

————— *Artículo original* —————

Inmuno-manipulación del apetito y metabolismo*

BRANT ALAN DE FANTI, EDUARDO MARTÍNEZ-ANSÓ, OSCAR
LAMAS LONGARELA, FERMIN MILAGRO YOLDI, Y J. ALFRE-
DO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

*Departamento de Fisiología y Nutrición
Universidad de Navarra, Pamplona*

RESUMEN

Las terapias actuales para la obesidad están todavía sujetas a algunas limitaciones, por lo que hay una necesidad de investigar nuevas estrategias para el tratamiento de la obesidad. Una idea novedosa es el uso de anticuerpos anti-idiotipo como sustitutos hormonales. Estos anticuerpos anti-idiotipo presentan una configuración química que imita a una región (epitopo) del antígeno inicial (es decir, se asemeja a la estructura de la hormona). Así, los anticuerpos anti-idiotipo pueden mimetizar la estructura de diversas hormonas y desencadenar las señales correspondientes cuando se unen a sus receptores.

Un anticuerpo policlonal contra la región de un anticuerpo monoclonal de la leptina y que, imitan al centro activo de la leptina fue obtenido tras inmunizar ratas Wistar. Para probar si el anti-idiotipo podría también reproducir las funciones de la leptina, se examinaron la ingesta, el peso corporal, y la temperatura rectal en las ratas Wistar en respuesta a la administración intracerebroventricular de dicho anti-idiotipo de la leptina. El anti-idiotipo de la leptina indujo una reducción significativa en la ingesta así como un aumento en la temperatura del cuerpo comparable a la de la leptina. El incremento diario en peso corporal también fue retardado por la administración del anti-idiotipo y la leptina respecto al control.

Estos estudios muestran que el anti-idiotipo de la leptina podía inhibir la ingesta y estimular la termogénesis, reproduciendo las acciones centrales y periféricas de la leptina.

Palabras clave: Balance energético.—Apetito.—Gasto energético.—Obesidad.—Inmunoterapia.— Anti-anticuerpos.—Anti-idiotipos.

* Premio Faes-Pharma 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia

SUMMARY

Appetite and energy expenditure metabolism immunomanipulation

Current anti-obesity strategies produce some benefits, but there is a need to investigate new obesity therapies. A novel possibility is to prepare anti-idiotypic antibodies as surrogate ligands/hormones. These anti-idiotypic antibodies carry an internal motif, which imitates an epitope in the antigen (i.e. hormone/ligand). Thus, anti-idiotypic antibodies to several ligands may be able to mimic them in transducing signals upon binding their receptors.

An anti-idiotypic polyclonal antibody against the region of a leptin monoclonal antibody that competitively binds leptin, mimicking the active site structure of leptin was developed. To assay whether this anti-idiotypic could also reproduce leptin functions, food intake, body weight, and colonic temperature in male Wistar rats in response to intracerebroventricular administration of the leptin anti-idiotypic were assessed. Our leptin anti-idiotypic induced a significant reduction in food intake coupled with an increase in body temperature comparable to that of leptin. The gain in body weight was also decreased by the acute administration of the anti-idiotypic and leptin vs. the PBS control.

Summing up, these studies revealed that the leptin anti-idiotypic was able to inhibit food intake and enhance heat production, mimicking leptin's central actions.

Key Words: Energy balance.—Energy expenditure.—Anti-obesity.—Immunotherapy.—Anti-idiotypic.—Antibodies.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es el resultado de un desequilibrio crónico entre el aporte energético y el gasto energético (1). Dado que las terapias farmacológicas actuales presentan ciertas limitaciones, nuevos estudios e investigaciones sobre el tratamiento de la obesidad están siendo desarrollados.

Una idea novedosa es el uso o la inducción de anticuerpos anti-idiotipo como sustitutos de las hormonas. Estos anticuerpos llevan una «imagen interna» de un epítipo del antígeno externo (es decir, la hormona) (2), de tal forma que los anticuerpos anti-idiotipo producidos que imitan hormonas pueden traducir las señales cuando se unen con sus receptores correspondientes (3). Diversos anticuerpos anti-idiotipo se han probado en inmunizaciones terapéuticas contra varias enfermedades autoinmunes y el cáncer (4) y también anti-

cuerpos anti-idiotipo de la insulina han logrado reproducir algunos de los efectos de la hormona tales como promover la captación de la glucosa en adipocitos (5).

Este estudio tenía como objetivo el desarrollo de un anticuerpo (anticuerpo anti-idiotipo) contra un anticuerpo que se une competitivamente a la leptina, y que potencialmente imita el sitio activo de la leptina (6, 7). La leptina es una hormona derivada de los adipocitos que se libera proporcionalmente a los niveles de grasa corporal (8), que actúa suprimiendo la ingesta y sirve como mediador de un eje endocrino del tejido adiposo-cerebro para la regulación del equilibrio energético (9). La administración de la leptina exógena a algunos modelos animales de obesidad disminuye la ingesta, aumenta el gasto energético, y provocan una reducción en el peso corporal (10, 11). La mayoría de los casos de obesidad humana se acompañan de niveles elevados de la leptina, que sugieren una resistencia periférica a la leptina (12). Sin embargo, hay evidencia de que la leptina exógena induce una pérdida del peso en algunos individuos obesos con las concentraciones de la leptina endógenas elevadas (13), mientras que en un porcentaje (5-25%) de seres humanos obesos se ha encontrado que presentan niveles bajo-normales de leptina (12, 14, 15). La administración de leptina puede también ayudar a los individuos que siguen un régimen o programa para perder peso en el cual los niveles de la leptina se reducen en el proceso (16). Por otra parte, puede también ser ventajoso para una pequeña población de individuos obesos con deficiencia de leptina (17), apoyando la investigación adicional en el papel potencial de la leptina en el tratamiento de la obesidad humana.

Para probar si nuestro anticuerpo anti-idiotipo con semejanza estructural al sitio activo de la leptina podría también imitar su función, examinamos la ingesta, el peso corporal, y la temperatura rectal en las ratas Wistar en respuesta a la administración intracerebroventricular (i.c.v.) del anti-idiotipo de la leptina.

MÉTODOS

Animales

El estudio se desarrolló en ratas Wistar macho ($n=10$; 250-325 g con un peso medio de 285 ± 8) de Harlan-Teklad (Barcelona, España) que fueron mantenidas individualmente en jaulas metabólicas con la temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) en ciclo luz-oscuridad 12:12-h (luces encendido en 08:00). Salvo que se especifique lo contrario, los animales siempre tuvieron acceso libre a pienso (Harlan-Teklad, Barcelona, España) y agua. Todos los procedimientos fueron realizados según las normas internacionales e institucionales del comité del cuidado de animales vigente en la Universidad de Navarra.

Procedimientos quirúrgicos

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina-HCl (75 mg/kg) más xilazina (10 mg/kg) y colocadas en un instrumento estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Una cánula guía de calibre 24 (316GC, Plastics One, Roanoke, VA) fue implantada en el cerebroventrículo lateral y asegurada al cráneo con tres tornillos de acero inoxidable (Small Parts inc., Miami Lakes, FL) y cemento craneoplástico (Dentsply, Detrey). Las coordenadas estereotáxicas usadas fueron: AP, -0.8 mm; ML, 1.2 mm con respecto al Bregma; y DV, -3.5 mm de la superficie del cráneo (18). Un estilete de calibre 31 (316DC, plásticos uno) permitió mantener libre el paso la cánula guía cuando la rata no recibía el producto correspondiente. El período de la recuperación después de la cirugía se extendió a 1 semana antes de que las ratas fueran sometidas a una prueba con angiotensina II (ANG II). La ANG II (Sigma, St. Louis, MS) fue disuelta en suero estéril (PBS⁺) a una concentración de 20 ng/ml. Se consideró respuesta positiva si los animales aumentaban el volumen de agua bebida en por lo menos 3 ml en un plazo de 20 minutos, que era seguido por una inyección (i.c.v.) de 100 ng ANG II sugiriendo que la colocación de la cánula era correcta. Esta prueba de bebida con ANG II fue realizada antes de cada experimento. A la terminación del estudio una solución del azul de metileno fue inyectada en el

ventrículo, y el cerebro fue extraído del cráneo. La colocación apropiada de la cánula fue confirmada por el aspecto del tinte en el sistema ventricular.

Producción Monoclonal del Anticuerpo.

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales, ratones BALB/c adultos fueron inyectados (i.p) con 30 μ g del péptido sintetizado de leptina de rata con la secuencia aminoacídica AFSKSCSLPQTR-GLOKPEL del centro activo junto con un péptido determinante de células T con la secuencia del aminoácido FISEAIIHVLHRS nombrada FISEA (19). Ambos péptidos fueron disueltos en 100 ml de PBS [10 mM fosfato (pH 7.4), 150 mM NaCl], y homogeneizados con 100 ml del adyuvante completo de Freund. Los ratones fueron inyectados dos veces, con intervalos de un mes, con el mismo inmunógeno homogenizado en adyuvante incompleto de Freund. Quince días después de la última inmunización, un ratón (seleccionado en base a los resultados de ELISA) recibió una inyección intravenosa de 30 mg de leptina en 200 μ l de PBS, y 3 días después se fusionaron las células NS-1 con las células del bazo para la obtención de hibridomas, según se ha descrito previamente (20). Un anticuerpo monoclonal anti-leptina, denominado 3H10 (IgG₃) producido por hibridomas en cultivo, fue seleccionado y purificado por separación celular y cromatografía en columna de afinidad con proteína A. El hibridoma fue caracterizado por inmunoblot de la leptina de ratón (Pepro- tech EC Ltd., Londres, Inglaterra) así como por ELISA indirecto para caracterizar la especificidad de los anticuerpos.

Producción del Anticuerpo Anti-idiotipo (anti-3H10)

Tres ratas Wistar (machos) fueron inmunizadas con el anticuerpo monoclonal purificado 3H10 de ratón. Una rata seleccionada recibió cinco inmunizaciones a intervalos de 21 días, el primero con el adyuvante completo de Freund y cuatro inyecciones adicionales con el adyuvante incompleto de Freund. El suero fue recogido y los IgG fueron purificados por medio de cromatografía afinidad en columna de proteína G (HiTrapTM, Amersham Pharmacia, Barcelona, España).

Protocolo Experimental

Tres tratamientos fueron asignados al azar a las ratas que respondieron positivamente a ANG II. Los tratamientos eran 0 (PBS⁺), 5.0 µg leptina, y 8.0 µg del anticuerpo anti-idiotipo inyectado en el ventrículo lateral. Cada rata recibió al azar uno de los tratamientos en un día dado, seguido por 2 días de recuperación. Para el estudio de la ingesta, cada tratamiento fue administrado dos veces, rotando en un orden semi-aleatorio. Todas las inyecciones fueron realizadas 2 horas después del principio del ciclo de luz (entre 10:00 y 11:00). Los alimentos fueron retirados de las jaulas de los animales a las 09:00. A las 10:00, los animales fueron inyectados en el ventrículo lateral con 4 µl de PBS⁺ estéril o un volumen igual de leptina de rata (R&D Systems, Minneapolis, MN) o del anti-idiotipo en PBS⁺ usando una cánula inyectora (C316I, Plastics One) atada con un tubo de polietileno (PE-10) a una jeringuilla de cristal de 25-µl (Hamilton). Para cada ensayo el tratamiento fue administrado con una bomba CMA/100 (CMA/Microdialysis) a 1.0 µl/min, después de lo cual la cánula inyectora se mantuvo en el lugar por un 1 minuto adicional para permitir la difusión desde sitio de la inyección, antes de ser substituido por el estilete.

El peso corporal y la ingesta se midieron inmediatamente antes de la inyección. Después de la inyección se permitió nuevamente el acceso de los animales a los alimentos y el alimento no consumido fue pesado otra vez 22 horas más adelante. La medida de la temperatura rectal fue obtenida utilizando un termómetro rectal YSI 400 (Panlab S.L., Barcelona, España) cubierto con vaselina e insertado a una distancia estandarizada (6 cm) hasta que se consiguió una lectura estable. La temperatura basal fue medida durante 60 minutos antes de la administración de tratamientos experimentales y cada 30 minutos durante 300 min post-tratamiento. Para eliminar el aumento en la temperatura relacionado con estrés, las ratas fueron aclimatadas previamente a la inserción rectal del termómetro (1 semana después del estudio de ingesta).

Análisis Estadístico

Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. Cuando dos medias fueron comparadas, se utilizó la prueba de t de Student. Las comparaciones de más de dos medias se determinaron por análisis de la variación de dos vías (ANOVA). Para las comparaciones entre algunas medias específicas se utilizó la PLSD de Fisher. Se tomó un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La Figura 1 resume la respuesta con respecto a la ingesta tras la administración de leptina, del anti-idiotipo y de PBS⁺. Las ratas tratadas con PBS⁺ consumieron 17.7 ± 0.6 g de pienso en las 22 horas

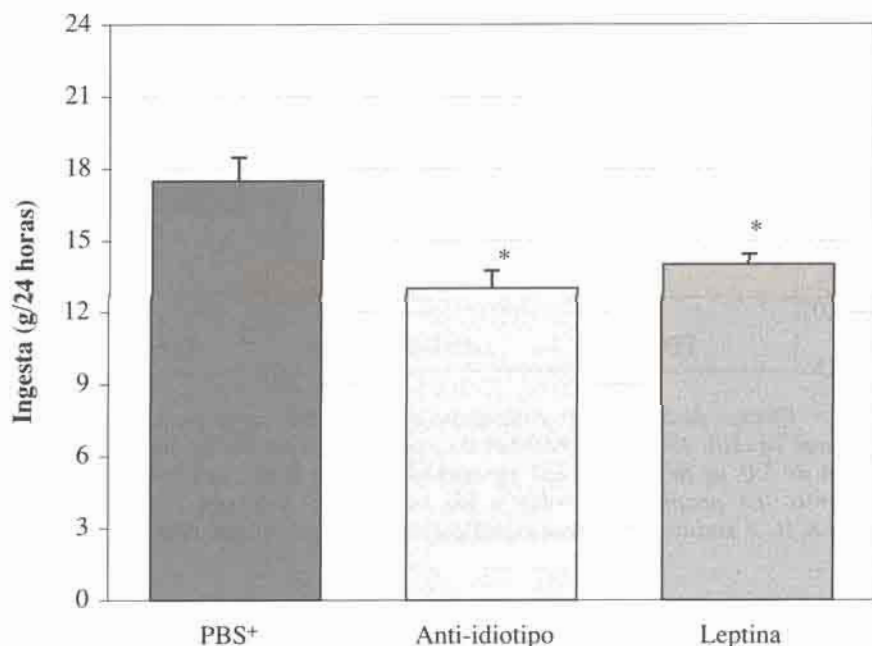


FIGURA 1. Efectos de la leptina/ anticuerpo anti-idiotipo sobre la ingesta en las ratas Wistar ($n=10$). El promedio de ingesta (g) 24 horas que seguían a la administración de 5.0 mg de leptina, 8.0 μ g anti-idiotipo, o PBS⁺. Las ratas fueron utilizadas como sus propios controles y los valores se expresan como las medias \pm S.E.M. * Indica diferencia significativa comparado con PBS⁺ ($P < 0.05$).

que siguieron a la micro-inyección. La administración de 5.0 μg de leptina inhibió la ingesta en un 22% ($P < 0.05$) mientras que 8.0 μg del anti-idiotipo disminuyó el consumo en un 26% ($P < 0.05$), comparado con las ratas tratadas con PBS⁺.

El aumento diario en peso corporal (Fig. 2) también fue disminuido por el anti-idiotipo (-1.4 %) y la leptina (-1.1 %) frente al control que aumentó (+1.3 %).

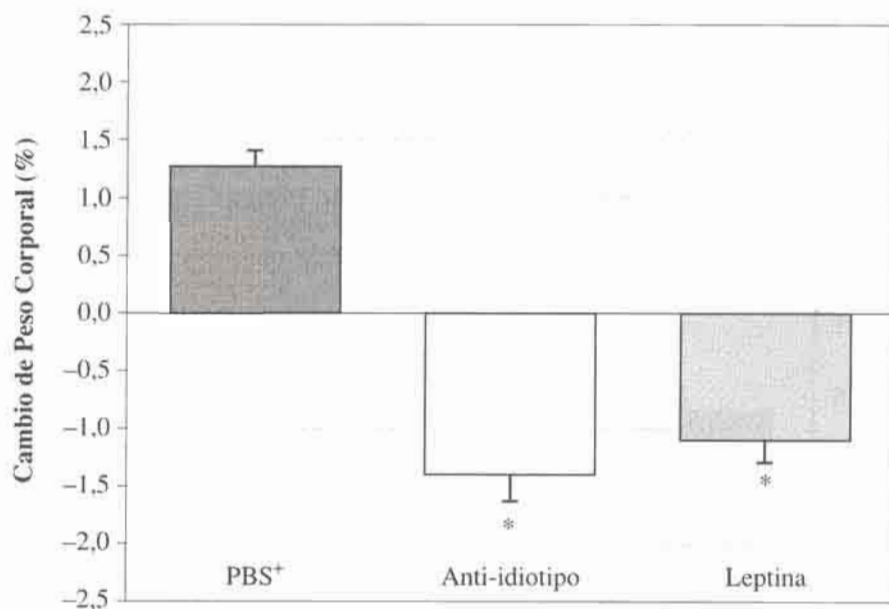


FIGURA. 2. Efectos de la leptina/ anticuerpo anti-idiotipo sobre peso corporal en las ratas Wistar ($n=10$). Los % del cambio en peso corporal a las 22 horas de la administración de 5.0 μg de leptina, 8.0 μg anti-idiotipo, o PBS⁺. Las ratas fueron utilizadas como sus propios controles y los valores se expresan como las medias \pm S.E.M. * Indica diferencia significativa comparado con PBS ($P < 0.05$).

La temperaturas rectal de las ratas tratadas con PBS⁺ se mantuvo entre 37.4 y 37.8°C durante las 5 horas de registro tras la inyección (Fig. 3). La administración (i.c.v.) de 8.0 μg de anti-idiotipo o 5.0 μg de leptina aumentó estadísticamente la temperatura rectal ($\blacktriangle 1.9 \pm 0.11^\circ\text{C}$ y $\blacktriangle 1.7 \pm 0.12^\circ\text{C}$, respectivamente) que seguía siendo elevada durante el registro. Para probar si el efecto observado del anti-

idiotipo en la temperatura rectal fue causado por falta de especificidad del anticuerpo, realizamos una prueba de control con un anticuerpo no específico. La administración central de este anticuerpo no afectó la temperatura rectal.

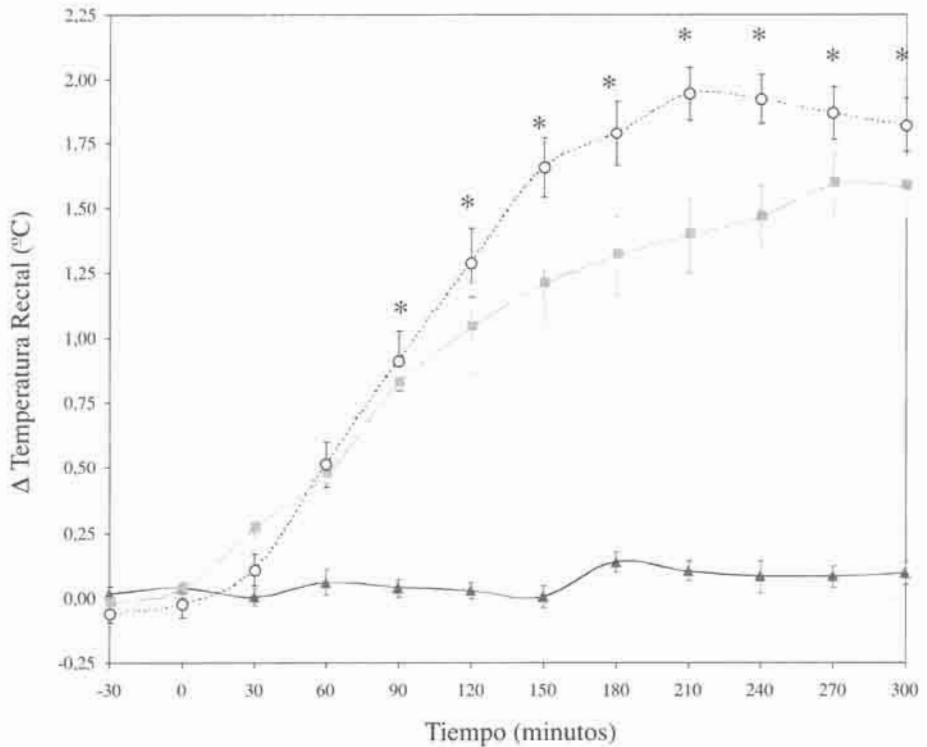


FIGURA 3. Efectos de la leptina y del anti-idiotipo administrados centralmente sobre la temperatura corporal en ratas Wistar macho ($n=9$). La temperatura rectal se determinó 1 hora antes y hasta 5 horas después de la administración i.c.v. de 5.0 μg de la leptina (■), 8.0 μg del anti-idiotipo (○), o de PBS (▲). Las ratas fueron utilizadas como sus propios controles y los valores se expresan como los medias \pm S.E.M. * Indica diferencia significativa comparado con PBS ($P<0.05$).

DISCUSIÓN

Los anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos en el dominio variable de otro anticuerpo, es decir el idiotipo, se llaman anticuerpos anti-idiotipos (2-5). Esta región forma el sitio a la que

se une el antígeno y en algunos casos estos anticuerpos anti-idiotipo llevan una imagen del antígeno original (2). Si el antígeno original es una hormona, en nuestro caso leptina, la semejanza estructural (es decir la "imagen interna") se presta para la posibilidad de que el anticuerpo anti-idiotipo pueda también imitar funcionalmente las características fisiológicas de la hormona cuando se une a los receptores celulares. La inmunomanipulación, por lo tanto, representa un manera novedosa de tratar las enfermedades con resultados prometedores. El uso de un anti-idiotipo de la hormona del crecimiento (GH) promovió el crecimiento en las ratas GH-deficientes (21), mientras que los anticuerpos contra adipocitos parecen ser eficaces en el tratamiento de ratas obesas inducidas por la dieta (22).

Nuestros resultados demuestran una reducción inducida por el anti-idiotipo en la ingesta así como un aumento en la producción de calor comparable a la de la leptina. Sintetizada fundamentalmente por el tejido adiposo (23), la leptina es un regulador importante del apetito y del gasto energético con efecto de retroalimentación sobre el cerebro. Se libera a la circulación en proporción a la grasa corporal (8), entrando en el cerebro y actuando sobre el hipotálamo para inhibir la ingesta y para aumentar el metabolismo energético (24, 25). Se ha sugerido que alteraciones en la producción y/o la sensibilidad de la leptina desempeñan un papel en la patogénesis de la obesidad (26), y la leptina exógena es altamente eficaz invirtiendo la obesidad en animales que carecen de leptina funcional (10). Mientras que la obesidad en seres humanos y en la mayoría de los modelos animales se asocia generalmente a altos niveles de leptina circulante y a la resistencia periférica de la leptina (12, 14), recientes pruebas sugieren que hasta el 25% de los individuos obesos tienen niveles bajos de leptina y pueden beneficiarse del tratamiento con leptina (15). Además, los niveles de leptina circulantes caen después de las manipulaciones dietéticas que dan lugar a la pérdida del peso y parecen contribuir a la sensación de hambre (16) y a la habitual recuperación del peso inicial. Un anti-idiotipo de leptina puede ser útil en estas circunstancias donde sería beneficioso la presencia adicional de la leptina. Aunque la leptina exógena podría alcanzar los mismos efectos deseados, el uso de la inmunoterapia podría permitir que los individuos generen su propia leptina, requiriendo solamente inyecciones ocasionales más que inyecciones diarias. Por

lo tanto, una estrategia basada en anti-idiotipos de leptina puede mostrarse ventajosa para el mantenimiento de los niveles de leptina y prevenir el efecto rebote.

Aunque la base teórica para la inmunoterapia está fundamentado (2), es importante precisar que un anticuerpo-vacuna no es mágico. El uso terapéutico de anticuerpos como vacunas es difícil debido a la respuesta contra el agente terapéutico. Es decir, la presentación del antígeno provoca a menudo la inducción de tolerancia a los antígenos contenidos dentro de la vacuna (27).

Un uso más realista del anti-idiotipo de leptina puede ser su utilización como agonista en los estudios funcionales y bioquímicos del receptor de la leptina. El comportamiento y los efectos metabólicos después de la administración intracerebral sugiere que el anti-idiotipo de la leptina podría actuar en las redes neuronales que controlan la alimentación y el equilibrio energético. El desarrollo de nuevas drogas en esta área terapéutica requiere una mayor comprensión de la neuroanatomía y de la neurofisiología subyacentes de los componentes que regulan el apetito y el gasto energético en el cerebro. La caracterización de la neurobiología de la leptina ha proporcionado evidencias para un sistema de transporte específico y saturable, que permite a la leptina cruzar la barrera hemato-encefálica (BBB) y entrar en el cerebro de los roedores y de los seres humanos (28). La entrada reducida de leptina en el cerebro puede ser uno de los mecanismos de resistencia en esos individuos obesos con los niveles de leptina elevados. Así, el anti-idiotipo de la leptina podría facilitar estudios basados en los receptores y proporcionar un mecanismo molecular para explicar la disfunción. Además, como la leptina es una hormona pleiotropica, los anti-idiotipos pueden llegar a imitar funciones individuales teniendo en cuenta el estudio de sistemas separados (29).

Este estudio demuestra que la administración central de un anticuerpo anti-idiotipo de leptina podría inhibir la ingesta y aumentar la producción de calor, imitando las acciones centrales de la leptina. La obesidad es cada vez más frecuente y un problema grave de salud. Aunque existen tratamientos disponibles, la pérdida significativa sostenida del peso (5-10 % de peso corporal inicial) es rara, destacando la necesidad de nuevas estrategias eficaces. A

pesar de los pasos rápidos hacia una droga ideal contra la obesidad, el progreso adicional es necesario para incorporar nuevos resultados en la neurobiología del equilibrio energético en intervenciones clínicas. La caracterización de los productos genéticos asociados con obesidad ha revelado nuevos caminos bioquímicos y dianas moleculares para la intervención farmacológica. Un anti-idiotipo de leptina puede ser una herramienta útil en este progreso y estudios futuros pueden demostrar una ventaja en individuos obesos con los niveles de leptina normal-bajos así como esos individuos que están en un régimen dietético hipocalórico y que desean disminuir el efecto del rebote. Este experimento pone de manifiesto que la leptina y otras moléculas proteicas pueden servir para desarrollar procesos de inmuno-neutralización y producción de anti-idiotipos específicos (30)

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud por la ayuda material y financiera a la Universidad de Navarra (Línea especial de Nutrición y Obesidad) y al Departamento de Salud del Gobierno de Navarra. También agradecen a la Real Academia Nacional de Farmacia la concesión del Premio Faes Pharma correspondiente a la Convocatoria de 2002.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BRAY, G. A. (1987) Obesity—a disease of nutrient or energy balance? *Nutr Rev.* 45:33-43.
- (2) PAN, Y.; YUHASZ, S. C. AND AMZEL, L. M. (1995) Anti-idiotipico antibodies: biological function and structural studies. *Faseb J.* 9:43-9.
- (3) BRIONES-URBINA, R.; ISLAM, M. N.; IVANYI, J. AND FARID, N. R. (1987) Use of anti-idiotipico antibodies as probes for the interaction of TSH subunits with its receptor. *J. Cell Biochem.* 34:151-62.
- (4) TAVARES, L.; RONEKER, C.; POSTIE, L.; FEVEREIRO, M. AND DE NORONHA, F. (1991) Anti-idiotipico antibodies to feline leukemia virus: an approach for retroviral immunization strategies. *Viral Immunol.* 4:5-16.
- (5) REILLY, T. M. AND ROOT, R. T. (1986) Production of idiotipic and anti-idiotipic antibodies by BALB/c mice in response to immunizations with glucagon, vasopressin, or insulin: supporting evidence for the network concept. *J. Immunol.* 137:597-602.

- (6) MARTINEZ, J. A.; GARCÍA-GRANERO, M.; FRÜHBECK, G. (1998) Age-related differences in the thermogenic and ponderal effects following the administration of fragment peptides from the rat ob protein. *Regulatory Peptides* 73:83-87.
- (7) MARTINEZ-ANSÓ, E.; PÉREZ, M. AND MARTINEZ, J. A. (1998) Induction of hypothermia, hypoglycemia and hyperinsulinemia after acute leptina immunoneutralization in overnight fasted mice. *Int. J. Mol. Med.* 2:681-3.
- (8) FREDERICH, R. C.; LOLLMANN, B.; HAMANN, A. *et al.* (1995) Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J. Clin. Invest.* 96:1658-63.
- (9) BASKIN, D.G.; FIGLEWICZ LATTEMANN, D.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C.; PORTE, D. JR. AND SCHWARTZ, M. W. (1999) Insulin and leptina: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848:114-23.
- (10) HALAAS, J. L.; GAJIWALA, K. S.; MAFFEI M. *et al.* (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269:543-6.
- (11) HAYNES, W. G.; MORGAN, D. A.; WALSH, S. A.; MARK, A. L. AND SIVITZ W. I. (1997) Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptina. *J. Clin. Invest.* 100:270-8.
- (12) MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E. *et al.* (1995) Leptina levels in human and rodent: measurement of plasma leptina and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1:1155-61.
- (13) HEYMSFIELD, S. B.; GREENBERG, A. S.; FUJIOKA, K. *et al.* (1999) Recombinant leptina for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *Jama.* 282:1568-75.
- (14) CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L. *et al.* (1996) Serum immunoreactive-leptina concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334:292-5.
- (15) FAROOQI, I. S.; KEOGH, J. M.; KAMATH, S. *et al.* (2001) Partial leptina deficiency and human adiposity. *Nature.* 414:34-5.
- (16) KEIM, N. L.; STERN, J. S. AND HAVEL, P. J. (1998) Relation between circulating leptina concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:794-801.
- (17) FAROOQI, IS.; JEBB, S. A.; LANGMACK, G. *et al.* (1999) Effects of recombinant leptina therapy in a child with congenital leptina deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341:879-84.
- (18) PAXINOS, G. AND WATSON, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic. San Diego.
- (19) SAROBE, P.; LASARTE, J. J.; GOLYANO, J. *et al.* (1991) Induction of antibodies against a peptide hapten does not require covalent linkage between the hapten and a class II presentable T helper peptide. *Eur. J. Immunol.* 21:1555-8.
- (20) MARTINEZ-ANSO, E.; CASTILLO, J. E.; DIEZ, J.; MEDINA, J. F. AND PRIETO, J. (1994) Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver. *Hepatology.* 19:1400-6.
- (21) WANG, BS.; ZHANG R. J.; BONA, C. A. AND MORAN T. M. (1994) Promotion of animal growth with a monoclonal anti-idiotipo specific to anti-porcine growth hormone antibody. *Mol. Immunol.* 31:651-6.

- (22) FLINT, D. J. (1998) Effects of antibodies to adipocytes on body weight, food intake, and adipose tissue cellularity in obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:263-8.
- (23) ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L. AND FRIEDMAN, J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-32.
- (24) CAMPFIELD, L. A.; SMITH F. J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R. AND BURN P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 269:546-9.
- (25) PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN M. J.; BAKER M. B. *et al.* (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269:540-3.
- (26) FREDERICH, R. C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LOLLMANN, B. LOWELL, B. B. AND FLIER, J. S. (1995) Leptina levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet- induced resistance to leptina action. *Nat. Med.* 1:1311-4.
- (27) ISAACS, J. D.; WATTS, R. A.; HAZLEMAN, B. L. *et al.* (1992) Humanised monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet.* 340:748-52.
- (28) BANKS, W. A.; KASTIN A. J.; HUANG W.; JASPAN, J.B. AND MANESS, L. M. (1996) Leptina enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides.* 17:305-11.
- (29) FRÜHBECK, G. (2002) Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr. Rev.* 60:S47-S55.
- (30) DE FANTI, B.; LAMAS, O.; MILAGRO, F.; MARTINEZ-ANSÓ, E.; MARTINEZ, J. A (2002) Immunoneutralization and anti-idiotypic production: two-sided applications of leptin. *Trends in Immunol.* 23:180-181