casi el 70% de la SDM). También los residuos 110-120 de la leptina muestran esta propensión, en este caso es más marcado para la silvestre. A 500 K ambas proteínas muestran una importante pérdida de estructura secundaria (Figura 3.6 C y F). En la leptina silvestre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$ pierden completamente su estructura antes de los 5 ns, mientras que las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$ muestran fluctuaciones entre las hélices y giros, pero la conformación helicoidal es predominante en la hélice $\alpha 2$ y el giro en la hélice $\alpha 4$. Por otro lado los residuos 34 al 41 muestran cierta propensión adoptando la conformación de láminas β alrededor del 50 % del tiempo de

la simulación. En cuanto a la W100E de manera interesante la hélice α_3 se conserva durante casi todo el tiempo de la simulación, mientras que el resto de la proteína no conserva su estructura secundaria. La tendencia a adoptar la estructura de hebras β es mucho menos apreciable en la mutante, observándose parcialmente únicamente en la hélice α_1 y al final de la α_2 .

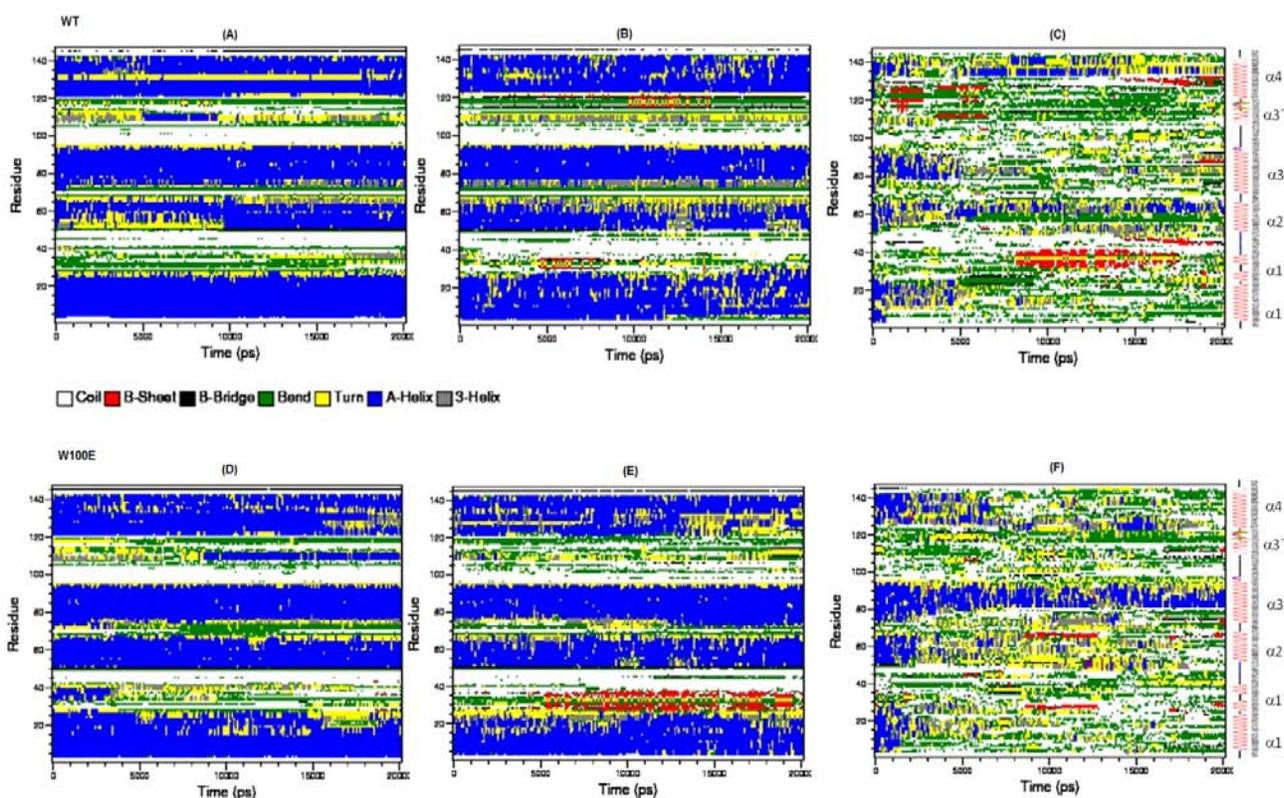


Figura 3.6. Evolución de la estructura secundaria durante la SDM, silvestre (A, B y C) y W100E (D, E y F). Los colores son de acuerdo a la clasificación del DSSP (wileyonlinelibrary.com).

3.1.7. Estado Nativo de la Leptina Silvestre y W100E

La leptina silvestre a 300 K no muestra cambios importantes en su estructura global (hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$), algunos de los movimientos más apreciables son la extensión de la hélice $\alpha 3$ que forma un loop entre la hélice $\alpha 3$ - $\alpha 3'$ (residuos 100-120) y la hélice $\alpha 4$, ocasionando una flexión en esta hélice. También la $\alpha 1'$ oscila entre hélice y loop durante la simulación. A 400 K las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ son más conservadas. Por el lado opuesto las hélices $\alpha 1'$ y $\alpha 3'$ están desestructuradas mientras que el C-terminal y la mitad de la hélice $\alpha 2$ pierde la forma de hélice y forma un loop y la hélice $\alpha 1$ oscila entre desestructurado y hélice. Con respecto a los cambios de estructura en la W100E a 300 K se observa que las hélices $\alpha 1'$ y $\alpha 3'$ pierden su helicidad (Figura 3.7) mientras que las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se mantienen casi intactas durante la simulación. A 400 K la hélice $\alpha 1'$ muestra una tendencia a formar láminas β , mientras que la $\alpha 3'$ se muestra desestructurada, el loop entre $\alpha 3$ - $\alpha 3'$ rota hacia el núcleo de la proteína y $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se muestra casi intacta. Como se mencionó anteriormente las coordenadas de $\alpha 1'$ fueron construidas por procedimiento *Ab-initio* por el modelador I-Tasser y esta región fue modelada como hélice en la W100E, mientras que en la proteína silvestre esta región se presenta desestructurada. Mediante SDM se observa que el contenido helicoidal de los residuos 25 al 38 en la mutante no es persistente en un lapso de tiempo durante la simulación.

En cuanto a la estructura promedio obtenida mediante análisis de clusterización (Figura 3.8-A) la leptina silvestre y la W100E a 300 K son casi superponibles las únicas diferencias que detectamos son que en la W100E en los residuos 106-115 forman una pequeña hélice ($\alpha 3'$), mientras que en la silvestre esta región está completamente desestructurada. También observamos los cambios de posición de los loops con respecto al núcleo hidrofóbico de la proteína. A 400 K las diferencias más relevantes en

las estructuras promedio son que en la W100E se observa la formación de dos laminas β (residuos 26-41) pero no se observan en la proteína silvestre (Figura 3.8-B).

De acuerdo al análisis de las estructuras promedio por clusterización en ambas construcciones podemos concluir que la W100E es más resistente al tratamiento térmico conservando las cuatro hélices en esta estructura, mientras que la silvestre se observa más desestructurada. Esto podría implicar que la W100E podría ser una construcción más estable que la silvestre.

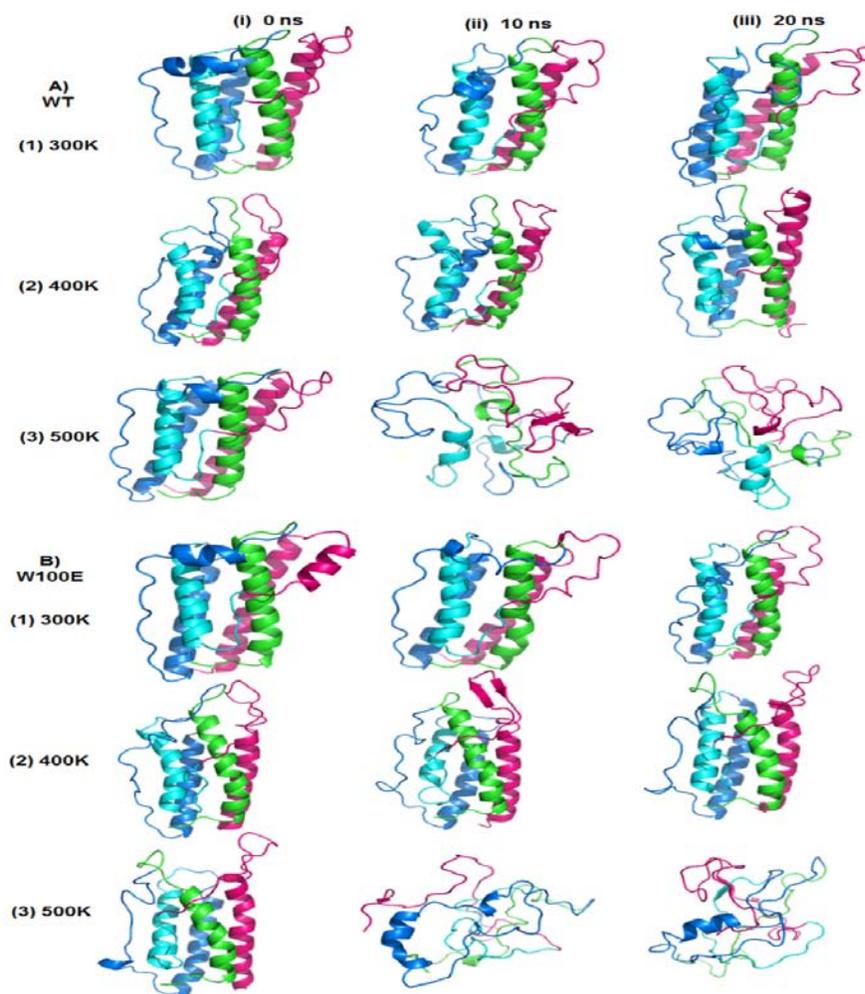


Figura 3.7. Imágenes representativas durante la trayectoria de DM para la leptina silvestre y la mutante W100E. Se indican las temperaturas y tiempos de la simulación. Los colores indican los residuos 1-44 (rosa), 45-69 (Cyan)

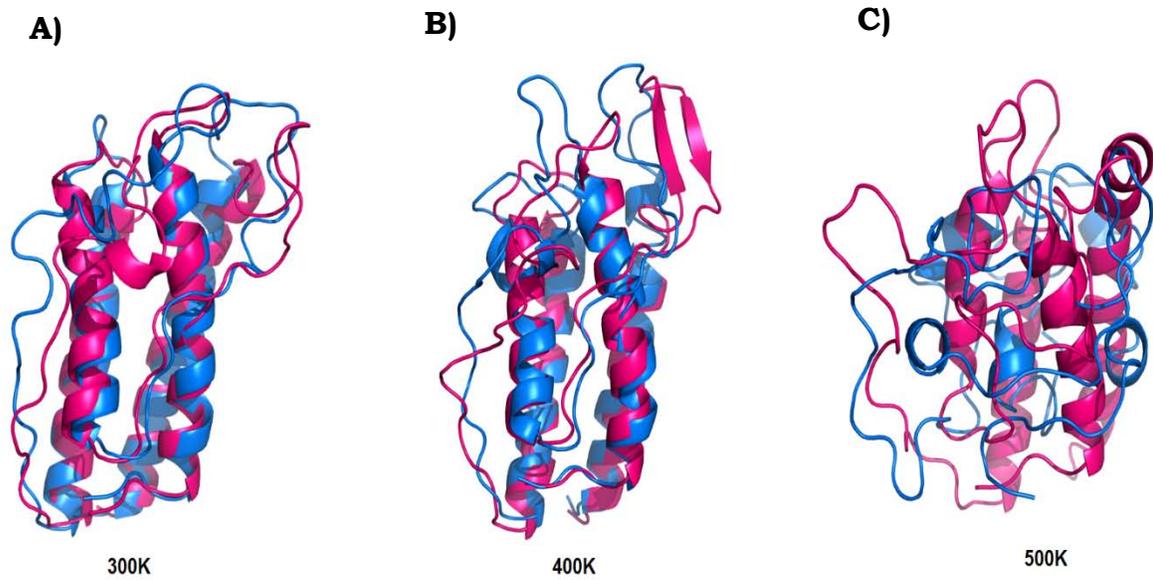


Figura 3.8. Estructuras promedio de la leptina humana silvestre (azul) y W100E (rosa) a 300, 400 y 500 K.

3.1.8. Reacción de desplegamiento de la leptina humana silvestre y W100E

Ambas proteínas pierden la mayor parte de la conformación nativa a 500 K (Figura 3.8-C) pero durante la vía de desplegamiento esta serie de eventos son diferentes para cada construcción.

Para la proteína silvestre, la primera hélice que se pierde es la $\alpha 1$ entre el loop $\alpha 3$ - $\alpha 3'$ se mueve hacia el núcleo hidrofóbico de la proteína. Posteriormente la hélice $\alpha 4$ pierde estructura secundaria, pero durante el curso de la simulación es capaz de recuperar parte de su helicidad. La hélice $\alpha 3$ se conserva aproximadamente cerca de 5 ns de la simulación, pero después de este tiempo esta hélice se pierde. La proteína es desplegada por completo a los 10 ns de simulación. Sin embargo la leptina silvestre mantiene al menos parcialmente el contenido helicoidal de la hélice $\alpha 2$. Las interacciones entre la Ile64-Leu90-S67 y Thr27-Leu126 tienen un impacto importante en mantener esta hélice.

Con respecto a la mutante W100E, la hélice $\alpha 1$ es la primera en perder su helicidad, seguida por la $\alpha 3'$ esta es después transformada en loop que se une entre el loop $\alpha 3$ - $\alpha 3'$. Este loop parece tener una alta movilidad y se extiende al núcleo de la proteína provocando una deformación en la hélice $\alpha 2$, después la $\alpha 4$ empieza a perder su contenido helicoidal, continúa la $\alpha 2$ hasta desestructurarse seguida por la hélice $\alpha 4$. En este caso ni la $\alpha 2$ ni la $\alpha 4$ son capaces de recuperar su contenido helicoidal después de la desnaturalización. Interesantemente la hélice $\alpha 3$ es más conservada durante los 20 ns de la simulación a 500 K. Como se ha mencionado anteriormente la hélice $\alpha 3$ participa en la interacción de la leptina con todas las isoformas del receptor. Entonces es importante resaltar que una mutación puntual es capaz de modificar la dinámica y la estabilidad de esta región de la proteína. Esta hélice es cercana del loop que contienen el residuo 100. Haciendo una minuciosa exploración de la diferencia de

interacciones entre la leptina silvestre y la mutante W100E cerca de la región de la mutación y encontramos que la red de puentes de hidrogeno no se modifica de manera importante entre las construcciones (datos no mostrados). Sin embargo se encontró una interacción diferencial entre la leptina silvestre y su mutante. En la proteína mutante los residuos Q56, R84 y E100 presentan una atracción electrostática, que no se observa en la proteína silvestre. Estos tres residuos forman un triángulo, cuyo perímetro es proporcional a las distancias entre los tres residuos. Con el fin de evaluar la persistencia de esta interacción calculamos la evolución del perímetro del triángulo en ambas construcciones durante el curso de la simulación (a 300 K y 500 K) y observamos que el perímetro del triángulo es consistentemente más corto en la W100E que en la proteína silvestre, esto indica que las distancias entre Q56, R84 y E100 son constantemente pequeñas que Q56, R84 y W100. Por lo tanto nosotros proponemos que esta interacción podría ser la responsable de mantener la hélice α_3 en la leptina W100E.

3.1.9 Análisis de los modos normales de vibración.

El análisis de los modos normales de las estructuras nativas de ambas proteínas se realizó para identificar posibles cambios conformacionales (Estos datos no se muestran). De interés particular fueron los modos 7 al 1 que muestran baja frecuencia y alta colectividad en ambas proteínas. La región con la movilidad más alta en ambas construcciones corresponde a los residuos 26 al 41, siendo mayor en la leptina silvestre. Otra zona de gran movilidad es la región entre los residuos 95 al 120. En ambos casos, esto concuerda con los resultados de RMSF. Otra zona flexible identificada por el servidor ElNemo fue la de los residuos 48 al 53 que se encuentran en el loop entre la α_1 y α_2 , la movilidad de esta región no se aprecia en los gráficos del RMSF. La región N-terminal parece ser más flexible en la mutante W100E que en la leptina silvestre.

Resultados in vitro

3.2 Subclonación de la leptina humana variante soluble en el vector de expresión pET 19 b modificado.

El gen que codifica para la leptina humana se subclonó entre los sitios de restricción NdeI y XhoI del vector de expresión pET19b modificado (pET19bm), este vector contiene un gen de resistencia a Ampicilina, un sitio poli-linker, la secuencia del Operón lac controlada por el promotor T7, presenta un tracto de 10 histidinas en el extremo N-terminal así como un sitio de proteólisis para PPS (Prescission Protease-GE Health Care Life Sciences) que permite la eliminación del tracto.

A partir del vector de expresión pET28a que tiene clonado el gen que codifica para la leptina humana variante soluble (W100E) se realizó una restricción enzimática con las enzimas NdeI y XhoI liberando un fragmento de aproximadamente 438 pb que corresponde al gen que codifica para la leptina humana, el mismo proceso se realizó para el vector pET19bm obteniendo una banda de un peso aproximado de 5717 pb. Ambas bandas fueron purificadas y ligadas. El producto de ligación se utilizó para transformar a las bacterias *E. coli* DH5- α competentes, de las colonias crecidas se extrajo el DNA plasmídico y se realizó restricción enzimática con las enzimas NdeI y XhoI. En la figura 3.9 se muestra el análisis electroforético de una de las colonias analizadas que dieron como resultado la liberaron de un producto de 438 pb aproximadamente. Al menos 3 colonias con esta característica se sometieron a secuenciación para comprobar la subclonación.

En la figura 3.10 se muestra el alineamiento de secuencia de aminoácidos de la variante soluble y la construcción de vector de expresión donde se muestra el tracto de 10 histidinas y el sitio de proteólisis para PPS.

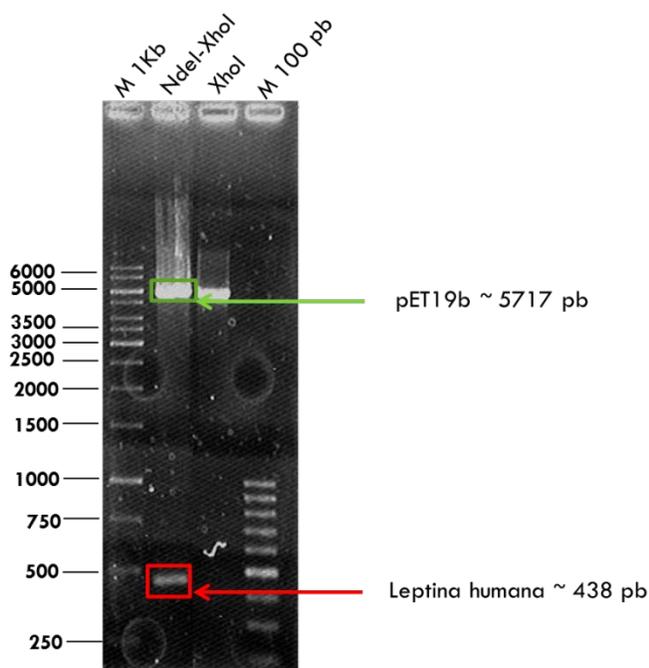


Figura 3.9. Análisis electroforético donde se observar en el carril 1) el marcador de 1 kb, en el carril 2) en verde se muestra una banda de aproximadamente 5717 pb correspondientes al vector pE19b y en rojo una banda de 438 pb aproximadamente correspondientes a la leptina humana lo que nos indica que el vector pEt19b tiene subclonado el gen que codifica para la leptina humana, en el carril 3) observamos la digestión con la enzima XhoI como control en este caso no se observa la liberación de la leptina y en el carril 4) el marcador de 100 pb.

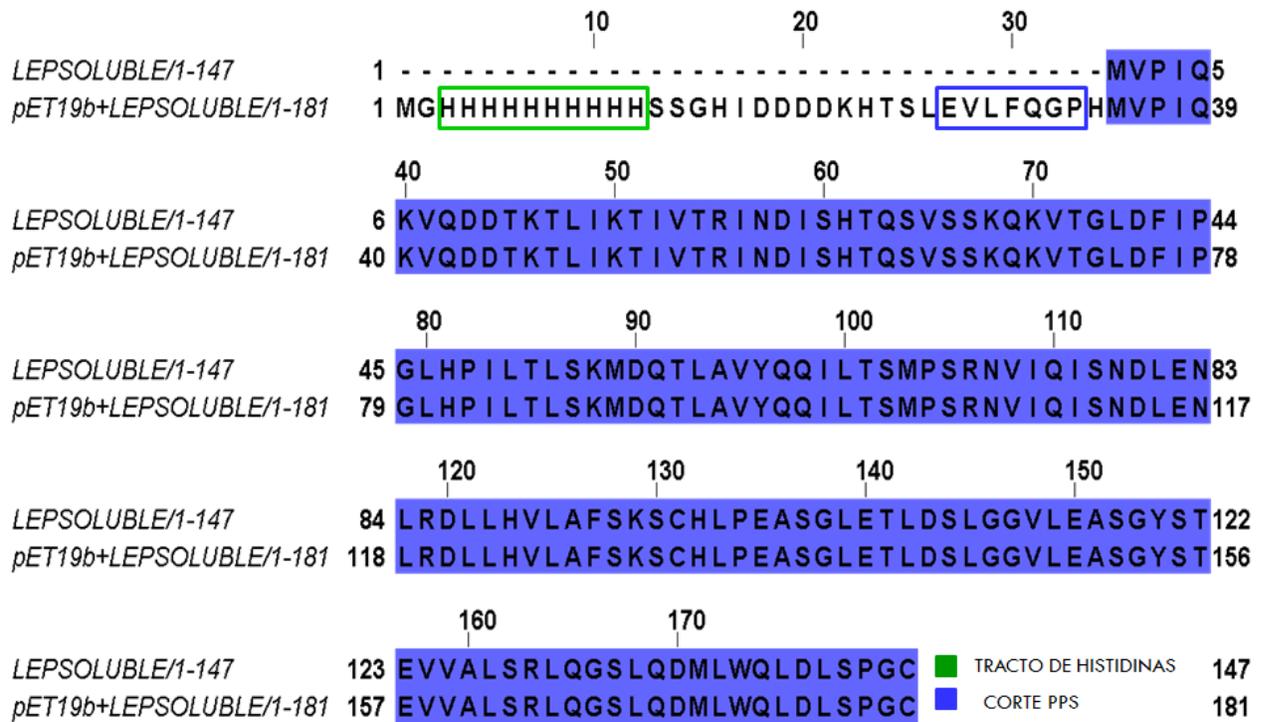


Figura 3.10. Alineamiento de la leptina donde se observa la secuencia de la leptina reportada en el gene bank y la secuencia de la leptina subclonada en el vector pEt19b modificado en color verde podemos observar el tracto de histidinas, en color azul el sitio de corte con PPS propio del vector pEt19bm donde se observa una identidad del 100%.

3.2.1 Obtención de la mutante W100E

Para obtener la mutante W100E fue necesario sustituir un triptofano (Codón GAG) en la posición 100 por un ácido glutámico (Codón CTC). Los codones se seleccionaron en base a su repetición en la secuencia. La construcción de la mutante se obtuvo mediante el QuikChange (Stratagene) site-directed mutagenesis kit utilizando oligonucleótidos específicos Fw 5´ AGC TGC CAC TTG CCG GAG GCC TCT GGC CTG GAG 3´ and Rv 5´ CTC CAG GCC AGA GGC CTC CGG CAA GTG GCA GCT 3´. Posteriormente se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), terminada la reacción se realizó la digestión utilizando la enzima Dpn1, y la transformación en células competentes *E. coli* cepa XL1- blue, posteriormente se realizó la extracción del DNA plasmídico el cual se mandó a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, la secuencia se tradujo utilizando el programa BioEdit versión 7.2.0 (Hall, 1999), para posteriormente identificar mediante un alineamiento múltiple la sustitución de los aminoácidos (Figura 3.11).

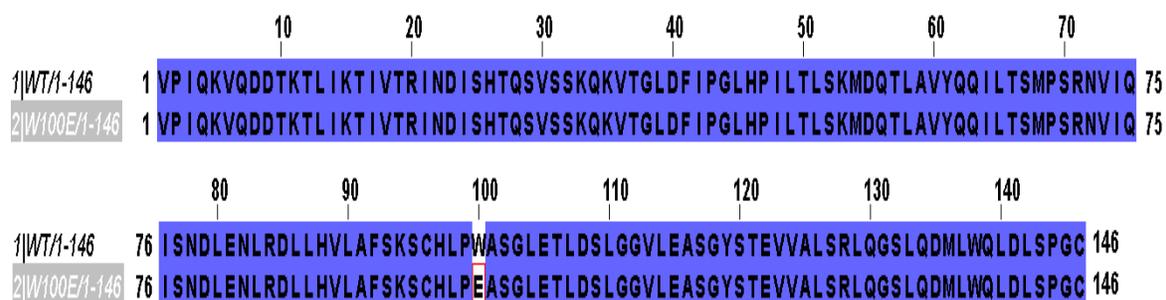


Figura 3.11. Alineamiento de la leptina silvestre y la mutante W100E donde se observa en el recuadro rojo la sustitución del aminoácido del Triptófano (W) por ácido Glutámico (E).

3.2.2 Sobreexpresión de la mutante W100E en un sistema heterólogo

Para la expresión de la mutante W100E se transformaron células competentes *E. coli* cepa BL21 pLYS-DE3 con el vector de expresión pET-19bm que contiene el gen que codifica para la leptina humana, la sobreexpresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG (concentración final de 1mM) cuando se alcanzó una $D.O._{600nm}=0.6$, el crecimiento bacteriano se continuó a 37 °C durante 18 horas obteniendo una muestra del cultivo antes de la adición del inductor (0 hrs) 1, 2, 3, 4, 5 y 18 horas después de la adición del inductor. Los productos obtenidos de los diferentes tiempos de sobreexpresión se analizaron mediante SDS-PAGE al 16%. Observando que la sobreexpresión se lleva mejor a 37° C después de 18 horas de la adición de 1 mM IPTG. En la figura solo se muestra el tiempo 0 antes de la adición del inductor y 18 horas después de la adición de IPTG (Figura 3.12-A).

3.2.3 Purificación de la mutante W100E

El proceso de purificación se realizó a partir de cuerpos de inclusión mediante cromatografía de afinidad como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Este análisis permitió obtener la proteína purificada hasta homogeneidad donde las fracciones eluidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE al 16% teñido con azul de Coomassie G-250. Posteriormente se realizara la eliminación del tracto de histidinas y la PPS mediante cromatografía de intercambio iónico (Figura 3.12-B).

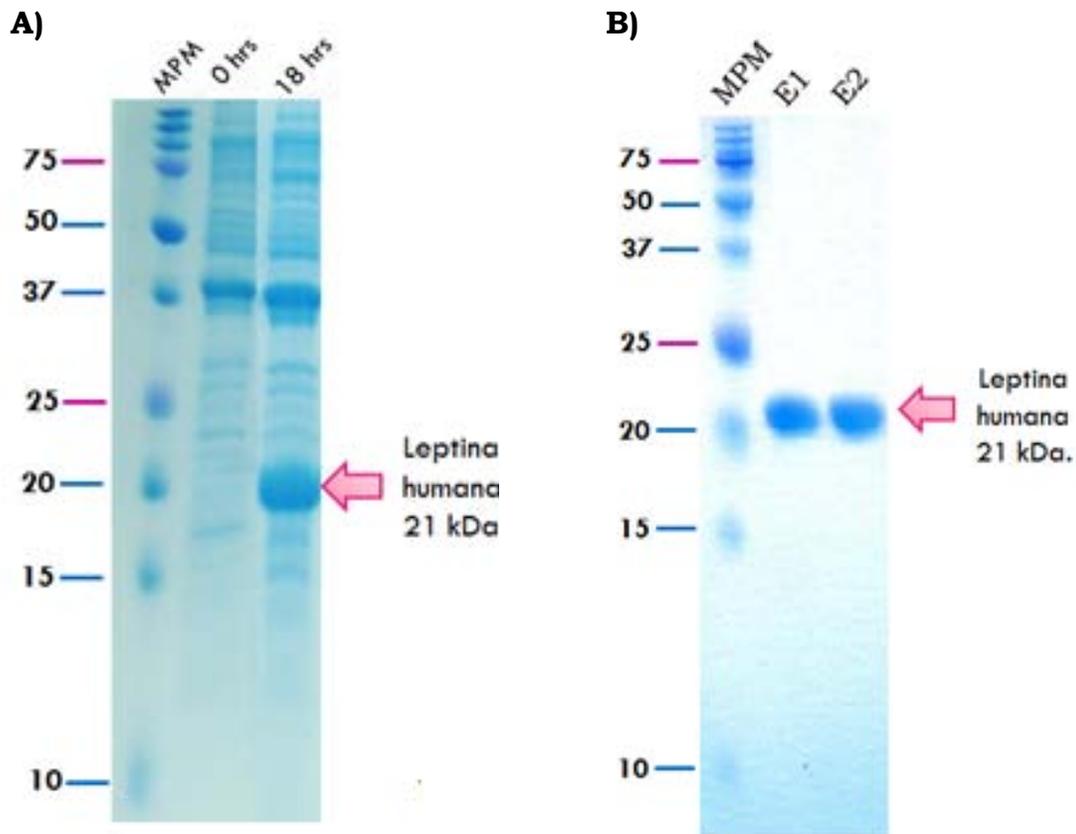


Figura 3.12. A) SDS-PAGE de la sobreexpresión de la mutante W100E. En el carril 1) se observa el marcador de peso molecular, en el 2) el tiempo 0 antes de la adición de IPTG y en 3) el lisado celular después de 18 hrs después de haber agregado el inductor. Observándose una banda del peso esperado de aproximadamente 21 kDa que corresponde a la leptina con el tracto de histidinas y el sitio de corte con PPS. **B)** Análisis electroforético de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación, en el carril 1) se observa el marcador de peso molecular, en el 2 y 3 las diferentes fracciones eluidas de la leptina humana W100E purificada.

3.2.4 *Eliminación del tracto de histidinas*

Para la eliminación del tracto de histidinas el análisis se hizo por cromatografía de intercambio iónico de alta resolución utilizando el equipo 1220 Infinity LC HPLC (Agilent Technologies). La proteína concentrada y filtrada fue cargada en una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) como se describió en el capítulo de materiales y métodos.

En la figura 3.13 A) podemos observar el análisis electroforético de la eliminación del tracto de histidinas en el carril 1) se observa el marcador de peso molecular (Fermentas), en el 2) cuerpos de inclusión, en el 3) la proteína purificada por cromatografía de afinidad donde se observa una banda de ~21 kDa, y en el carril 4) se observa un banda de ~16.2 kDa correspondientes a la leptina humana sin tracto de histidinas obtenida por cromatografía de intercambio iónico. En la figura B) se observa el cromatograma obtenido por la purificación de intercambio iónico donde se muestran las fracciones obtenidas, la F1 corresponde a la proteína de 16 kDa, la F2 al tracto de histidinas, la F3 y F4 a la proteína no cortada y la F5 a la PPS.

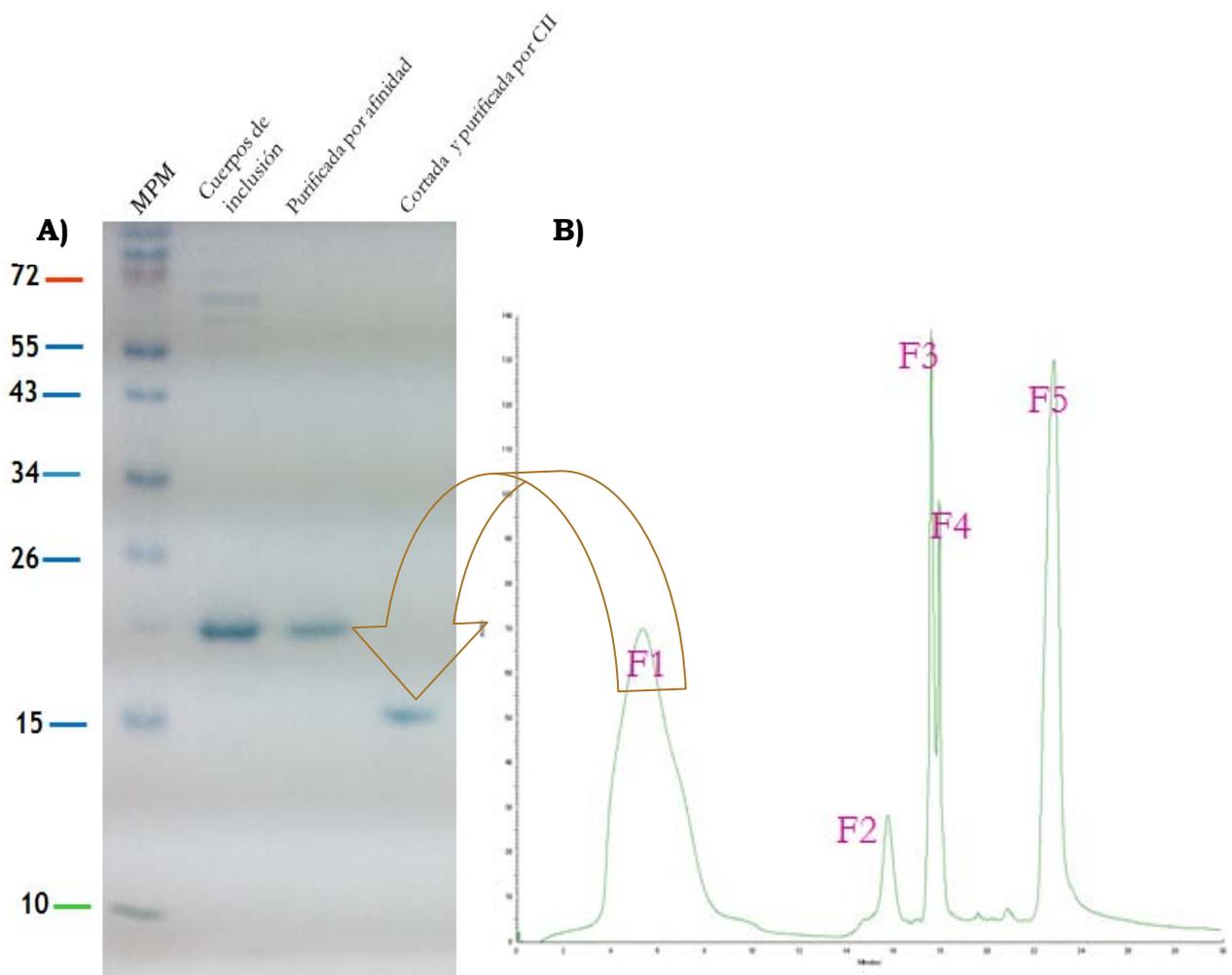


Figura 3.13. **A)** Análisis electroforético de la eliminación del tracto de histidinas. **B)** Cromatograma obtenido por la purificación de intercambio iónico.

3.3 Espectros y Transiciones de Dicroísmo Circular de la Leptina humana W100E.

3.3.1 Evaluación de la estructura secundaria

Apartir de la proteína purificada y cortada se obtuvo el espectro de DC de la leptina humana. En la figura se compara el espectro de la leptina humana silvestre reportado por **Raver N., 2000** con el de la leptina humana W100E a pH 8.0 y pH 2.0. Observando la similitud de los espectros e indicándonos que la mutación W100E de la leptina humana no altera significativamente la estructura secundaria de la proteína recombinante y que consta de todos los componentes de estructura secundaria (Figura 3.14).

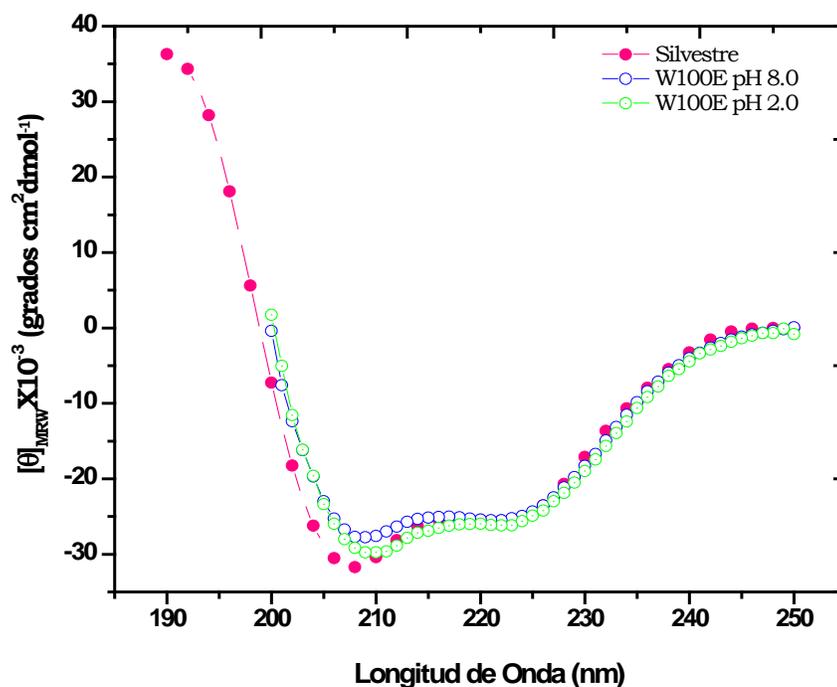


Figura 3.14 Evaluación de la estructura secundaria de la leptina humana silvestre y W100E mediante DC. Espectro de la leptina silvestre (Raver, N. 2000) —●— W100E purificada pH 8.0 —○— W100E purificada pH 2.0 —◇—

3.3.2 Transiciones de Desplegamiento térmico de la leptina humana W100E pH 8.0 y pH 2.0.

En la figura 3.15. Se muestran las transiciones y espectros de la evaluación de la reacción de despliegamiento térmico y reversibilidad del despliegamiento térmico de la leptina humana W100E. Las transiciones de despliegamiento térmico se realizaron a una velocidad de calentamiento constante de 2° C/min, en buffer de fosfatos (10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄ pH 8.0 y pH 2.0).

Nosotros observamos que la transición a pH 8.0 ocurre a una temperatura de 62° C esta es mayor que la transición a pH 2.0 ya que esta ocurre alrededor de 55° C lo que nos sugiere que la leptina a pH 8.0 es más estable, también observamos que la reacción de despliegamiento es de dos estados (sin intermediarios apreciables) . También se observa que la transición de despliegamiento es altamente reversible en ambos valores de pH ya que posteriormente al calentamiento la solución proteica fue enfriada para evaluar la reversibilidad y se observa como la señales de DC regresan al valor de la proteína nativa, indicando que el proceso de despliegamiento térmico es reversible casi al 100 % a pH 8.0, mientras que a pH 2.0 la reversibilidad es de aproximadamente 70 %. Adicionalmente observamos que a pH 8.0 el replegamiento es casi superponible con el perfil de calentamiento. Esto indica que el despliegamiento térmico de la leptina humana W100E ocurre bajo condiciones de equilibrio y que no se observan intermediarios aparentes.

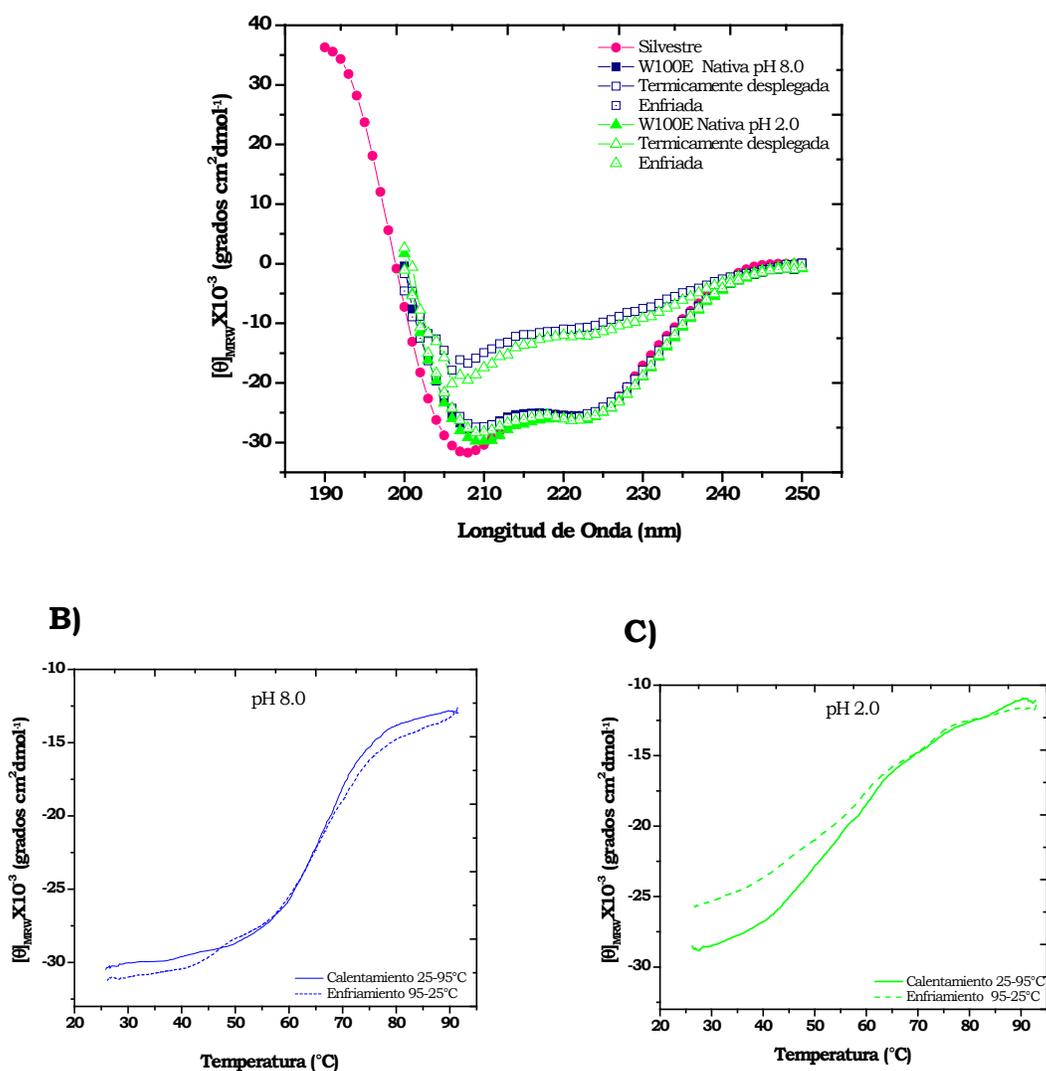


Figura 3.15. Transiciones y espectros de DC de Desplegamiento Térmico de la leptina humana W100E. A) El espectro en círculos rosa representa la leptina nativa silvestre, el espectro en $-\blacksquare-$ representa la leptina nativa W100E $-\square-$ la forma térmicamente desplegada, \square la proteína enfriada a pH 8.0 y en $-\blacktriangle-$ representa el espectro nativo, $-\triangle-$ forma desplegada y \triangle enfriada a pH 2.0. B y C) Las transiciones en azul corresponden a la leptina en pH 8.0, y en verde a pH 2.0.

3.3.3 Transiciones de Desplegamiento Químico de la Leptina Humana W100E pH 8.0.

Los espectros de DC en la región del UV lejano de la leptina humana W100E se obtuvieron de 220 nm a 250 nm. En la figura 3.16, se puede observar que ocurren cambios significativos en la señal de DC por incremento de la concentración de urea, lo que implica pérdida de la estructura secundaria de la proteína. Para la obtención de la transición de desplegamiento se graficaron los cambios de señal de DC a 225 nm contra la concentración de urea. Cabe señalar que se eligió esta longitud de onda para evaluar los cambios en la estructura secundaria porque es en ella donde se observan cambios significativos en el valor de la señal de DC, sin presentar demasiado ruido, especialmente en concentraciones altas de urea.

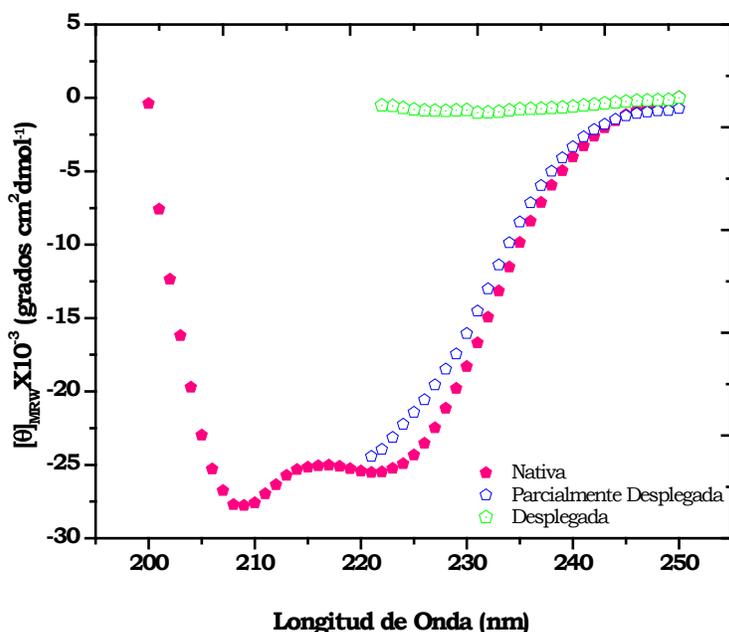
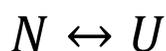


Figura 3.16. Espectro de DC de la leptina humana W100E en su forma nativa, parcialmente desplegada y desnaturalizada químicamente.

En la figura 3.17 se presenta la curva de transición de desplegamiento de la leptina humana silvestre y de la leptina humana W100E en presencia del agente desnaturante después de 3 h de incubación para la W100E. La característica más evidente de la transición es que se aprecia que el proceso de desplegamiento involucra únicamente dos estados en ambos casos sin presencia aparente de intermediarios, además de que la desnaturación se lleva a cabo a concentración media de urea de 4.5 M, observando la superposición de las transiciones.

Debido a esta observación, el modelo más sencillo que podría describir los datos experimentales es el modelo de dos estados:



Donde: N representa el estado nativo y U corresponde al estado desplegado.

Sin embargo, en nuestros experimentos aún no se ha podido comprobar la reversibilidad del proceso, que de hecho se plantea como una de las perspectivas del trabajo. A pesar de ello, una observación experimental aporta indicios acerca de la reversibilidad del proceso. Dicha observación es que durante el proceso de obtención de la muestra es necesario disolver los cuerpos de inclusión en altas concentraciones de 8 M de urea-50 mM Tris HCl pH 7.5 y posterior a la diálisis la proteína adopta una conformación nativa a juzgar por la señal de DC. Este hecho sugiere que el desplegamiento inducido por urea de la leptina humana W100E podría ser altamente reversible. En este caso las transiciones se muestran en unidades de f_D .

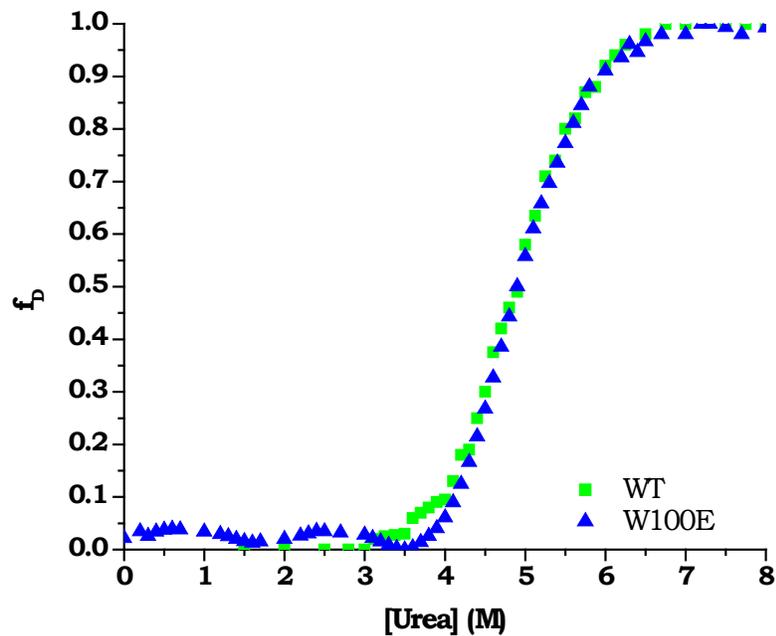


Figura 3.17. *Transición de desplegamiento de la leptina humana W100E y silvestre. Donde cada uno de los puntos representa los datos experimentales que corresponde a un modelo de dos estados, de acuerdo a la ecuación 1 del capítulo de tratamiento de los datos.*

3.3 4 Parámetros de Desnaturalización térmica y química de la leptina humana W100E.

La determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la reacción de desplegamiento térmico, requiere primero establecer el modelo de desplegamiento de la reacción y después utilizar las ecuaciones correspondientes (Capítulo 2-2.18, Tratamiento de los datos) las características a considerar es si la reacción se encuentra en equilibrio y la reversibilidad del proceso en los diferentes pH.

Para la reacción de desplegamiento por urea de la leptina humana está cerca del equilibrio, esto considerando la alta probabilidad de que el proceso sea reversible, así como la coincidencia de las transiciones que evalúan dos propiedades estructurales de la proteína, sin embargo, esto aún debe comprobarse.

Hasta ahora hemos visto que la leptina humana W100E en fosfatos, la reacción de desplegamiento es de dos estados del Nativo (N) al desnaturalizado (U) sin presencia de estados intermediarios evidentes ni en el desplegamiento térmico ni en el desplegamiento por urea.

Para el desplegamiento térmico se utilizaron las ecuaciones descritas en la sección de tratamiento de los datos correspondientes a este modelo, para calcular la temperatura media de la transición (T_m) y el cambio de entalpia (ΔH) asociado a la reacción de desplegamiento térmico.

Para el desplegamiento por urea los datos experimentales de la transición de desplegamiento obtenida a 225 nm, se analizaron mediante la ecuación 12 del capítulo de tratamiento de los datos. El mejor ajuste de los datos experimentales permitió calcular los parámetros termodinámicos asociados al proceso de desplegamiento y se presentan en la tabla 4.1. Cabe señalar que debido a que la reversibilidad no se ha comprobado ni el proceso de

desplegamiento está en equilibrio, los datos presentados se consideran aparentes (sufijo ap), por lo que se presentan para su comparación datos reportados para otras proteínas, y por el momento deben ser tomados con reserva.

El valor m representa la dependencia del cambio de energía libre Gibbs de desplegamiento con respecto de la concentración del desnaturalizante. Así mismo, se ha descrito que el valor m es directamente proporcional al cambio de área expuesta al solvente de una proteína debido al desplegamiento y de la energía necesaria para exponer al solvente los grupos químicos originalmente ocultos en la proteína nativa. La correlación entre el cambio de superficie accesible al solvente (Δ SASA) y el valor m se ha parametrizado utilizando la siguiente ecuación:

$$m = (0.14 \pm 0.001)x [\Delta\text{SASA} - (995 \pm 570)(\# \text{ de entrecruzamientos})](15)$$

El valor m_{N-U} se calculó utilizando la ecuación 19 del capítulo de tratamiento de los datos ($8.5 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$). Así mismo, se calculó el cambio en el área de la superficie accesible al solvente (Δ SASA). Para el cálculo del área accesible al solvente en la proteína nativa se utilizó el programa GETAREA (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>); mientras que el área expuesta al solvente de la proteína desplegada se estimó a partir de valores de triptidos Gly-X-Gly (**Pace, 1986**). El valor de Δ SASA se obtuvo a partir de la diferencia entre las superficies expuestas al solvente de la proteína nativa 15 y se obtuvo un m teórico de $1.38 \pm 0.08 \text{ kcal mol}^{-1}\text{M}^{-1}$ el cual es significativamente menor al valor calculado experimentalmente lo cual sugiere que el estado intermediario y el desplegado de la leptina exponen extensamente sus grupos originalmente ocultos, o bien que la energía necesaria para exponer esos grupos es elevada, incluso más alta del valor estimado teóricamente. También se realizó una comparación del valor m (Tabla 4.1) de la leptina humana variante soluble con el otras proteínas

Chew, FynSh3 CTL9, Im7 y G-CSF donde el valor m para cada proteína corresponde a 1.197 ± 0.6 kcal mol⁻¹, 0.401 ± 0.17 kcal mol⁻¹, 0.329 ± 0.10 kcal mol⁻¹, 1.245 ± 0.09 kcal mol⁻¹, 3.43 ± 0.09 kcal mol⁻¹ respectivamente observando que el valor de m calculado para la leptina humana es mayor lo que significa que la energía necesaria para exponer los grupos originalmente ocultos es mayor.

Proteína	Modelo	ΔG_{ap} (kJ·mol ⁻¹)	m_{ap} (kJ·mol ⁻¹ M ⁻¹)	ΔH_{ap} (kJ·mol ⁻¹) pH 8.0	Tm (K) pH 8.0	ΔH (kJ·mol ⁻¹) pH 2.0	Tm (K) pH 2.0
W100E	$N \leftrightarrow U$	19.8 ± 0.8	4.0 ± 0.09	216 ± 0.9	62	150 ± 0.4	56

Tabla 3.1. Valores de los parámetros termodinámicos determinados a partir del ajuste de los datos de la curva de desplegamiento de la leptina humana W100E obtenidos en buffer de fosfatos pH 8.0 y pH 2.0.

<i>Proteína</i>	<i>PDB</i>	<i>Condiciones de equilibrio</i>	<i>Número de aminoácidos</i>	<i>Vía de Desplegamiento</i>	ΔG° (kJmol ⁻¹)°	ΔH (kJmol ⁻¹)°	<i>m</i> (kJ/mol/M)	<i>T_m</i> (°C)	<i>Ref.</i>
Leptina WT	-	20 mM MES, 50 mM Tris buffer/Urea	146	$N \leftrightarrow U$					Patente
Leptina W100E pH 8.0	1AX8	20 mM Fosfato de potasio/Urea/pH 8/25°C	146	$N \leftrightarrow U$	19.8 ± 0.8	216 ± 0.9	4.0 ± 0.09	62	-
Leptina W100E pH 2.0		20 mM Fosfato de potasio/Urea/pH 2/25°C	146	$N \leftrightarrow U$	-	150 ± 0.4	-	56	-
Im7	1CEI	50 mM fosfato de Na/ 2mM DTT/Urea/ pH 7.0/10°C 50 mM fosfato de Na/0.4 M Na ₂ SO ₄ / 1 mM EDTA/urea/ pH 7.0	85-87	$N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$	16.8 ± 0.3 -24.9 ± 1.3	-	5.21 ± 0.09		Stuart K. 2011
Im9	1IMQ	50 mM fosfato de Na/ 2mM DTT/Urea/ 1 mM EDTA/pH 7.0/10°C	85-87	$N \leftrightarrow U$ $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$	26.1 ± 0.5 -27.4 ± 0.2	-	4.62 ± 0.09		Susanne CM. 2005
G-CSF	2GMF	100 mM fosfato de Na/ 200 mM NaCl /GdnHCl/pH 7/ 25°C		$N \leftrightarrow U$	-39.52 ± 0.24	-	14.36 ± 0.09		Barney B. 2009
FySH3		Fosfato/GuHCl	141	$N \leftrightarrow U$	20.3 ± 1.4		-6.1 ± 0.4		
CTL9		20 mM Fosfato/pH 8/0.1 M NaCl/urea	149	$N \leftrightarrow U$	27.2 ± 0.3		-4.4 ± 0.1		
CheW		Fosfato/GuHCl	151	$N \leftrightarrow U$	50.2 ± 0.6		-14.6 ± 0.2		
Interleukin-4	2B8U	10 mM Fosfato de Na/urea/pH 6/25°C	129	$N \leftrightarrow U$	38.93 ± 0.4	427.04	5.02 ± 0.08	83.8	Vaz DC. 2005
FF domain	1UZC	50 mM acetato de Na/ 100 mM NaCl/1 mM EDTA/ 1 mM azida de Na/pH 5.7/ 90% H ₂ O/10% 2H ₂ O	60	$N \leftrightarrow I$	-	-	~2.09	-	Ashok S. 2012

Tabla 3.2. Valores de los parámetros termodinámicos de diferentes proteínas estructuralmente parecidas a la leptina humana.

Resultados in vivo

3.4 Efecto de la mutante W100E sobre el peso corporal en modelo de ratón obeso

Anteriormente se mencionó que el uso de la leptina recombinante es limitado, debido a que se ha observado su baja solubilidad a pH fisiológico, y que esto podría contribuir a la precipitación de la proteína en el sitio de inyección, así como a la vida media de la proteína, por lo cual nosotros en este trabajo administramos leptina humana recombinante mutante W100E en ratones con una dieta normal, una dieta alta en grasa/y alta en fructuosa. Estos resultados nos ayudaran a comprender como superar la vida media de la leptina en circulación, la solubilidad y como consecuencia la difusión del uso de esta hormona como una opción terapéutica contra la obesidad y el sobrepeso.

En la Figura 3.18 se muestra el consumo de alimento durante 10 días de tratamiento con la leptina W100E, se observa que cuando los ratones recibieron la dieta estándar y se trataron con la leptina incrementaron significativamente el consumo de alimento (lote W100E), mientras que los que recibieron una dieta alta en grasa y en fructosa y el tratamiento con la hormona (HFHF+W100E) disminuyeron su consumo de alimento.

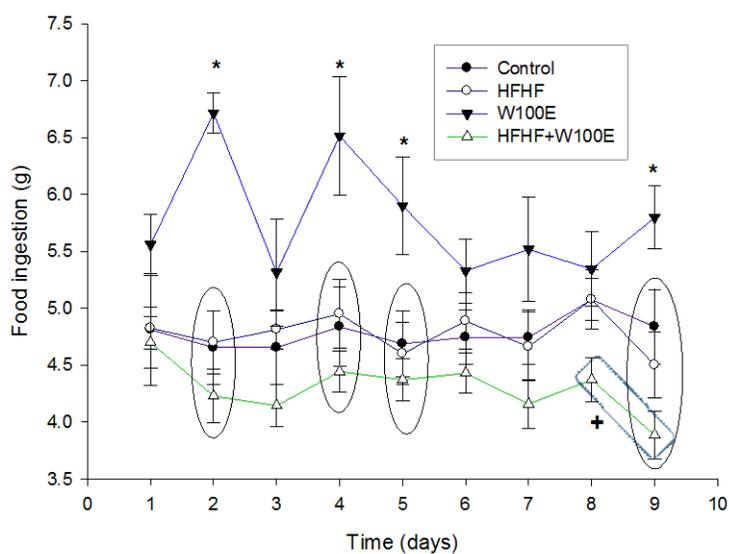


Figura 3.18. Consumo de alimento durante 10 días de tratamiento con leptina W100E. Se muestra el consumo de alimento de los ratones sometidos a una dieta alta en calorías (HFHF) con y sin tratamiento de leptina W100E, así como la diferencia significativa * $p < 0,05$ frente a control y HFHF, HFHF+W100E, + $p < 0.05$ vs control. ANOVA RM de dos factores, prueba post hoc Holm Sidak.

En la Fig.3.19 se muestra el peso corporal de los ratones sometidos a una dieta hipercalórica durante el tratamiento con leptina W100E. No se encontraron diferencias significativas, pero se observa que el lote de dieta hipercalórica más leptina (HFHF+W100E) gana menos peso que los ratones de los otros tratamientos.

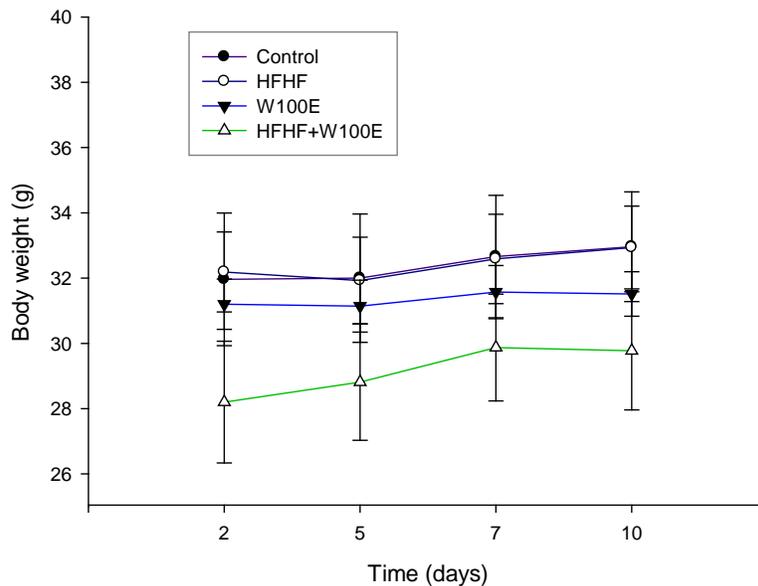


Figura 3.19. *Peso corporal de los ratones con una dieta alta en calorías (HFHF) durante el tratamiento con y sin leptina W100E, ANOVA RM de dos factores.*

En la Figura 3.20 se muestran los datos de la grasa retroperitoneal y epididimal de los ratones sometidos a las dietas estándar e hipercalórica con y sin tratamiento con leptina W100E. Se observa que los ratones que recibieron la dieta hipercalórica (HFHF) presentaron mayor contenido de grasa que los del lote control y que los ratones que recibieron la leptina W100E y la dieta con alto contenido energético (HFHF+W100E) tienen menos grasa, aunque no difiere significativamente de lote HFHF pero tampoco del control.

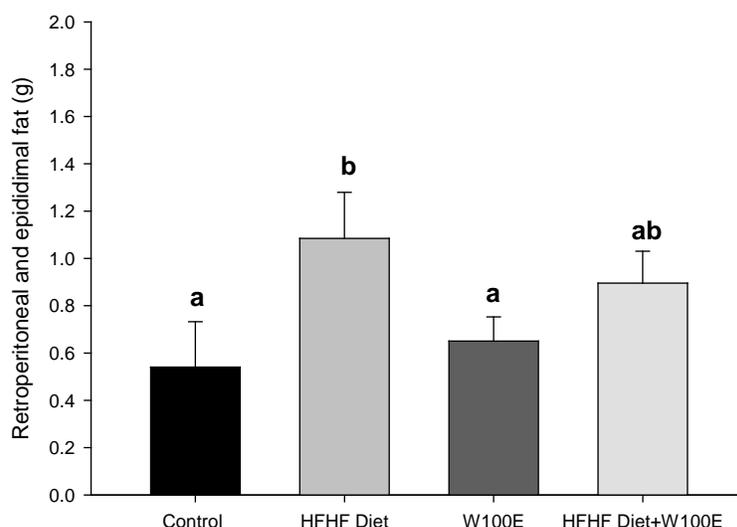


Figura 3.20. Grasa retroperitoneal y epididimal de los ratones sometidos a una dieta hipercalórica con y sin tratamiento con leptina W100E. Literales diferentes $p < 0.05$ entre lotes. ANOVA de una vía, prueba post hoc Holm Sidak.

En la figura 3.21 se muestra el perfil lipídico de los ratones sometidos a una dieta hipercalórica con y sin tratamiento con leptina W100E. Se observa que no se encontraron diferencias significativas en el colesterol total (Fig. 4A), en cambio los triglicéridos aumentaron significativamente en los ratones tratados con la dieta HFHF, mientras que los que recibieron la dieta estándar y leptina W100E muestran un ligero aumento aunque no difiere del control, pero tampoco de la dieta HFHF. Mientras que los ratones que recibieron la dieta hipercalórica y la leptina W100E disminuyeron significativamente los triglicéridos comparados con el lote HFHF. En cuanto al colesterol HDL se observa el efecto contrario, ya que los ratones que recibieron la dieta HFHF+W100E muestran un incremento significativo de esta variable. No se encontraron diferencias significativas en el colesterol LDL.

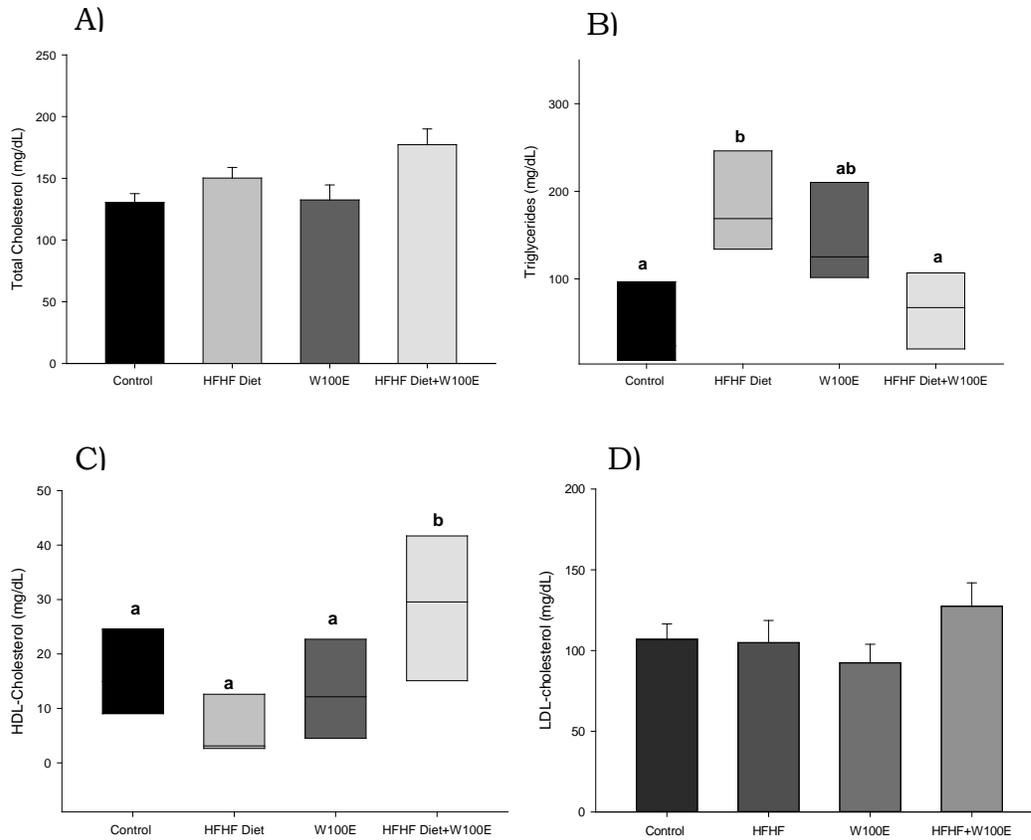


Figura. 3.21. Perfil lipídico de los ratones sometidos a una dieta hipercalórica y después del tratamiento con o sin leptina W100E. A) Colesterol Total, B) Triglicéridos, C) HDL-Colesterol y LDL-colesterol. Literales diferentes $p < 0.05$ entre lotes. A) ANOVA de una vía, prueba post hoc Holm Sidak; B) y C) ANOVA on Ranks, prueba post hoc Dunn's.

Finalmente al terminar los tratamiento, se siguió registrando el consumo de alimento diariamente y la ganancia de peso corporal durante una semana. En la figura 3.22 se muestran los resultados del consumo de alimento, se observa que los ratones que habían recibido leptina W100E con la dieta normal muestran alteración en la ingesta de alimento ya que se observan oscilaciones en esta variable al interrumpir el tratamiento. En cuanto a los que recibieron la dieta HFHF y leptina W100E, se observa que 2 días después del tratamiento disminuye el consumo de alimento, sin

embargo en los días subsiguientes vuelve a incrementar el consumo a niveles normales.

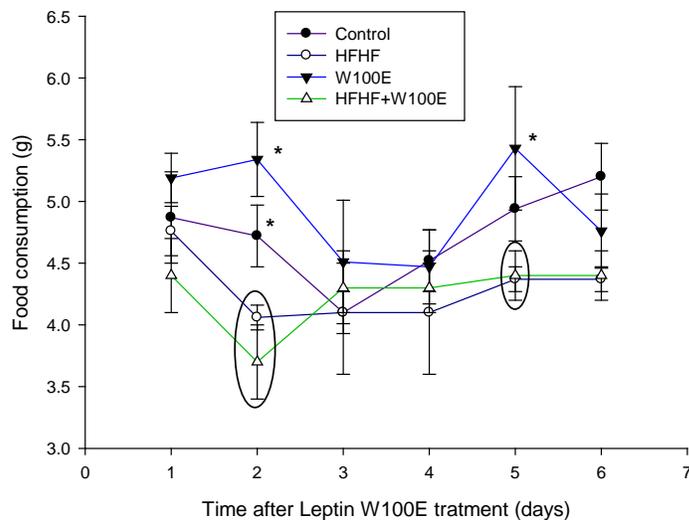


Figura 3.22 Se muestra la ingesta de alimento después de 5 días de tratamiento con leptina W100E. * $p < 0.05$ vs HFHF y grupo control ANOVA RM de dos vías, prueba post hoc Holm-Sidak.

En la figura 3.23 se muestra la ganancia de peso corporal de los ratones una semana después de terminar el tratamiento con leptina W100E. Se observa que incrementó significativamente en los ratones con dieta HFHF y W100E y en el lote HFHF+W100E con respecto al testigo, aunque el incremento fue menor en este último grupo.

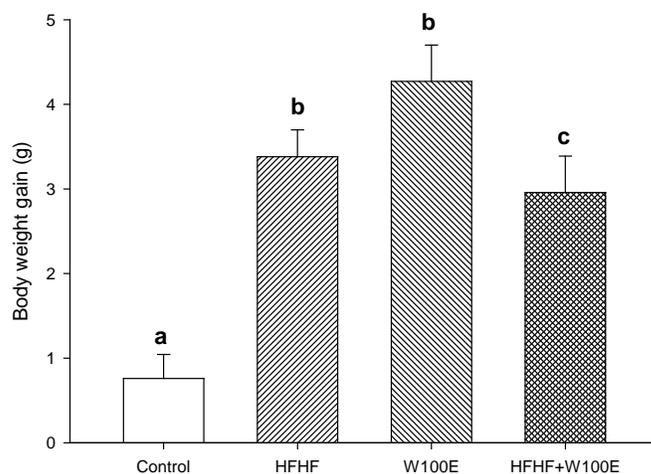


Figura 3.23. *Ganancia de peso corporal, una semana después del tratamiento final con leptina W100E. Literales $p < 0,05$, ANOVA de una vía, prueba de pot hock Holm-Sidak.*

Capítulo 4
Discusión

4. *Discusión*

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que se desarrolla a partir de un desequilibrio entre la energía ingerida y el gasto energético, es decir una acumulación anormal o excesiva de energía en forma de grasa en el tejido adiposo, siendo este resultado de la combinación de varios factores fisiológicos, psicológicos, metabólicos, genéticos, socioeconómicos, culturales y emocionales (**Blancas-Flores et al., 2010**). Actualmente se sabe que la obesidad es un problema de salud pública y que la lucha contra esta es muy compleja, por lo tanto se llevan a cabo varios esfuerzos para proponer alternativas para ayudar en el tratamiento de la obesidad. Entre ellos, el suministro de leptina se ha considerado como una alternativa potencial desde su descubrimiento (**Zhang et al, 1995.**), sin embargo, el entusiasmo inicial desapareció al observar que comúnmente obesos y personas con sobrepeso mostraban niveles aumentados de leptina circulante, pero durante las dos últimas décadas, hemos aprendido acerca de las vías de señalización, el fenómeno de resistencia a la leptina, su relación con otras importantes hormonas y como podría participar en otros procesos fisiológicos como en la formación de hueso, desarrollo de los órganos reproductores entre muchas otras funciones. En cuanto a la estructura de la leptina, las coordenadas cristalográficas disponibles en el PDB fueron obtenidas mediante la sustitución de un triptófano en la posición 100 por un ácido glutámico (**Zhang et al., 1997**), mostrando una actividad biológica similar a la silvestre pero con un aumento considerable en la solubilidad y viabilidad para cristalizar. En este proyecto de tesis se evaluaron diferentes aspectos de la leptina como su estabilidad tanto *in silico* como *in vitro* y su función. Para poder analizar su estabilidad mediante análisis *in silico* fue necesario obtener las coordenadas de la leptina silvestre y W100E, este primer paso fue necesario debido a que la estructura cristalográfica de la leptina humana carece de los residuos 25-38, por lo que esta región fue modelada por el servidor I-Tasser. Fue

notable observar que esta región fue modelada de manera diferente en la leptina silvestre y W100E utilizando tanto el servidor I-TASSER, como otros programas modeladores. Esta región se predijo como una hélice (residuos 34-41) para la W100E y como una región no estructurada para la silvestre. Durante las simulaciones cada proteína mostro un comportamiento diferente a las temperaturas ensayadas, demostrando que la sustitución de un único residuo de aminoácido implica movimientos conformacionales diferentes, estas diferencias fueron apreciables tanto en las cercanías de la mutación, así como en los sitios distantes de la sustitución. Además el potencial electrostático de la superficie de la proteína es diferente en cada construcción. Es posible que los cambios conformacionales y de dinámica molecular favorecieron la propensión a cristalizar de la leptina W100E sin afectar su actividad biológica, ya que la mutación no reside en las regiones reportadas como principales involucradas en la interacción de la leptina con su receptor.

Gracias a un conjunto de análisis se propone que la región comprendida entre los residuos 25 al 38 podría ser una región intrínsecamente desordenada (RID). Esta propuesta se basa en varias evidencias:

- a) los residuos 25 al 38 muestran una pobre densidad de electrones en el análisis cristalográfico **(Zhang, 1997)**.
- b) Los programas modeladores generan modelos diferentes para esta región en la proteína silvestre y mutante W100E
- c) También se observó que durante las simulaciones a 300 y 400 K esta región junto con los residuos 25-41 muestran una tendencia a adoptar una conformación β ,
- d) un análisis exhaustivo utilizando el programa IUPred **(Dosztányi, 2005)** reveló que esta región muestra una tendencia desordenada mayor que resto de los aminoácidos ambas proteínas, incluso más alto que el N y el C-terminal.

- e) Los modos normales mediante el servidor ElNemo identificamos que esta región tiene una alta movilidad dentro de toda la estructura en ambas construcciones.

Se ha visto que regiones intrínsecamente no estructuradas en las proteínas no tienen una estructura terciaria bien definida en su estado nativo, y en este caso la región 25-41 se asemeja al estado desnaturalizado de una proteína y parece interconvertir entre estructuras alternativas, mientras que algunos tienen tendencia a formar estructura secundaria locales ya sea α -hélice o laminas- β . Con esto nos surge la duda de para qué necesita la leptina adoptar una RID? Una posibilidad podría ser la de facilitar la interacción de la leptina con su receptor, ya que hasta la fecha la hélice $\alpha 1$ y $\alpha 3$ se han descrito como las principales regiones responsables de la interacción con el receptor. A pesar de que las RID se han identificado en tener un papel importante en el reconocimiento molecular en el que el cambio estructural confiere ventajas específicas, tales como el aumento de la velocidad de interacción y la especificidad. También algunas regiones desordenadas pueden constituir enlazadores o espaciadores flexibles, que tienen un papel en la formación de conjuntos macromoleculares, esto abre la posibilidad de que la región entre los residuos 25 al 41 podrían estar también implicados en la señalización celular de la leptina, otra opción de una RID podría ser que la región N-terminal se enrosca a través de lazo covalente (residuos 96-146), para formar el nudo corredizo característico de la estructura de la leptina. Sin embargo se necesita más investigación para confirmar cualquiera de estas posibilidades o postular otra posible

En la actualidad se desconoce el mecanismo a través del cual una cadena polipeptídica adquiere su estructura nativa entre un enorme número de conformaciones. Por lo que los estudios de plegamiento/desplegamiento permiten describir estructuralmente las especies presentes en el proceso y

con ello determinar la posible presencia de intermediarios ya sea estables o cinéticos, estos estudios pueden desarrollarse de manera *in silico* o de manera *in vitro*.

Con respecto al desplegamiento *in silico* la característica topológica de la leptina implica la formación de un nudo en la región N-terminal a través de un loop covalente formado por un puente disulfuro entre el C-terminal y el residuo 96, lo que la hace un candidato interesante y desafiante para explorar su espacio conformacional, así como su vía de desplegamiento. Nosotros presentamos en este trabajo las coordenadas tanto de la leptina silvestre y W100E las cuales sometimos a DM a diferentes temperaturas 300 K, 400 K y 500 K, observando que a 500 K ambas construcciones pierden su estructura nativa durante el curso de las simulaciones, y que esta pérdida de estructura se hace por vías diferentes para cada construcción. En ambos casos se observó que la región más inestable corresponde a $\alpha 1$, otro cambio conformacional que observamos durante el desplegamiento de la leptina fue la movilidad y separación desde el núcleo principal de la proteína del loop $\alpha 3$ y $\alpha 3'$. En la proteína silvestre se pierde el contenido helicoidal de $\alpha 2$ y $\alpha 4$, pero estas dos hélices principalmente la $\alpha 2$ son propensas a recuperar parte de su estructura secundaria. Por el contrario, en la proteína mutante una vez que $\alpha 2$ y $\alpha 4$ han perdido su estructura secundaria son incapaces de recuperarla. Las regiones más estables podrían ser la hélice $\alpha 2$ en la proteína silvestre y la hélice $\alpha 3$ en la mutante W100E, ya que mantiene durante periodos más largos su helicidad durante el curso de las simulaciones. Por otro lado hemos encontrado que las interacciones entre Ile64-Leu90-S67 y Thr27-Ser67 se conservan en la leptina silvestre y que estas podrían contribuir a estabilizar la hélice $\alpha 2$. Por el contrario estos pares no se observan en la leptina W100E después de 3 ns de simulación a 500 K, además de que nos dimos cuenta de que la sustitución de triptófano por un ácido glutámico en la posición 100 introduce una red de interacciones electrostáticas, la

cual estabiliza a la hélice α_3 , esta red está formada principalmente por R84, que está orientada hacia el E100 y forma un puente salino, y Q56 forma una interacción electrostática con los residuos iónicos R84 y E100, esto representa una compensación para aumentar la estabilidad de α_3 a expensas de la reducción de la estabilidad de α_2 en la proteína mutante. Es importante resaltar que ninguno de las dos construcciones muestra la pérdida del nudo lo que significa que durante el curso de las simulaciones, el N-terminal es incapaz de des-anudarse a través del espacio interior del loop covalente. Este loop contiene a la hélice α_3 y α_3' , y como hemos mencionado esta región se aleja del núcleo de la proteína dando espacio para que el N-terminal de desenroscarse a través del loop covalente, pero a pesar de, el nudo se mantiene durante el curso de la simulación a 500 K en ambas construcciones de la leptina.

En el desplegamiento *in vitro* se ha reportado que las proteínas pequeñas, formadas por menos de 100 residuos de aminoácidos, generalmente presentan un mecanismo de desplegamiento de dos estados $N \leftrightarrow U$. Es probable que conforme aumenta el número de residuos de aminoácidos, pueden presentarse más de dos estados en el mecanismo de desplegamiento, es decir pueden acumularse intermediarios estables, o conformaciones parcialmente plegadas. También se ha sugerido, que estos intermediarios, además de proveer información sobre los primeros eventos de la ruta de plegamiento/desplegamiento, podrían existir en el ambiente celular y estar involucrados en una variedad de procesos fisiológicos, como el reconocimiento por chaperonas, interacción con ligandos, así como el transporte a través de las membranas para alcanzar sus destinos finales en el interior o exterior de la célula. Las conformaciones parcialmente plegadas se pueden detectar en estudios en equilibrio si estos se acumulan en condiciones relativamente suaves de desnaturalizantes químicos, bajo pH, o pueden estabilizarse gracias a mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos. Muchos estudios han demostrado que las especies

intermediarias en la ruta de plegamiento/desplegamiento pueden ser muy distintos en estructura secundaria al estado nativo y poseer distintos grados de compacticidad, dependiendo tanto de la proteína como de las condiciones fisicoquímicas que estabilizan a dicho intermediario (**Byschkova 1996, Fink 1998, Ballerny 1993, Barrick 1994, Matthews 1993, Dubey 1993, Travaglini 2005**).

En el caso de la leptina W100E, su mecanismo de desplegamiento tanto térmico como por presencia de urea se lleva a cabo por medio de un modelo de dos estados, sin presencia de intermediarios aparentes. Al calcular los parámetros termodinámicos mediante el ajuste de los datos experimentales de la curva de transición térmica a pH 8.0 y pH 2.0 obtuvimos un valor de ΔH_{N-U} 216 ± 0.9 y 150 ± 0.4 kJ·mol⁻¹M⁻¹ respectivamente, en donde el desplegamiento inicia temperaturas de 62° C y 50° C observando que la leptina W100E es más estable a pH básicos que a pH ácidos, por otro lado al calcular los parámetros termodinámicos mediante el desplegamiento por urea obtuvimos que el cambio de energía libre entre el estado desplegado y el estado nativo es de ΔG_{N-U} 19.8 ± 0.8 y al comparar la estabilidad de la leptina en términos de ΔG , con el de otras proteínas con número de residuos de aminoácidos, estructura y mecanismo de desplegamiento similar observamos que la leptina humana presenta mayor estabilidad, de manera global.

Con todo lo anterior podemos concluir que la leptina humana W100E es una proteína estable y que es muy probable que el puente disulfuro presente en la estructura de la leptina sea responsable de manera importante para estabilidad.

Finalmente realizamos una búsqueda exhaustiva sobre el efecto de la leptina W100E en la ingesta de alimentos, el peso corporal, perfil lipídico y efecto rebote en ratones sometidos a una dieta estándar o hipercalórica, Sin embargo no encontramos ningún informe donde utilizaran esta construcción. Por otro lado hay reportes del uso de la leptina como

tratamiento en este caso utilizan una variante denominada metreleptin o una variedad de mutantes analógicas construidas con diferente composición a la leptina W100E.

Tomando en cuenta que una sola mutación puntual puede ser suficiente para modificar la conformación, estabilidad y funcionalidad de cualquier proteína, nos dimos a la tarea de hacer un estudio detallado de cómo el tratamiento con esta mutante podría ser útil en el tratamiento de la obesidad y parámetros lipídicos en un modelo murino y observamos que el tratamiento con leptina W100E hecho reduce la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratones obesos. En el mismo grupo los niveles de colesterol total fue incrementado, así como HDL y colesterol LDL triglicéridos. Por el contrario, la ingesta de alimentos y el total de colesterol, se incrementó en ratones con dieta normal, mientras que el colesterol LDL se redujo en este grupo.

Por todo lo anterior la caracterización exhaustiva de la leptina generada en esta tesis nos acerca al uso de la leptina como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad

Capítulo 5
Conclusiones

5. Conclusiones

En este trabajo se evaluó la conformación, estabilidad y funcionalidad de la leptina humana W100E comparándola en ciertos aspectos con la silvestre.

Primero se evaluó la conformación de la Silvestre y la leptina W100E mediante simulaciones por dinámica molecular a 300, 400 y 500 K, se concluyó que ambas construcciones varían en sus movimientos conformacionales, estabilidad y vía de desplegamiento. Se identificaron una red de interacciones entre las diferentes construcciones que contribuyen a las diferencias en su estructura y características dinámicas. Además estas interacciones contribuyen a mantener la hélice $\alpha 2$ en la leptina silvestre y hélice $\alpha 3$ en la leptina W100E. Además, identificamos que la región entre los residuos 25-41 podría ser descrito como una región putativa intrínsecamente desordenadas. Las razones para encontrar esta región no estructurada dentro de la leptina podría ser estructural o funcional. Nuestros hallazgos podrían ser útiles para facilitar el uso terapéutico de la leptina.

También se evaluó la estabilidad térmica a pH 2.0 y pH 8.0 así como también la estabilidad química de la leptina humana W100E, utilizando como agentes desnaturizantes la temperatura y la urea y como solución amortiguadora fosfato de potasio. Primero se evaluó el contenido de estructura secundaria comparándola con la proteína silvestre (silvestre) observando la similitud de los espectros, lo que implica que la leptina humana W100E contiene todos los elementos de estructura secundaria.

Posteriormente se evaluó la estabilidad química y térmica y se obtuvieron transiciones de desplegamiento donde los resultados revelaron que el mecanismo de desplegamiento de la leptina humana variante soluble se ajusta a una ecuación que describe un modelo de dos estados sin la presencia de intermediarios evidentes:

$N \leftrightarrow U$

A partir de las transiciones de desplegamiento, se obtuvieron los datos termodinámicos ($\Delta H, \Delta G, \text{valor } m, Tm$) asociados a la reacción de desplegamiento, observando que la leptina tiene una estabilidad mayor al de las proteínas similares ya sea en tamaño, estructura tridimensional o en mecanismo de plegamiento. Es probable que el puente disulfuro confiera estabilidad a la estructura de la leptina. Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes desde el punto de vista fisiopatológico en los casos en que se ha observado hiperleptinemia. Así mismo es importante tomar en cuenta los datos de estabilidad de la leptina, en caso de ser usada como agente terapéutico.

Finalmente se evaluó la función de la leptina W100E en un modelo murino y observamos que el efecto de la leptina W100E es diferencial entre los ratones que recibieron una dieta estándar y los que recibieron la dieta hipercalórica que en los animales con dieta estándar originó un mayor consumo de alimento, sin embargo no incrementó el peso corporal pero sí el colesterol total y que en los animales con dieta hipercalórica disminuyó el consumo de alimento y el peso corporal, así como los triglicéridos, e incrementó los niveles de colesterol-HDL, y que al interrumpir el tratamiento con leptina se observó una alteración en el patrón de consumo de alimento ya que se observaron oscilaciones y esto provocó un incremento en el peso corporal, observando un efecto de rebote, tanto en los animales con dieta normal como los de dieta hipercalórica.

La información generada en esta tesis tiene implicaciones importantes en el posible uso de la leptina como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad

Capítulo 6
Perspectivas

6. Perspectivas

Se ha reportado que las mutaciones en el gen que codifica para leptina son poco frecuentes, sin embargo recientemente se han encontrado algunas mutaciones que afectan la unión con el receptor u ocasionan diferentes patologías, a pesar de, no sabemos cómo se comportan estas mutantes en cuanto a su plegamiento y estabilidad, por lo que podríamos obtener las construcciones de las mutantes reportadas mediante mutagénesis dirigida y evaluar su estabilidad y con ello establecer la contribución de los aminoácidos o interacciones particulares sobre la estabilidad de la leptina, así como también podríamos evaluar su mecanismo de plegamiento/desplegamiento.

También podríamos identificar las mutantes o polimorfismos que ocasionan obesidad mórbida y otras patologías en la población mexicana, ya que no hay reportes al respecto.

Otra estrategia interesante sería diseñar nuevas mutantes mediante análisis in silico que puedan favorecer la estabilidad de la leptina así como su función biológica.

Por otro lado, después de que analizamos los resultados de desplegamiento térmico y químico para la W100E, sería interesante evaluar nuevas estrategias de estudio que nos permitan caracterizar de manera más detallada el proceso de desplegamiento de la leptina. Una de ellas sería evaluar la estabilidad de la proteína utilizando otros agentes desnaturizantes como pH, fuerza iónica, someter a la proteína a diferentes buffers, comprobar la reversibilidad del proceso de desplegamiento. Así como comparar la estabilidad de la leptina W100E con otras variantes de leptina, y podríamos utilizar otras técnicas

espectroscópicas tales como fluorescencia de flujo detenido, RMN, calorimetría entre otras.

También se ha reportado que el puente de disulfuro juega un papel importante en la función biológica de la leptina, otra estrategia que podríamos utilizar es eliminar el puente de disulfuro o introducir otro y con ello comprobar si este le confiere o no estabilidad a la proteína y comprobar si se afecta su función biológica.

Por otro lado también se ha reportado el uso de la leptina como posible agente terapéutico contra la *diabetes mellitus* tipo I podríamos evaluar el efecto de la W100E o de otras variantes como posible tratamiento en esta patología.

De esta manera podríamos evaluar la posibilidad del uso de la leptina como agente terapéutico, así como describir de manera más detallada el mecanismo de plegamiento/deplegamiento y con ello poder determinar si estados parcialmente plegados podrían estar asociados a diferentes patologías.

Capítulo 7
Bibliografía

7. Bibliografía

1. Ahima, R S, and J S Flier, 2000. "Leptin.," *Annual review of physiology*, 62, 413–37 <doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.413
2. Ahima, Rexford S, and Suzette Y Osei, 2004. "Leptin Signaling." *Physiology & behavior*, 81, 223–41
3. Aliseda Casado Francisco Javier. 2011 Diseño de un Simulador de DinámicaMolecular basado en CORBA, Escuela Politécnica Superior de la UniversidadCarlos III de Madrid
4. Anfinsen C.B. 1973 Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181,223 230
5. Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Gecici O, Ustundag B. 2002. Serum cholesterol and leptin levels in patients with borderline personality disorder. *Neuropsychobiol* 45: 167-171.
6. Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. 2003. Serum leptin and cholesterol levels in schizophrenic patients with and without suicide attempts. *Acta Psychiatr Scand* 108: 208-214.
7. Auwerx J, Staels B. Leptin. *The Lancet* 1998; 351: 737-42
8. Azuma T, Suto H, ItoY. 2001. Gastric leptin and *Helicobacter pylori* infection. *Gut*; 49: 324-329.
9. Baicy, Kate, Edythe D London, John Monterosso, Ma-Li Wong, Tuncay Delibasi, Anil Sharma, and others, 2007. "Leptin Replacement Alters Brain Response to Food Cues in Genetically Leptin-Deficient Adults.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104
10. Bakker D., 2000. A Surprising Simplicity to Protein Folding. *Nature* 405:38-41
11. Banks, W A, C R DiPalma, and C L Farrell, 1999. "Impaired Transport of Leptin Across the Blood-Brain Barrier in Obesity," *Peptides*, 20, 1341–5.
12. Barnard Katharine, Thomas S., Royle P., Noye Kathryn., Waugh Norman. 2010. Fear of hypoglycaemia in parents of young children with type 1 diabetes: a systematic review. *Pediatrics*, 2431-10-50.
13. Bates, Sarah H, and Martin G Myers, 2003. "The Role of Leptin Receptor Signaling in Feeding and Neuroendocrine Function," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14, 447–452
14. Bell Christopher G., Andrew J.Walley and Philippe Froguel 2005. The Genetics of human obesity. *Nature Reviews* 6: 221-234.
15. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular Forces*. Pullman, B. ed. D. Reidel Publishing Company Dordrecht 1981 331–342
16. Best RB. 2012. Atomistic molecular simulations of protein

- folding. *Curr Opin Struct Biol*. 2012 Feb;22(1):52-61
17. Botella Carretero JJ, MD. Lledín Barbancho, M. A. Valero González, C Varela Dacosta. 2001 Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *AN. MED. INTERNA (Madrid)* 18: 152-160.
 18. Campfield, L. A, Françoise J. Smith, Yves Guisez, Rene Devos, Paul Burn, 1995. "Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks.," *Science*, 269 546-548.
 19. Caro, J F, J W Kolaczynski, M R Nyce, J P Ohannesian, I Opentanova, W H Goldman, 1996. "Decreased Cerebrospinal-Fluid/serum Leptin Ratio in Obesity: a Possible Mechanism for Leptin Resistance.," *Lancet*, 348, 159-61.
 20. Chang S, Hursting SD, Contois JH, *et al* 2001. Leptin and prostate cancer. *Prostate* 46: 62-67
 21. Chekhranova MK, Karpova SK, Iatsyshina SB, Pankov IuA, 2008. [A new mutation c.422C>G (p.S141C) in homo- and heterozygous forms of the human leptin gene]. *Bioorg Khim.*;34(6):854-6.
 22. Chen-Jee, Pei-Jane Tsai, Chih-Ya Cheng, Chuan-Kai Chou, Huei-Fen Jheng, You-Chung Chuang, Lin YT, Hsu CW, Cheng IH, Chen SY, Tsai SJ, Liou YJ, Tsai YS.2010. "ENU Mutagenesis Identifies Mice with Morbid Obesity and Severe Hyperinsulinemia Caused by a Novel Mutation in Leptin.," *PloS one*,5(12): e15333
 23. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR., 1996. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2: 585-589
 24. Coatmellec-Taglioni G, Ribiere C. 2003. Factors that influence the risk of hypertension in obese individuals. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 305-308
 25. Considine V. Robert. 2001 Regulation of Leptin Production. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2: 357-363.
 26. Dardeno, Tina A, Sharon H Chou, Hyun-Seuk Moon, John P Chamberland, Christina G Fiorenza, and Christos S Mantzoros, 2010. "Leptin in Human Physiology and Therapeutics," *Frontiers in neuroendocrinology*, 377-93
 27. Del Barrio Simón E, A.S. 2002 Leptina y Obesidad. *Anales Sis San Navarra*. 25 (Supl. 1): 53-64.
 28. Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y., 2002. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 622-628.
 29. Dill KA. 1991 Denaturated states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 795-825.

30. Dobson C., 2003. Protein Folding and Disease: a view from the first Horizon Symposium. *Nature Reviews/drug discovery* vol 2:154-160
31. Dosztányi Z., Csizmok V., Tompa P., Simon I. 2005. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 15; 21(16):3433-4. PMID: 15955779
32. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395: 535-547.
33. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG 1995 A smooth particle mesh ewald potential. *J Chem Phys* 103:8577-8592.
34. Ferguson N, Andrew P. Capaldi, Richard James, Colin Kleanthous and Sheena E. Radford. 1999 Rapid Folding with and without Populated Intermediates in the Homologous Four-helix Proteins Im7 and Im9. *J. Mol. Biol.*286, 1597-1608
35. Fischer-Posovszky, Pamela, Julia von Schnurbein, Barbara Moepps, Georgia Lahr, Gudrun Strauss, Thomas F Barth, and others 2010, "A New Missense Mutation in the Leptin Gene Causes Mild Obesity and Hypogonadism Without Affecting T Cell Responsiveness.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95, 2836-
36. Farooqi IS, Matarase Giuseppe, Graham M. Lord, Julia M. Keogh Lawrence Elizabeth, Chizo Agwu, Sanna Veronica, et al. 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Inves*; 8: 1093-103
37. Fröhbeck Gema 2006. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 393, 7-20
38. Gómez-Puyou A. 2003. La Complejidad de las Proteínas: Relación entre Estabilidad, Flexibilidad y Catálisis. *Mensaje Bioquímico*. 27:85-96
39. Greenfield N., 2006. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nature Protocols*, 1(6):2876-2890
40. Haglund E, Sułkowska JI, He Z, Feng GS, Jennings PA, Onuchic JN. 2012. The unique cysteine knot regulates the pleiotropic hormone leptin. *PLoS One*. 2012;7(9)
41. Haglund E, Sulowska JI, Noel JK, Lammert H, Onuchic JN, Jennings PA. 2014, Pierced Lasso Bundles are a new class of knot-like motifs. *PLoS Comput Biol*. 19;10(6)
42. Halaas J, Gajiwala SK, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM.. 1995

- Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*; 269: 543-546.
43. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
 44. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. 2001 Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroentero* 121: 79-90.
 45. Haynes, William G, 2005. "Role of Leptin in Obesity-Related Hypertension.," *Experimental physiology*, 90, 683-8
 46. Hess B, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije. 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18:1463-1472
 47. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E 2008 GROMACS 4: algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput* 4:435-447.
 48. Heymsfield, Steven B., Andrew S. Greenberg, Ken Fujioka, Russell M. Dixon, Robert Kushner, Thomas Hunt, 1999. "Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults," *Jama*, 282-16
 49. Holm L., Sander C. 1992. Evaluation of protein models by atomic solvation preference. *J Mol Biol.* 5; 225(1):93-105
 50. Hölter, Katja, Anne-Kathrin Wermter, André Scherag, Wolfgang Siegfried, Hanspeter Goldschmidt, Johannes Hebebrand, 2007. "Analysis of Sequence Variations in the Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3 Gene in Extremely Obese Children and Adolescents.," *BMC medical genetics*, 8, 21
 51. Hoover WG 1985 Canonical dynamics: equilibriumphase-space distributions. *Phys Rev A* 31:1695-1697.
 52. Houseknecht Karen L, Clifton A. Baile, Matteri RL, Spurlock ME, 1998. The Biology of Leptin: A Review. *J Anim Sci.* 76:1405-1420.
 53. Humphrey W, Dalke A, Schulten K 1996 VMD-visual molecular dynamics. *J Mol Graphics* 14:33-38.
 54. Hur J. and Darve E., 2003. Unfolding of Proteins: Thermal and Mechanical Unfolding. *Annual Research Briefs*, 425-438
 55. <https://salilab.org/modeller/>
 56. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-rives, J. 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids, *7863(15)*, 11225-11236.
 57. Jorgensen WL, Tirado-Rives J 1998 The OPLS potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc* 110:1657-1666

58. Jung-Hyun Park, Hyun-Hee Lee, Shin-Young Na, Sung-Kyu Ju, Lee YJ, Lee MK, Kim KL, 2001. Recombinant Expression of Biologically Active Rat Leptin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 22:60-69.
59. Kabsch W, Sander C 1983 Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22: 2577–2637.
60. Karplus, M. 2003. Molecular dynamics of biological macromolecules: a brief history and perspective. *Biopolymers*, 68(3), 350–8. doi:10.1002/bip.10266
61. Karvonen, M K, U Pesonen, P Heinonen, M Laakso, A Rissanen, H Naukkarinen, 1998. “Identification of New Sequence Variants in the Leptin Gene.,” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83, 3239–42
62. Lakowicz JR., 1999 *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York
63. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM 1993 PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291
64. Laskowski R.A., Rullmann J.A., MacArthur M.W., Kaptein R., Thornton J.M. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*. 8(4):477-86
65. Lees JG., Miles A., Wien F and Wallace BA. 2006. A Reference Database for Circular Dichroism Spectroscopy Covering Fold a Secondary Structure Space. *Bioinformatics* 26:1955-1962.
66. Lesk A. 2000. *Introduction to Protein Science. Architecture, Function and Genomics*
67. Liao SC, Lee MB, Lee YJ, Huang TS. 2004. Hyperleptinemia in subjects with persistent partial posttraumatic stress disorder after a major earthquake. *Psychosom Med* 66: 23-28.
68. Lodish H., Berk A., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L., Darnell J. 2005. *Biología Celular y Molecular*.
69. Lüthy R., Bowie J.U., Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 5; 356(6364):83-5
70. Matarese G, Sanna V, Fontana S, Zappacosta S. 2002 Leptin as a novel therapeutic target for immune intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Aller*. 1: 13-22.
71. Mateu MG. and Neira J.L. 2003. Plegamiento de proteínas y enfermedades relacionadas. *Estructura de proteínas*. 201-231.
72. Maxwell KL. 2007 Protein folding: Defining a “standard” set of experimental conditions and preliminary kinetic data set of two-state proteins. *Protein Science*. 14 602-616.
73. Mazen, I, M El-Gammal, M Abdel-Hamid, and K Amr, 2009, “A

- Novel Homozygous Missense Mutation of the Leptin Gene (N103K) in an Obese Egyptian Patient.," *Molecular genetics and metabolism*, 305–8
74. Miles AJ, Lee Whitmore and Wallace BA. 2004. Spectral Magnitude effects on the analyses of secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*. 14: 368-374
 75. Miller GE, Freedland KE, Carney RM, Stetler CA, Banks WA. 2003. Pathways linking depression, adiposity and inflammatory markers in healthy young adults. *Brain Behav Immun* 17: 276-285.
 76. Möglich A, Krieger F, Kiefhaber T. 2005. Molecular basis for the effect of urea and guanidinium chloride on the dynamics of unfolded polypeptide chains. *J Mol Biol*. 7; 345(1):153-62.
 77. Molecular Operating Environment versión 2008.10.
 78. Montague CT1, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S.,1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*; 387: 903-8.
 79. Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA. 1998 Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273: 26194-26201
 80. N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali. 2006. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.
 81. Nose´ S, Klein ML 1983 Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol Phys* 50: 1055–1076.
 82. Nose´ S 1984 A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol Phys* 52:255–268.
 83. Olivarez QL and García CS., 2004. Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Revista Sociedad Química Mexico*: Cap. 48, 95-105.
 84. Ovies G, Verdeja OL, Santana F.1999 Leptina y Reproducción. *Rev. Cubana Endocrinol* 10(3): 191-197.
 85. Pace CN and M. Scholtz 1986, 1997 Measuring the conformational stability of a protein. *Protein Structure: A Practical Approach*. T.E. Creighton, editor. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
 86. Pace CN 1986 Deterination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves. *Methods in Enzimology*, Vol. 131 266-280
 87. Paracchini, Valentina, Paola Pedotti, and Emanuela Taioli, 2005. "Genetics of Leptin and Obesity: a HuGE Review.,"

- American journal of epidemiology, 162, 101–14
88. Parrinello M, Rahman A (1981) Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 52:7182–7190.
 89. Paz-Filho, G, M-L Wong, and J Licinio, “Ten Years of Leptin Replacement Therapy.,” *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12 (2011), e315–23
 90. Pelton JT and McLean Larry R. 2000. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure *Analytical Biochemistry* 277, 167–176
 91. Sagawa N, Mori T, Mzusaki H, Ogawa Y, Nakao K. 1997 Leptin Production by hydatidiform mole. 350 (9090) 1518-9.
 92. Sanchez Miguel DS. 2007 Caracterización del desplegamiento químico por urea de la Enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría.
 93. Sahu, Abhiram, 2011, “Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase-Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway.,” *Neuroendocrinology*, 93, 201–10
 94. Sandowski Y, Raver N, Eugene E. Gussakovsky, Suzan Shochat, Orly Dym, Oded Livnah, Menachem Rubinstein, Radha Krishna, and Arieh Gertler. 2002 Subcloning, Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Leptin-binding Domain, *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 46304-46309.
 95. San Miguel B, Calvo N. Alonso, R. Iglesias, M. A. Mazón. 2005 Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas*, 79-88.
 96. Satya P Kalra, 2001. “Circumventing Leptin Resistance for Weight Control.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 4279–81
 97. Satya P Kalra, 2008. “Central leptin insufficiency syndrome: an interactive etiology for obesity, metabolic and neural diseases and for designing new therapeutic interventions” *Peptides* 29, 127–138.
 98. Schmid FX. 1992 Spectral Methods of Characterizing protein conformation and conformational changes. Cap 2: 251-282.
 99. Schulz, Carla, Kerstin Paulus, and Hendrik Lehnert, 2004. “Central Nervous and Metabolic Effects of Intranasally Applied Leptin.,” *Endocrinology*, 145, 2696–701
 100. Shanley LJ, Irving AJ, Harvey J. 2001. Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic

- plasticity. *J Neurosci* 186: 1-6.
101. Solomons G, TW. 2000 Química Orgánica segunda edición, Limusa Wiley.pg. 122.
 102. Shortle D. and Ackerman M.S. 2001 Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. *Science* 293, 487-489.
 103. Somasundar P, Riggs D, Jackson B, Vona-Davis L, McFadden DW. 2003. Leptin stimulates esophageal adenocarcinoma growth by nonapoptotic mechanisms. *Am J Surg* 186: 575-578.
 104. Somasundar P, MsFadden DW, Hileman SM, Vona-Davis L. 2004 Leptin is a growth factor in cancer. *J Surg Res* 116: 337-349.
 105. Sowers JR. 2003. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med* 115: 37S-41S
 106. Stattin P, Söderberg S, Biessy C, Ardnor B, Hallmans G, Kaaks R, Olsson T. 2003 Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep* 10: 2015-2021.
 107. Stattin P1, Söderberg S, Hallmans G, Bylund A, Kaaks R, Stenman UH, Bergh A, Olsson T., 2003. Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case-referent study. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1341-1345.
 108. Suhre K., Sanejouand Y.H. 2004. ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res.* 1; 32
 109. Tessitore L, Vizio B, Pesola D, Cecchini F, Mussa A, Argiles JM, Benedetto C. 2004 Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *Int J Oncol* 24: 1529-1535
 110. Varnerin JP1, Smith T, Rosenblum CI, Vongs A, Murphy BA, Nunes C, Mellin TN, King JJ, Burgess BW, Junker B, Chou M, Hey P, Frazier E, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Tota MR, 1998. Production of Leptin in *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. *Protein Expression and Purification* 14: 335-342.
 111. Voet JD, Voet JG., Pratt WC., 2005 Fundamentals of Biochemistry :Life at the Molecular Level, 2nd Edition. Cap. 6
 112. Wang, M Y, Y Lee, and R H Unger, 1999 “Novel Form of Lipolysis Induced by Leptin,” *The Journal of biological chemistry*, 274, 17541-4.
 113. Webb B, Sali A. 2014. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*; 1137:1-15
 114. Yuan SS, Chung YF, Chen HW, Tsai KB, Chang HL, Huang CH, Su JH., 2004. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in bladder cancer. *Urology*; 63: 408-413.
 115. Zamorano PL, De Sevilla L, Mahesh VB, Brann DW.1997

- Production and refolding of recombinant leptin. *Biotechniques*; 23(5):800-2, 804.
- 116.** Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*; 372: 425-432.
- 117.** Zhang, Yi, and Philip J Scarpance, 2006. "The Role of Leptin in Leptin Resistance and Obesity.," *Physiology & behavior*, 88, 249-56
- 118.** Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. 1997, Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 387(6629):206-9
- 119.** Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 23 9:40.

Apéndice

Preparación de reactivos

∞ **Acrilamida AB-3**

48 g de acrilamida
1.5 g de bisacrilamida
Disolver en 50 ml de agua desionizada y aforar a 100 ml

∞ **Azul de Coomassie G-250 blue silver**

0.3 g de Coomassie G-250 y disolver en 50 ml de metanol, agregar 100 ml de agua desionizada y 25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y mezclar.
Adicionar 17.46 ml de H_3PO_4 y aforar a 200 ml
Para usarse mezclar 40 ml de la solución anterior con 10 ml de agua desionizada.

∞ **Buffer de corrida para SDS-page 10X**

30.3 g de Tris base
144 g de Glicina
3.72 g EDTA
Disolver en 800 ml de agua desionizada y agregar 10 g de SDS aforar a 1000 ml

∞ **Buffer de muestra 6X (6 % β -mercaptoetanol + SDS)**

Mezclar 7 ml de tris 4X Cl/SDS, pH 6.8
3 ml de glicerol
1 g de SDS
0.6 ml de β -mercapto
1.2 mg de bromofenol

∞ **Buffer de Fosfatos 10 X pH 7.6**

34 g KH_2PO_4 25 mM
43.5 g K_2HPO_4 25 mM
Vol. 1000 ml

∞ **Buffer de lavado 1 (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA pH 8.0)**

3g Tris base 50 mM
2.92 g NaCl 100 mM
186 mg EDTA 1 mM
500 ml H_2O

∞ **Buffers para columna de intercambio iónico**

Buffer Fosfatos 1X pH 8.0

Buffer Fosfatos 1X+1M de NaCl pH 8.0

Volumen 500 ml

Las fracciones obtenidas (picos) dializarlos con buffer de fosfatos 1X pH 8.0 y correr SDS-PAGE.

∞ **Buffer de lavado 2 (8 M de Urea disuelta en Tris HCl 50 mM pH 7.5)**

Para preparar el Tris HCl

1.2 g Tris base 50 mM

200 ml H₂O

Disolver 96 g urea en 200 ml de Tris HCl pH 7.5

∞ **Buffer de lavado 3 (1% v/v Tritón X-100)**

49.5 ml de buffer Tris-HCl pH 7.5

0.5 ml de Triton X-100

∞ **Buffer de lisis s/lisozima (50mM de NaH₂PO₄, NaCl, 10 mM imidazol)**

0.69 g NaH₂PO₄

1.754 g de NaCl

0.068 g Imidazol

Vol. 100 ml ajustar pH 8.0 con NaOH

∞ **Buffer de PBS 10 X pH 7.4**

6.08 g Na₂HPO₄ 4.3 mM

1.9 g KH₂PO₄ 1.4 mM

80 g NaCl 137 mM

2.01 g KCl 2.7 mM

Vol. 1000 ml

∞ **Solución de imidazol 2 M**

68.1 g Imidazol

500 ml de H₂O

Vol. 500 ml

∞ **Solución de NaCl 2 M**

58.4 g de NaCl

500 ml de H₂O

Vol. 500 ml

∞ **Persulfato de amonio (APS) 10 %**

1 g de persulfato de amonio, disolver en 8 ml de agua desionizada
Aforar a 10 ml
Almacenar en congelación

∞ **Tris-HCl 3M con 0.3 % de SDS pH 8.45**

36.343 g de tris base, disolver en 60 ml de agua desionizada ajustar pH
con HCL.
0.3 g de SDS
Aforara a 100 ml

∞ **Tris-4X Cl/SDS (0.5 M Tris, 0.4% SDS) pH 6.8**

6.05 g de tris base, disolver en 80 ml de agua desionizada. Ajustar pH
con HCL.
Aforar a 100 ml
Agregar 0.4 g de SDS

∞ **Gel de poliacrilamida al 16 % (Gel de 1 mm)**

Reactivo	Separador 16 %	Concentrador 4 %
Acrilamida AB-3	1.67 ml	0.125 ml
Tris 3M 0.3 % SDS pH 8.45	1.67 ml	0.75 ml
Agua desionizada	1.67 ml	0.625 ml
Persulfato de amonio 10 %	16.5 µl	8 µl
Temed	9 µl	7 µl

Extracción de DNA plasmídico

1. Incubar 2 precultivos de 5 ml a 37° C durante toda la noche
2. Centrifugar los precultivos a 4000 rpm por 25 minutos a 25° C. eliminar el sobrenadante y dejar escurrir el exceso.
3. Agregar a cada tubo 300 µl de buffer de resuspensión y vortexear por 10 a 15 segundos hasta homogenizar completamente.
4. Agregar 300 µl de buffer de lisis y homogenizar por inversión 5 veces
5. Transferir la mezcla a un tubo de 1.5 ml y agregar 400 µl de solución de neutralización homogenizar por inversión.
6. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4° C
7. Colectar el sobrenadante y pasarlo por la columna.
8. Lavar la columna 2 veces con 750 µl de buffer de lavado y centrifugar 1 min a 4° C a 13,000 rpm por lavada, eliminar el sobrenadante (Flow trough) entre cada lavado.
9. Centrifugar nuevamente 1 min a 13,000 rpm a 4° C y pasar las columnas a tubos de 1.5 ml.
10. Eluir las columnas con 25 µl agua libre de nucleasas, dejar reposar 1 min y centrifugar a 13,000 rpm 1 min a 4° C.
11. Eluir la columna nuevamente con 25 µl de H₂O a 40 °C y dejar reposar 2 min centrifugar a 13,000 rpm 4° C por 2 min.

Sobreexpresión

- a. Se pusieron 3 precultivos en medio LB (5ml)+ 5µl Amp de cada una de las mutantes se incubo a 37° C a 200 rpm durante 8 a 9 hrs.
- b. Posteriormente el precultivo (5 ml) se pasó a un matraz de 50 ml de medio 2 Xyt + 50 µl de Amp y se dejó incubando a 37° C a 200 rpm durante toda la noche
- c. Se prepararon 3 matraces de la siguiente manera:
 - 1l Medio 2xYT
 - 1 ml de Amp concentración final 100 mg/µl
 - 50 ml de precultivo (matraz de 50 ml de medio 2Xyt que se puso el día anterior)
- d. Se incubo a 37° C y cuando alcanzo la DO de 0.6 se agregó 1ml de IPTG 1 M Concentracion final de 1mM
- e. Se incubaron los 3 matraces a 25° C durante 5 horas
- f. Posteriormente se pasó el medio a los frascos y se centrifugo a 13,000 rpm en ultracentrífuga, y se separó Pastilla y sobrenadante.
- g. La pastilla se obtiene a partir de 500ml se pasa a tubos falcon y se congela en hielo seco y se conservar a -80°C.
- h. Posteriormente realizar ensayos de purificación.

Purificación por cromatografía de afinidad a níquel columna pre-empacada

Resina Ni-NTA Agarose 20% etanol QIAGEN

1. Pasar por la columna H₂O desionizada y filtrada
2. Para eliminar el etanol 50 ml

Preparar 2 buffer:

a. BUFFER DE LAVADO Y DE UNIÓN 500 ml

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

Glutationes (2mM de glutatión Redudcido-0.2mM de glutatión oxidado)

Ajustar pH a 8.0 con NAOH

b. BUFFER DE ELUCIÓN 500 ml

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM imidazol

Glutationes (2mM de glutatión Redudcido-0.2mM de glutatión oxidado)

Ajustar pH a 8.0 con NAOH

Para esto preparar 2 Stock:

2M de imidazol 500 ml

2M NaCl 500 ml

PARA LAVAR LA COLUMNA

	Buffer de Unión 20 mM de imidazol + complementos (500ml)	Buffer de elución 250 mM de imidazol + complementos (500ml)
Buffer PBS 10 X (1:10)	50 ml	50 ml
Imidazol 2 M (1:100)	12.5 ml	62.5 ml
NaCl 2 M	75 ml	75 ml
Glutatión Reducido- Oxidado	0.307g- 0.06145g	0.307g- 0.06145g
Aforar con H ₂ O vol. final	500 ml	500 ml

- ⊙ Agregara los glutaciones
- ⊙ Ajustar pH 8.0 y finalmente filtrar

Corte del tracto de histidas con PPS

1. Se purifico la leptina humana W100E por columna de níquel y se colectaron los eluidos 10 ml.
2. Tomar espectro UV a 280 nm para calcular concentración de proteína para poder agregar la PPS. (tomar muestra antes de dializar 50 μ l)
3. Después de purificar, los eluidos de la proteína se dializaron en Buffer Fosfatos 10 X pH 8.0 para corte PPS.
4. En la misma bolsa donde se está dializando agregar la PPS (30 μ l de PPS dependiendo la concentración de la proteína) poner exceso e incubar a 4° C 16 hrs.
5. Pasadas las 16 horas de incubación tomar alícuota para correr SDS-PAGE y ver si ya se corto toda la proteína.
6. Si no se ha cortado toda la proteína agregar mas PPS (μ l) y tomar alícuota de 50 μ l cada 2 horas (a las 18 hrs, 20 hrs...). Hasta observar que la proteína se haya cortado totalmente.
7. Correr SDS-PAGE para observar el corte de la proteína.
8. Una vez cortada la proteína concentrar a 2 ml y pasar por columna de intercambio iónico.

----- Mensaje reenviado -----

From: Science Publications <no-reply@gmail.com>

To: <azamorano@ipn.mx>

Cc:

Date: Tue, 10 Jun 2014 05:57:24 +0000

Subject: Your Submission Needs Revision# 820-AJABS entitled as ANTI OBESITY EFFECTS OF HUMAN SOLUBLE LEPTIN IN MICE NOURISHED WITH A HIGH-FAT/HIGH FRUCTOSE DIET

June 10, 2014

Subject: Your Submission Needs Revision# 820-AJABS entitled as ANTI OBESITY EFFECTS OF HUMAN SOLUBLE LEPTIN IN MICE NOURISHED WITH A HIGH-FAT/HIGH FRUCTOSE DIET

Dear Absalom Zamorano,
May God bless you with good health.

Please find enclosed herewith your above mentioned article for checking. Kindly read the comments in manuscript carefully and inform us if you would like to drop any note. You are also requested to make necessary changes in this final version under intimation to us. You have no need to resend your un-composed manuscript again. According to our record printing cost is still pending to your side. It is therefore, requested to please send printing cost with the checked file. We will send you an invoice based on the number of pages in your article, to your profile.

Regards

Shakeel
Editorial Office
Science Publications
<http://scipub.org>

You can download the attached file at http://thescipub.com/FILES/ARTICLES/820-AJABS/820-AJABS_comm_file.doc

Please visit <http://thescipub.com/admin/message.php?query=29818> to reply to this message.

ANTI-OBESITY EFFECTS OF HUMAN SOLUBLE LEPTIN IN MICE NOURISHED WITH A HIGH-FAT/HIGH FRUCTOSE DIET

¹Chimal-Vega, B., ²N. Paniagua-Castro, ²J.C. Perez-Rebollar,
¹J.P. Carrillo-Vazquez, ¹A. Zamorano-Carrillo and ¹C.G. Benitez-Cardoza

¹Laboratory of Investigation Biochemistry and Computational Biophysics,
Department of Molecular Biomedicine and Doctoral Program of Biotechnology,
ENMH-IPN, Mexico City, Mexico

²Department of Physiology ENCB-IPN, Mexico City, Mexico

Received 2014-05-12; Revised 2014-06-24; Accepted 2014-07-08

ABSTRACT

Leptin is a hormone that regulates energy balance. Since its discovery two decades ago, several efforts have been made to fully understand its role in metabolic regulation of feeding behavior, reproduction, glucose homeostasis, immune function, bone formation, lipid metabolism, among others. Its use as a therapeutic option in obese patients is still limited due to the syndrome known as Leptin resistance. In this study, we determined that the treatment of a soluble form of human Leptin (W100E) reduced food intake, body weight and triglycerides levels, but increased HDL-cholesterol levels on obese mice subjected to high-fat/high-fructose diet. In contrast, treatment with soluble human Leptin increased food intake but did not increase body weight and total-cholesterol in mice with normal diet. When stopping the treatment with human W100E-Leptin, it was detected a significant increase in body weight in all groups of mice apart from the control, indicating a rebound effect. The results contribute to the understanding of how to increase Leptin sensitivity and in consequence to overcome Leptin resistance syndrome. This might be relevant in offering more evidence of the potential use of the Leptin in the treatment against obesity and overweight conditions.

Keywords: Leptin, W100E, Triglycerides Levels, HDL-Cholesterol High-Fat/High-Fructose Diet

1. INTRODUCTION

Overweight and obesity are major health problems spread worldwide. It is estimated that in some countries the prevalence of obesity is higher than 30% of their populations, some examples are Mexico (32.8%), USA (31.8%), Siria (31.6%), Venezuela and Libia (30.8%), (<http://www.who.int/topics/obesity/en/>; <http://www.fao.org/publications> ISSN 0081-4539; Barrera-Cruz *et al.*, 2013). In addition, overweight accounts for similar percentages in these countries (<http://www.who.int/topics/obesity/en/>). Both conditions

are associated to the development of chronic diseases such as hyperlipidemias, type II diabetes and cardiovascular complications (Sowers, 2003; Sánchez, 2005; Carrillo-Vazquez *et al.*, 2013) implying high economic costs to health systems of mentioned nations. It is well recognized that obesity and overweight are complex health problems than a mere balance between food intake and energy expenditure (Shapiro *et al.*, 2008; Ahima and Flier, 2000) and that they cannot be solved by solely trusting in the willpower of individuals. Several hormones have been described to regulate appetite and metabolism involving Leptin, ghrelin,

Corresponding Author: C.G. Benitez-Cardoza, Laboratory of Investigation Biochemistry and Computational Biophysics,
Department of Molecular Biomedicine and Doctoral Program of Biotechnology,
ENMH-IPN, Mexico City, Mexico

insulin, Peptide YY3-36 (PYY3-36), Chole Cysto Kinin (CCK) among others (Bell *et al.*, 2005). Leptin is one of the most influential adipose derived hormones that participate in energy balance (Houseknecht *et al.*, 1998). The Leptin gene encodes for a 167 amino acid protein with 21 amino acid signal sequence (Varnerin *et al.*, 1998). Leptin is mainly produced in white adipose tissue, followed by brown adipose tissue, placenta, ovaries, skeletal muscle, stomach, mammary epithelial cells, bone marrow, pituitary and liver (Prins, 2002; Masuzaki *et al.*, 1997; Paz-Filho *et al.*, 2010). The effect of Leptin in energy balance is evidenced by the extreme obese phenotype caused by Leptin scarcity and by the dramatic decrease in food intake and body weight that occurs upon treatment of this condition with Leptin administration (Morrison, 2008). Even though, obese individuals usually show increased levels of Leptin in serum and respond unsuccessfully to Leptin treatment (Bence *et al.*, 2006). In addition, some studies have shown that exogenous Leptin administration instead of providing a cure, it might contribute to obesity (Aijälä *et al.*, 2013). It has been observed that Leptin worsens obesity of high-fat diet-induced animals, whereas rats on a low-fat diet exhibited the expected Leptin-induced reduction in body weight (Flores *et al.*, 2006). Also, it seems that increasing energy expenditure by exercise might have a synergetic effect to improve the response to exogenous Leptin administration (Lo *et al.*, 2005). Some authors have proposed that the reduced clinical efficacy of Leptin results from its short circulating half-life, low potency and poor solubility (Lo *et al.*, 2005). Also, poor solubility hindered to readily crystallize wild type human Leptin. However, this hormone could be structurally described by substituting Trp for Glu at position 100 (Zhang *et al.*, 1997). Leptin W100E is the first soluble Leptin described and it has been mentioned as a hormone with similar biological activity but higher propensity to crystallize (Zhang *et al.*, 1997; Haglund *et al.*, 2012). Nevertheless, to our knowledge, the effect of W100E Leptin treatment (sequence shown in **Fig. 1**), on the food intake, body weight and lipid profile on mice with normal and hypercaloric diets has not been explicitly presented. Indeed, most reports showing the use of Leptin treatment against obesity utilize recombinant methionyl human Leptin depicted as metre Leptin (Vatier *et al.*, 2012; Seuk Moon *et al.*, 2011; US 2013/0203661 A1). As one single amino acid mutation can alter physicochemical properties, conformation, as well as biological activity, we were interested in to describe in a comprehensible manner the antiobesity effects of the construct W100E

Leptin on mice feed with normal or high fat/high fructose diets. These results are helpful to better understand how to overcome short circulating half-life, low potency and poor solubility of human Leptin. In consequence, they bring us closer to spreading the use of this hormone as a therapeutic option against obesity and overweight.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Human W100E-Leptin

The gene encoding for human Leptin was cloned in a modified version of pET19b vector (Novagen). This vector encodes for a 10-His-tag protein and a PreScission Protease (GE Health Care Life Sciences) cleavage site. The W100E mutant construct was obtained by Quik Change (Stratagene) site-directed mutagenesis kit using the oligonucleotides Fw 5' AGC TGC CAC TTG CCG GAG GCC TCT GGC CTG GAG 3' and Rv 5' CTC CAG GCC AGA GGC CTC CGG CAA GTG GCA GCT 3' and following the manufacturer's protocol. *E. coli* cells strain BL21 (DE3) pLysS (Novagen) harboring the pET19b-human-W100E-Leptin- plasmid were grown at 37°C in 2X YT medium complemented with ampicillin (100 µg mL⁻¹) to an OD600 of 0.6 followed by induction with 1 mM IPTG and further incubation for 16 h at 37°C. After harvesting by centrifugation, the cells were disrupted by sonication. Crude inclusion body pellets were obtained and washed twice with 50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100 at 4°C. The remaining insoluble inclusion body pellet was dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, complemented with 8 M urea and centrifuged to clarify. Afterwards, the sample was extensively dialyzed against a solution with composition 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (solution A) mixture of oxidized (0.2 mM) and reduced (2 mM) glutathione was added to the protein preparation. Leptin protein was purified by nickel-affinity chromatography (Ni-NTA Agarose QIAGEN). After extensively washing with 50 mM imidazole, bound protein was eluted with a solution A complemented with 250 mM imidazole and 2 M NaCl. For the removal of the 10-His tag, the purified proteins were dialyzed against buffer solution containing 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄ pH 8.0 (solution B) and treated with Pre Scission Protease (GE Healthcare Life Science), following the manufacturer's protocol. His tags and non-cleaved Leptin were eliminated by high resolution ion exchange chromatography (Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare Life

Science) eluting with solution B complemented with 2M NaCl to form a saline gradient. After cleavage, the resulting sequence contains a Gly and a Pro at the N terminus as describing in **Fig. 1**.

Homogeneity of Leptin-W100E was confirmed by SDS-PAGE. The purified protein was extensively dialyzed against with solution B. All reactants were molecular biology grade and the water used was distilled and deionized.

2.2. High-Fat/High Fructose Diet

The high-fat food was made by supplementing 35% lard to a ground standard diet. Fructose (Cedrosa SA Mexico) solution (60%) was given daily by gavage. Food consumption was measured every day and body weight was measured once each two days. The composition of the diets is presented in **Table 1**.

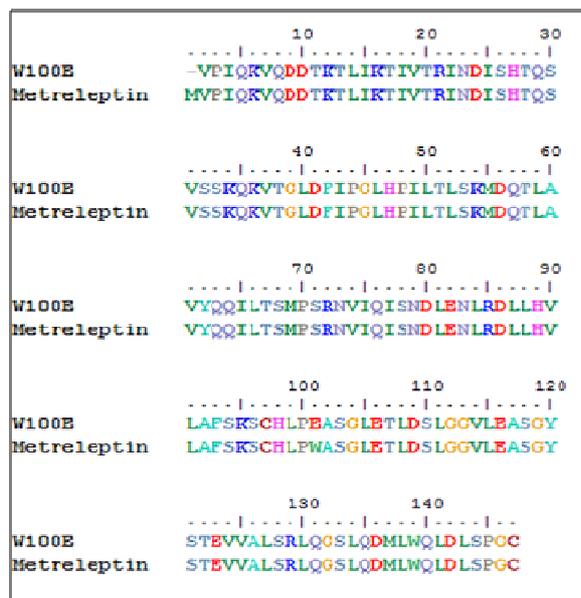


Fig. 1. Sequence alignment of Human Leptins. W100E corresponds to the construct described by X-ray crystallography (Lo *et al.*, 2005), MetreLeptin is the most widely used is Leptin treatments and the sequence of W100E Leptin mutant used in this study.

Table 1. Composition of the control and test diets

	Control (%)*	HF (%)**
Protein	28.05	18.23
Fat	12.14	7.89
Lard	0.00	35.00
Carbohydrate	59.81	38.88
Total	100.00	100.00
Calories (kcal)	467.50	314.50

Male ICR mice (Biorepository of the National School of Biological Sciences) weighing 25-30 g were housed in a room at a constant temperature of 22±1°C and a 12 h light/dark cycle (lights on at 9: 00 AM) and were given food and water *ad libitum*.

All experiments were approved by the Laboratory Animal Care Committee of the national school of Biological Sciences (National Polytechnic Institute) and were conducted in compliance with the Mexican Official standard (NOM-062-200-1999) technical specifications for the production, care and use of laboratory animals. Firstly, mice were distributed into four groups of 10 animals each and nourished with either standard or High-Fat/High Fructose diet (HFHF), for four weeks. Afterwards, groups 3 and 4 were dosed with human W100E-Leptin (daily subcutaneous injection of 30 µg per mouse, at eight o'clock) for ten days while nurture was continued in all mice. During the whole experiment food intake and body weight gain were recorded. At the end of treatment, we continued to record these variables daily for a further week.

2.3. Lipid Profile

After ten days of treatment, blood was collected by retro orbital puncture and serum was prepared by centrifuging the blood at 3000 rpm for 20 minutes. The levels of Total Cholesterol (TC), HDL Cholesterol (HDL-C) and Triglycerides (TGs) were determined by using the automatic Selectra analyzer (Model Vitalab 2), with commercial kits (RANDOX). After the whole treatment, animals were fasted for eight hours and then sacrificed. The retroperitoneal and periepididymal fat were weighed.

2.4. Statistical Analysis

Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Holm-Sidak post hoc tests, with significance set to p<0.05. Food consumption was analyzed using two-way ANOVA repeated measures tests followed by Tukey's post hoc tests, with significance set to p<0.05. All analyses were performed using Sigma Stat (10.0).

3. RESULTS

3.1. Food Intake

In **Fig. 2**, we show food intake during the 10 days of treatment with human Leptin W100E. The mice that received standard diet and treated with Leptin (W100E) significantly increased their food intake (above 5 grams per day), compared to the other groups. Meanwhile, those given a diet high in fat and Fructose and Hormone treatment (HFHF + W100E) decreased their food consumption (below 4.5 g per day), but their calorie intake was higher.

3.2. Body Weight

In **Fig. 3** the body weight of mice on a high-calorie diet during treatment with W100E-Leptin is shown and compared with the other groups. Although, no significant differences were found, it is still observed that mice subjected to a High Fat/High Fructose diet plus human W100E-Leptin (HFHF + W100E) gained less weight than mice of the other treatments.

3.3. Retroperitoneal and Periepididymal Fat

The effect of human W100E-Leptin on retroperitoneal and epididymal fat of mice subjected to standard and high-calorie diets are shown in **Fig. 4**. It is observed that the mice receiving the High-calorie diet (HFHF) had higher fat content (c.a., 1.1 g) than the control group (approximately 0.55 g).

On the contrary, the mice receiving the W100E-Leptin and High Fat/High Fructose diet (HFHF + W100E) presented less fat (about 0.85 g) but did not differ significantly from group with hyper caloric diet or from the control group.

3.4. Lipid Profile

Figure 5 shows the lipid profile of mice subjected to normal or high-calorie diets with and without human W100E-Leptin treatment and no significant differences in levels of total cholesterol between groups of mice were observed (**Fig. 5a**). Regarding the triglyceride levels (**Fig. 5b**), there was a significant increase on mice fed with HFHF diet. In turn, those mice with the standard diet and

human W100E-Leptin treatment showed a slight increase but not significantly different from the control, nor from the HFHF diet group. Interestingly, mice receiving the high-calorie diet and human W100E-Leptin showed a significant decrease in triglyceride's levels compared with the group HFHF. **Fig. 5c** shows HDL cholesterol levels for the four groups. The opposite effect to that described for triglycerides levels was detected, since the mice that received the HFHF diet complemented with human W100E-Leptin showed a significant increase in this variable. Variations of LDL-cholesterol between groups were not significant, even though the highest levels for the HFHF + W100E group were observed, whereas the lowest value obtained for mice with the standard diet and W100E-Leptin treatment.

3.5. Rebound Effect

In **Fig. 6**, the results of food consumption during the following week after W100E-Leptin treatment was completed are shown. It is observed that mice receiving human W100E-Leptin with normal diet show alterations in food intake since oscillations in this variable are observed after stopping treatment. The mice who received the HFHF diet and human W100E-Leptin decreased their food intake the following two days after treatment, but in subsequent days they increased their consumption to normal levels.

In **Fig. 7**, the increase in body weight of mice one week after treatment completion with Leptin W100E is shown.

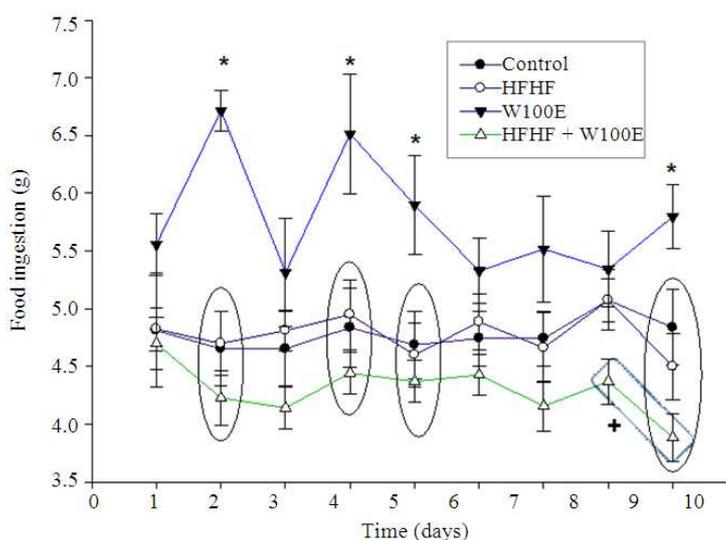


Fig. 2. Food intake of mice subjected to normal or high-calorie diet (HFHF) with and without treatment with Leptin W100E. Significant difference * $p < 0.05$ Vs. Control and HFHF, HFHF + W100E. + $p < 0.05$ Vs. Control. Two-factor ANOVA, post hoc Holm Sidakt

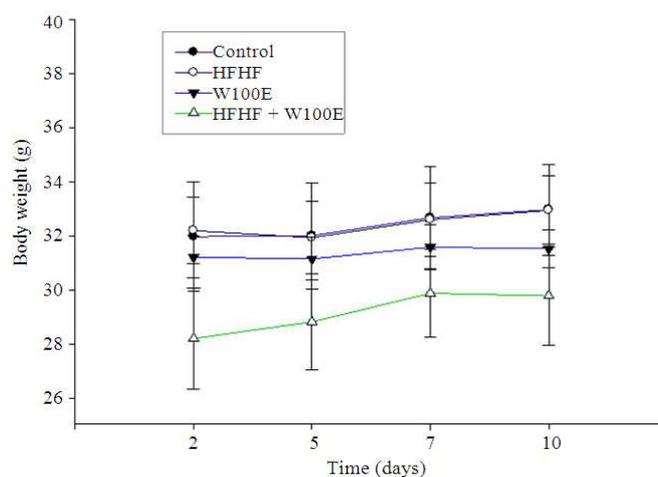


Fig. 3. Body weight of mice on a High-calorie diet (HFHF) during treatment with and without Leptin W100E. Two-factor ANOVA

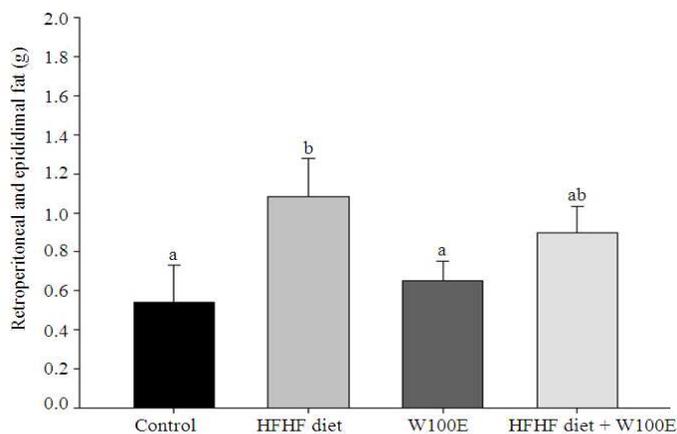
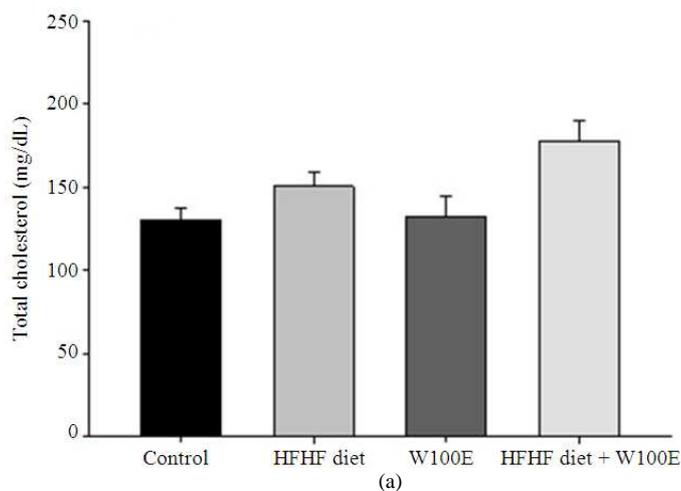


Fig. 4. Retroperitoneal and epididymal fat of mice on a high-calorie diet with and without Leptin treatment W100E. Different letters define differences between groups ($p < 0.05$). One-way ANOVA, post hoc Holm Sidak test



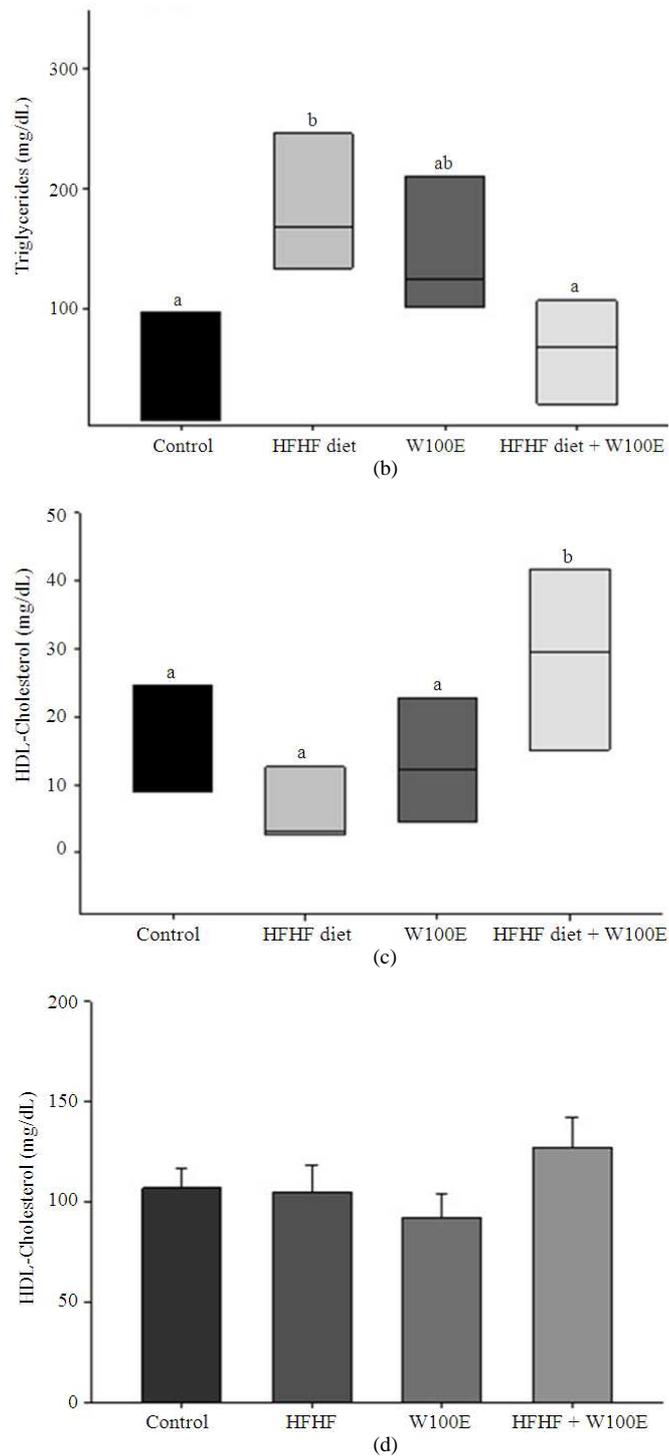


Fig. 5. Lipid profile of mice subjected to a high-calorie diet and after treatment with or without W100E Leptin. (A) Total-Cholesterol, (B) Triglycerides, (C) HDL-cholesterol and (D) LDL-cholesterol. Different letters define differences between groups ($p < 0.05$). (A) One-way ANOVA, post hoc Holm Sidak test; (B), (C) and (D) ANOVA on Ranks, Dunn's post hoc test

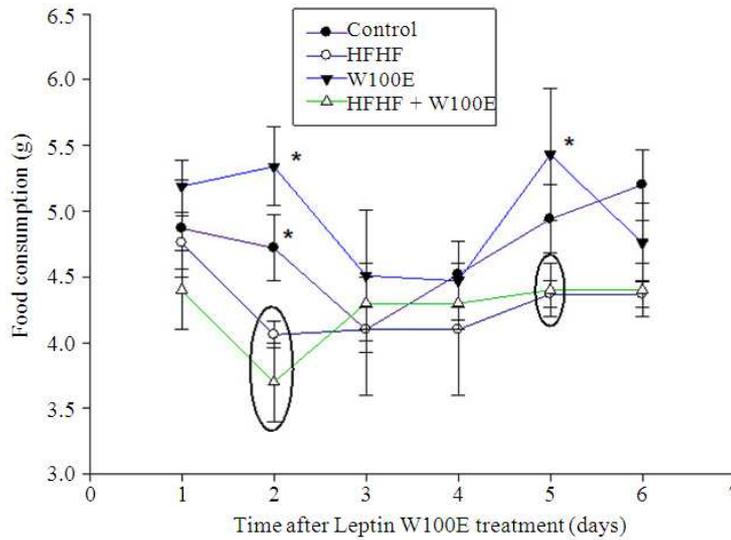


Fig. 6. Food intake one week after completion of Leptin-W100E treatment. * $p < 0.05$ Vs. HFHF and control group. Two-way ANOVA RM, post hoc Holm-Sidak test

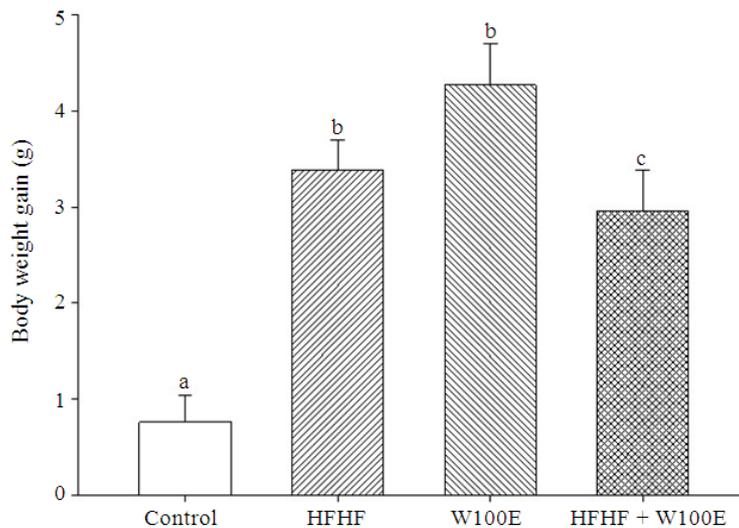


Fig. 7. Body weight gain one week after Leptin W100E treatment finished. Different letters define differences between groups ($p < 0.05$). One-way ANOVA, post hoc Holm-Sidak test

All groups significantly increased the body weight compared with the control, though a lower weight gain corresponded to HFHF + W100E group. Also, the gain in body weight of mice is shown one week after completing the treatment with human W100E-Leptin. Mice subjected to HFHF diet (without Leptin), standard diet with human W100E-Leptin and HFHF diet with human W100E-Leptin treatment significantly increased

their body weights compared with control, although the increase was lower in the latter group.

4. DISCUSSION

Obesity is a complex multi factorial chronic disease that develops from an imbalance between energy intake and energy expenditure. Abnormal or excessive

accumulation of energy as fat in adipose tissue is the result of a combination of physiological, psychological, metabolic, genetic, socioeconomic, cultural and emotional factors (Blancas-Flores *et al.*, 2009). It is well recognized that combating obesity is a difficult problem that cannot be solely solved by trusting in the will of obese and overweight individuals. Therefore, several efforts are in progress to propose plausible alternatives to help in obesity treatment. Among them Leptin, since its discovery (Zhang *et al.*, 1995), has been considered as a potential alternative treatment against obesity. Nevertheless, the original enthusiasm towards it was vanished, when it was observed that commonly obese and overweight individuals show augmented levels of circulating Leptin. During these two decades, we have learned about signaling pathways, Leptin resistance phenomenon, its relationship with other important hormones and how it might participate in other physiological processes, like bone formation, gonadal development, among many other functions.

Regarding the structure of Leptin, the only crystallographic coordinates available of this hormone peptide have been obtained by substituting a tryptophan at position 100 by a glutamic acid (Zhang *et al.*, 1997). This mutant was described to show similar biological activity, but with enhanced solubility and feasibility to crystallize. We made a thorough search on reports concerning the effect in food intake, body weight, lipidic profile and rebound effect of W100E treatment in mice submitted to standard or hypercaloric diets. However, we were not able to find any reports using precisely this construct in similar studies. Commonly Leptin treatments are carried out using either metreleptin or a variety of mutants or analog constructs with different composition to W100E Leptin. Considering that a single point mutation might be sufficient to modify the conformation, stability and functionality of any protein; we were motivated to make a detailed study of how the treatment with this mutant might be helpful in treating obesity and lipid parameters in a murine model.

We observed that W100E Leptin treatment indeed reduces food intake and body weight on obese mice.

In the same group the total cholesterol levels were incremented, as well as HDL and LDL cholesterol triglycerides. On the contrary, the food intake and total cholesterol, was increased in mice with normal diet, while LDL cholesterol was reduced in this group.

These data complement our knowledge about soluble Leptin usage as treatment against obesity and associated pathologies.

5. CONCLUSION

The effect of W100E-Leptin is different in mice receiving a standard diet from that receiving high-calorie diet. In animals with standard diet W100E-Leptin caused greater food consumption as well as total-cholesterol levels, but body weight remained unchanged. In animals with high calorie diet, W100E-Leptin treatment decreased food intake and body weight as well as triglycerides, while HDL-cholesterol levels were increased. When stopping W100E-Leptin treatment the food consumption pattern was affected, which causes an increase in body weight in all groups compared to the control group. The rebound occurred in animals with normal diet as well as high-calorie diet. In conclusion, these results show that the use of recombinant Leptin in murine models weight loss occurs accompanied by an improvement in lipid profiles. However, subsequent studies W100E administration in humans is required to determine their therapeutic potential for the treatment of obesity and its comorbidities.

6. ACKNOWLEDGMENT

This work received financial support by Medix; Project entitled "Generación de variantes de Leptina humana como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad y diabetes mellitus". We also thank grants SIP-IPN 0140317, 20140266 and 20140297. B. Chimal-Vega thanks scholarships from CONACyT (04042009) and Medix.

7. REFERENCES

- Ahima, R.S. and J.S. Flier 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.*, 62: 413-437. DOI: 10.1146/annurev.physiol.62.1.413
- Aijälä, E., M. Malo, O. Ukkola, R. Bloigu and Y.A. Kesäniemi *et al.*, 2013. Long-term fructose feeding changes the expression of Leptin receptors and autophagy genes in the adipose tissue and liver of male rats: A possible link to elevated triglycerides. *Genes Nutr. Nov.*, 8: 623-35. PMID: 3824831
- Barrera-Cruz, A., A. Rodríguez-González and M.A. Molina-Ayalab, 2013. Escenario actual de la obesidad en México. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 51: 292-299.

- Bell, C.G., A.J. Walley and P. Froguel, 2005. The genetics of human obesity. *Nat. Rev. Genet*, Mar, 6: 221-234. DOI: 10.1038/nrg1556
- Bence, K.K., M. Delibegovic, B. Xue, C.Z. Gorgun and B.B. Kahn *et al.*, 2006. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and Leptin action. *Nat. Med.* Aug. 12: 917-24. DOI: 10.1038/nm0210-237a
- Blancas-Flores, G., C. Almanza-Pérez, R.V. López-Roa, F.J. Alarcón-Aguilar and M. Cruz *et al.*, 2009. La obesidad como un proceso inflamatorio. 3-12.
- Carrillo-Vazquez, J.P., J. Lopez-Alcantar, B. Chimal-Vega, C.G. Benítez-Cardoza and L. Marchat *et al.*, 2013. G-2548A Leptin promoter and Q223R Leptin receptor polymorphisms in obese Mexican subjects. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 8: 34-43. DOI: 10.3844/ajabssp.2013.34.43
- Flores, M.B.S., M.F.A. Fernandes, E.R. Ropelle, M.C. Faria and J.B.C. Carnevali *et al.*, 2006. Exercise improves insulin and Leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes.*, 55: 2554-2561. DOI: 10.2337/db05-1622
- Haglund, E., J.I. Sulikowska, Z. He, G.S. Feng and J.N. Onuchic *et al.*, 2012. The unique cysteine knot regulates the pleiotropic hormone leptin. *PLoS One*, 7: 9-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0045654
- Houseknecht, K.L., C.A. Baile, R.L. Matteri and M.E. Spurlock, 1998. The biology of Leptin: A review. *J. Anim. Sci.*, 76:1405-1420. PMID: 9621947
- <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
- <http://www.fao.org/publications> ISSN 0081-4539
- Lo, K.M., J. Zhang Y. Sun, B. Morelli and S.D. Gillies *et al.*, 2005. Engineering a pharmacologically superior form of Leptin for the treatment of obesity. *Protein Eng. Design Select.*, 18: 1-10. DOI: 10.1093/protein/gzh102
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda and K. Nakao *et al.*, 1997. Nonadipose tissue production of Leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.*, 3: 1029-1033. DOI: 10.1038/nm0997-1029
- Morrison, C., 2008. Interaction between exercise and leptin in the treatment of obesity. *Diabetes*, 57: 534-5. DOI: 10.2337/db08-0007
- Paz-Filho, C. Mastrorandi, T. Delibasi, M.L. Wong and J. Licinio, 2010. Congenital Leptin deficiency: Diagnosis and effects of Leptin replacement therapy. *Arq. Bras Endocrinol Metab.*, 54: 690-697. DOI: 10.1590/S0004-27302010000800005
- Prins, J.B., 2002. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol Metab.*, 16: 639-651. DOI: 10.1053/beem.2002.0222
- Sánchez, J.C., 2005. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica*. 42: 26-38.
- Seuk Moon, H., G. Matarese, A.M. Brennan, J.P. Chamberland and C.S. Mantzoros *et al.*, 2011. Efficacy of metre leptin in obese patients with type 2 diabetes: Cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes*, 60: 1647-1656. DOI: 10.2337/db10-1791
- Shapiro, A., M. Matheny, Y. Zhang N. Tümer and P.J. Scarpace *et al.*, 2008. Synergy between Leptin therapy and a seemingly negligible amount of voluntary wheel running prevents progression of dietary obesity in Leptin-resistant rats. *Diabetes*, 57: 614-622. DOI: 10.2337/db07-0863
- Sowers, J.R., 2003. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Med.*, 115: 37-41. DOI: 10.1016/j.amjmed.2003.08.012
- US 2013/0203661 A1, [0049] Mature Human Leptin form 1 with N-terminal methionine (also known MetreLeptin, or A100). Aug. 8, 2013.
- Varnerin, J.P., T. Smith, C.I. Rosenblum A. Vongs and M.R. Tota *et al.*, 1998. Production of Leptin in *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Protein Exp. Purif.*, 14: 335-42. DOI: 10.1006/prep.1998.0978
- Vatier, C., J. F. Gautier and C. Vigouroux, 2012. Therapeutic use of recombinant methionyl human Leptin. *Biochimie*, 10: 2116-2125. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.03.013
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone and J.M. Friedman *et al.*, 1995. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 30: 479-479. PMID: 79842
- Zhang, F., M.B. Basinski, J.M. Beals, S.L. Briggs and R.W. Schevitz *et al.*, 1997. Crystal structure of the obese protein Leptin-E100. *Nature*, 8: 206-209. DOI: 10.1038/387206a0