

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

ADRIANA BARBIERI COMPARSI

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LEPTINA EM GESTANTES
SAUDÁVEIS E COM PRÉ-ECLÂMPsia**

Porto Alegre

2014

ADRIANA BARBIERI COMPARSI

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LEPTINA EM GESTANTES
SAUDÁVEIS E COM PRÉ-ECLÂMPZIA**

Dissertação apresentada como requisito para
a obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências
da Saúde da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Orientadores: Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa
Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Porto Alegre

2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO

C737a Comparsi, Adriana Barbieri

Avaliação dos níveis de leptina em gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia / Adriana Barbieri Comparsi. Porto Alegre: PUCRS, 2014.

78f. il. : tab. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientadora: Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. HIPERTENSÃO INDUZIDA PELA GRAVIDEZ. 2. CITOCINAS. 3. PLACENTA. 5. GESTAÇÃO. 6. NEFROLOGIA. I. Costa, Bartira Ercília Pinheiro da. II. Figueiredo, Carlos Eduardo Poli de. III. Título.

CDD 616.61

CDU 591.461:612.63.02(043.3)

NLM WP 540

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Dra Bartira e Dr Poli que me acompanham nesta jornada médica desde a faculdade sem eles não chegaria até aqui. Dra Bartira sempre disposta, paciente, brilhante e amiga. Dr Poli, um exemplo de profissional, de pesquisador, com um coração de ouro.

Ao Prof. Mário Wagner por todas orientações com entusiasmo único e amor pelo que faz, e por sua paciência com nossa limitação em estatística.

À minha querida Dra. Martha Hentschke, pesquisadora nata, por sua infinita disposição na realização deste estudo e pela paciência em atender todas minhas dúvidas, e mails, mensagens, etc. Te conhecer com certeza somou muito na minha vida.

Ao meu colega de profissão e amigo, Dr André Poitevin pela paciência de me aguentar nesta vida e pela minha ausência, principalmente na reta final.

Ao Dr Giovani Gadonski , exemplo de médico, e desculpa por estar ausente neste momento.

Aos meus amigos de coração: Cristina Moreira, Tamara Zimmermann, Juliano Dors, Luthiana Carpes, Adaiane Calegari, Elisane Driwoski, Chayenna Amorim, Sofia Laranja.

A todos meus amigos que fiz no mestrado, em especial à Fernanda Raabe, pessoa especial.

Agradeço à minha família por ter me acompanhado nesta jornada infinita.

"A maior parte das pessoas é assim. Sonham com o vôo, mas temem as alturas. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o vôo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência das certezas."

Rubem Alves

FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Hospital São Lucas – HSL/PUCRS

RESUMO

Objetivo: Avaliar a associação dos níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e tecido placentário de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia (PE).

Pacientes e métodos: Foram analisados os níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e tecido placentário de 50 gestantes com pré-eclâmpsia e 67 gestantes normotensas. A leptina foi mensurada em plasma e placenta utilizando o Sistema MagPlexTH-C - ensaio de microesferas.

Resultados: Os níveis de leptina foram 40 vezes maiores no plasma materno e 82 vezes maiores no tecido placentário das pacientes pré-eclâmpticas em comparação aos controles. No grupo Pré-eclâmpsia encontramos as médias geométricas de 19.59 ng/mL e 163.31 mg/g e nas normotensas 13.96 ng/mL e 89.95 mg/g respectivamente. A análise do plasma do cordão umbilical não mostrou diferença significativa entre os grupos. As razões das médias encontradas após ajuste para idade materna, índice de massa corporal e idade gestacional, foram no plasma materno (rm=1.40; IC 95%: 1.00 - 1,97, p=0.049), no plasma fetal (rm=1.33; IC 95%: 0.85- 2.09, p=0.216) e na placenta (rm=1.82; IC 95%: 1.11 - 2,98, p=0.019).

Conclusão: Os valores de leptina encontrados nas pacientes com pré-eclâmpsia quando comparados ao controle são significativamente maiores no plasma da mãe e no tecido placentário. Os níveis extremamente elevados na placenta são sugestivos de estudos com desenho específico para investigação de biomarcador.

Descritores: Hipertensão Induzida pela Gravidez; Citocinas; Placenta.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the association of leptin levels in the maternal plasma, umbilical cord plasma and placental tissue of normotensive and preeclamptic (PE) pregnant women.

Patients and methods: Leptin levels were analysed in the maternal plasma, umbilical cord plasma and placental tissue of 50 women with preeclampsia and 67 normotensive pregnant women. Plasma and placental leptin were measured using the MagPlexTH-C microspheres system.

Results: Leptin levels were 40 times higher in the maternal plasma and 82 times higher in the placental tissue of patients with preeclampsia in comparison to the controls. The geometric means found were 19.59 ng/mL and 163.31 mg/g in the PE group, and 13.96 ng/mL and 89.95 mg/g in the normotensive group, respectively. Analysis of the umbilical cord plasma showed no significant difference between the groups. The mean ratios found after adjustment for maternal age, BMI and gestational age were: maternal plasma (MR=1.40; 95% CI: 1.00 - 1.97, p=0.049), fetal plasma (MR=1.33; 95% CI: 0.85- 2.09, p=0.216) and placenta (MR=1.82; 95% CI: 1.11 - 2.98, p=0.019).

Conclusion: Leptin values found in patients with preeclampsia are significantly increased in maternal plasma and placental tissue in comparison to the control. The extremely high levels in the placenta are believed to have resulted from studies that specifically aimed to evaluate biomarkers.

Keywords: Hypertension, Pregnancy-Induced; Cytokines; Placenta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Gráficos de <i>boxplot</i> representando, em escala logarítmica, os valores de leptina nas gestantes normotensas versus gestantes com pré-eclâmpsia no plasma materno ($p=0,002$), no plasma do feto ($p=0,607$) e na placenta ($p<0,001$).	28
Figura 2 - Gráfico de floresta (<i>Forest Plot</i>) representando a razão das médias geométricas e seus respectivos intervalos de confiança para a comparação das gestantes normotensas versus gestantes com pré-eclâmpsia, para os níveis de leptina no plasma materno, plasma cordão umbilical e placenta.	30
Figura 3 -	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos, clínicos e perinatais das gestantes normotensas controle (n=67) e pré-eclâmpsia (n=50).	27
Tabela 2 - Médias geométricas dos níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta das pacientes normotensas e pré-eclâmplicas - não ajustadas.	29
Tabela 3 - Médias geométricas dos níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta das pacientes normotensas e pré- eclâmplicas - ajustadas para idade materna, IMC e idade gestacional.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	19
3 HIPÓTESE	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5 PACIENTES E MÉTODOS	22
5.1 DESENHO DO ESTUDO	22
5.2 TAMANHO DA AMOSTRA.....	22
5.3 AMOSTRA.....	22
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	22
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	23
5.6 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	23
5.7 VERIFICAÇÃO DO PESO DAS GESTANTES.....	23
5.8 ANÁLISE LABORATORIAL.....	23
5.9 COLETA DO MATERIAL.....	24
5.10 ANÁLISE DA LEPTINA	24
5.10.1 Preparação das Amostras.....	24
5.10.2 Análise das Amostras.....	25
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5.12 ASPECTOS ÉTICOS.....	26
6 RESULTADOS	27
7 DISCUSSÃO	32
8 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
Anexo A - Protocolo de Coleta Padronizado– Linha de Pesquisa Hipertensão na Gestação Laboratório de Nefrologia/IPB – PUCRS (Ramal 2344)	42
Anexo B – Gráfico de Acompanhamento Nutricional da Gestante	44
Anexo C	45
Anexo D - Ofício -CEP 413.859	47
Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2012	49

Anexo F - Artigo Original.....	52
Anexo G - Comprovante Submissão Artigo.....	78

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão na gravidez pode ter diferentes apresentações clínicas (1,2). Algumas gestantes já possuem diagnóstico prévio de hipertensão arterial crônica, que se agrava durante a gestação, outras são previamente normotensas e passam a apresentar pressão elevada ao longo da gravidez. Além disso, associado ao aumento da pressão, podem desenvolver proteinúria consolidando uma das síndromes mais temidas da gestação: a PE/eclâmpsia. Estas Doenças Hipertensivas da Gestação (DHG), são uma das mais importantes complicações do ciclo gravídico-puerperal, apresentando alto risco de morbimortalidade para o binômio mãe-filho (1,3). Entre as complicações mais graves da PE estão: descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemólise, hemorragia cerebral, falência hepática, edema agudo de pulmão, insuficiência renal aguda, crescimento intrauterino restrito e morte fetal (4).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, dentre as doenças hipertensivas ligadas à gestação, a PE afeta de 2% a 3 % de todas as gestações no mundo, sendo responsável por 60 mil mortes a cada ano (5,6). Um estudo brasileiro realizado entre 1991 e 1995 demonstrou uma incidência de 7,5% de doenças hipertensivas ligadas à gestação. Dentre elas, diagnosticou-se PE e PES em 2,8% dos casos. Além disso, 4% das gestantes foram classificadas como hipertensas crônicas (7).

Apesar dos avanços no entendimento DHG, muita controvérsia existe em relação as suas definições e classificações, como as propostas pelos grupos: *Canadian Hypertensive Society* (CHS) (8). *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (NHBPEPWGHBPP) (1), Organização Mundial da Saúde (OMS) (9), *International Society for the Study of Hypertension* (ISSH) (10), *Australasian Society for the Study of Hypertension* (ASSH) (11), *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (12) e Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI (13).

Nesta dissertação, usaremos como base para classificar a DHG o relatório do NHBPEPWGHBPP e das VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão de 2010, o qual classifica a DHG em:

Pré-eclâmpsia/eclâmpsia: Síndrome específica da gravidez humana, que ocorre após a 20ª semana de gestação e é caracterizada por hipertensão e

proteinúria. A hipertensão é definida como PAS \geq 140 mmHg e PAD \geq 90 mmHg em gestante normotensa antes das 20 semanas de gestação. A proteinúria é definida como patológica quando \geq 0,3g em 24 horas. Na ausência de proteinúria, a suspeita diagnóstica também existe quando o aumento da pressão está acompanhado dos seguintes sintomas: cefaléia, borramento visual, dor abdominal e alterações laboratoriais como baixa contagem de plaquetas e alteração de enzimas hepáticas. A proteinúria e a pressão arterial devem voltar ao normal até 12 semanas após o parto. A evolução para eclâmpsia caracteriza-se pela presença de convulsões nestas pacientes não atribuída a outras causas.

Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica: é o desenvolvimento da síndrome de PE em paciente com hipertensão crônica (PES). Em pacientes que apresentam dano em órgão-alvo o diagnóstico é mais fácil, do que naqueles sem conhecimento prévio da sua pressão arterial. O diagnóstico de PES é provável nas seguintes situações: mulheres hipertensas e sem proteinúria no início da gestação (menos de 20 semanas) que desenvolvem proteinúria durante a gestação e mulheres com hipertensão e proteinúria prévias a vigésima semana de gestação, mas que desenvolvem aumento súbito de proteinúria, pressão arterial, transaminases, bem como trombocitopenia (plaquetas abaixo de 100.000/mm³).

Hipertensão gestacional: A gestante com hipertensão detectada pela primeira vez após a 20^a semana de gestação sem proteinúria patológica. O diagnóstico final apenas poderá ser confirmado com a normalização da pressão arterial no período de até 12 semanas após o parto, sendo classificada como hipertensão transitória. Se a pressão arterial elevada persistir após as doze semanas, a paciente será considerada como hipertensa crônica.

Hipertensão crônica: Presença de hipertensão arterial prévia a gestação, que continua após o término da gravidez, ou que aparece anteriormente a vigésima semana gestacional. Hipertensão é definida como Pressão Arterial Sistólica (PAS) \geq 140 mmHg e Pressão Arterial Diastólica (PAD) \geq 90 mmHg. A hipertensão diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, e que não resolve após o parto, é também classificada como hipertensão crônica (1).

Assim como existem controvérsias quanto à classificação, a fisiopatologia da doença hipertensiva gestacional, ainda não é bem compreendida (14). Ela também é conhecida como a “doença das teorias” pois sua etiologia ainda é desconhecida (15). Atualmente, alguns aspectos da pré-eclâmpsia, como isquemia placentária,

estresse oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante, alterações hormonais, adaptação imune, disfunção endotelial e herança genética estão sendo extensivamente investigados quanto à possibilidade de servirem como marcadores desta doença (16; 17, 18).

Mais recentemente, a “excessiva inflamação” e o “desbalanço angiogênico”, são as teorias mais estudadas. A liberação de citotóxicos pela placenta é a hipótese fortemente aceita para explicar a doença. O trofoblasto penetra apenas os segmentos deciduais mais superficiais das artérias espiraladas, deixando estreitos e musculares os segmentos mais profundos. Na camada média do vaso ocorre aterosclerose aguda e necrose fibrinóide, na íntima surge fibrina, macrófagos com lipídios e células musculares lisas (19). É possível que a má formação da circulação útero-placentária resulte em hipóxia placentária, estresse oxidativo e infarto placentário subsequente.

O endotélio materno apresenta disfunção generalizada (20). O aumento do volume da célula endotelial e a vacuolização do citoplasma (endoteliose glomerular), assim como a presença de depósitos fibrinóides sub-endoteliais (21) são tidos como patognomônicos da pré-eclâmpsia. Há evidências de que alterações do fluxo sanguíneo placentário ocasionem dano no endotélio materno por meio de fatores circulantes liberados pela placenta com hipóxia (22) ou por meio de estresse oxidativo (16).

Os monócitos e os neutrófilos ativados são fontes de radicais livres altamente reativos (23,16). Na pré-eclâmpsia há excessiva resposta inflamatória da mãe à gravidez. Há ativação sistêmica de elementos da resposta inflamatória, entre os quais os monócitos, granulócitos, fator de necrose tumoral-alfa e seus receptores, fosfolipase A2, e dos sistemas de complemento e coagulação. Foi verificado que a gravidez normal envolve resposta inflamatória quando se comparam, por citometria de fluxo, os leucócitos da circulação periférica de gestantes com e sem pré-eclâmpsia e pacientes com septicemia (24). Na pré-eclâmpsia a resposta foi semelhante, em magnitude, à observada na sepse. É possível que esta resposta inflamatória elevada contribua para a disfunção endotelial. Além disto, a hipóxia placentária pode agravar o quadro, ao induzir a liberação de estímulos inflamatórios na circulação. Este modelo indica que esta síndrome é a resposta extremada das adaptações gestacionais.

Uma das citocinas que está sendo estudada é a leptina, que é considerada uma citocina pró- inflamatória, pertencente à classe das citocinas tipo I e possui estrutura semelhante a interleucina-6 (25). A leptina é produzida normalmente no tecido adiposo e mostra correlação positiva com massa de gordura e índice de massa corporal (IMC)(26,27), modula o apetite e estimula gasto energético por ativação do sistema nervoso simpático (28,29). Também interfere no metabolismo da glicose por aumentar a sensibilidade à insulina. Além disso, está envolvida no controle da função reprodutiva incluindo modulação do hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante e hormônio adreno-corticotrófico no hipotálamo (30).

Durante a gestação os níveis plasmáticos de leptina estão significativamente mais elevados em comparação a mulheres não gestantes. A leptina é produzida pela placenta e pelo sinciciotrofoblasto, fato comprovado pela comparação dos níveis de leptina de mulheres antes e após o parto que mostrou significativa queda em 24 horas. Estudos longitudinais têm sugerido que os níveis de leptina na gestação atingem um pico no segundo trimestre e se mantém estáveis até o parto (31). Alguns autores têm mostrado que em mulheres com pré-eclâmpsia o nível de leptina é três vezes maior em comparação ao grupo controle – gestantes saudáveis (32). Além disso, níveis elevados de leptina plasmática mostraram correlação positiva com média de pressão arterial, pois a leptina tem papel na regulação do sistema nervoso simpático (33,34).

A dosagem de leptina no tecido placentário em pacientes com PE também se mostrou aumentada em vários estudos (35,36,37,38,39,40).

O nosso grupo do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS) tem estudado pacientes gestantes com e sem PE e avaliado vários aspectos originais da via L-arginina/óxido nítrico, função endotelial, polimorfismos genéticos, transporte de membrana celular, aspectos imunológicos, contribuindo com produção científica relevante nesta área. Para a classificação de PE, utilizamos os critérios recomendados pelo NHBPEPWGHBPP. O termo Síndrome de PE (SPE) também tem sido usado quando não é possível diferenciar entre PE e PES à hipertensão crônica.

Apesar das evidências acima citadas, ainda há vários aspectos a esclarecer em relação PE e seus marcadores. Neste projeto analisamos os níveis de leptina no plasma materno, tecido placentário e plasma do cordão umbilical provenientes de

gestantes com e sem PE. Também correlacionamos o IMC das gestantes, conforme tabela de correção para idade gestacional proposta por Atalah (41) com níveis plasmáticos de leptina. Foram realizadas associações dos níveis dessa citocina com as características do recém-nascido, dentre outras.

2 JUSTIFICATIVA

Este projeto está inserido na linha de pesquisa que estuda os distúrbios hipertensivos da gestação do grupo de pesquisas em Nefrologia / Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). O grupo de pesquisa tem estudado pacientes com e sem pré-eclâmpsia (PE), avaliando e publicando em revistas científicas vários aspectos envolvidos na fisiopatologia desta doença. Os dados obtidos com esses estudos são importantes no nosso meio, pois permitem investigar uma síndrome gestacional de extrema relevância médica, por ser uma das maiores causas de morbidade e mortalidade materno-fetal no mundo, e ter etiologia ainda desconhecida. Além disso, até o momento, não existem modelos experimentais em animais que representem adequadamente a doença hipertensiva da gestação humana. Não há cura conhecida para a PE e o único “tratamento” é a interrupção da gestação.

Os níveis de leptina em gestantes com pré-eclâmpsia têm se mostrado um marcador bastante promissor para a patologia.

3 HIPÓTESE

Os níveis de leptina estão elevados na placenta, plasma materno e cordão umbilical em gestantes com PE.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre os níveis séricos de leptina e a ocorrência de pré-eclâmpsia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia:

- Comparar, em tecido placentário, plasma materno e do cordão umbilical, os níveis de leptina;
- Correlacionar níveis de leptina com indicadores de gravidade de pré-eclâmpsia;
- Correlacionar níveis de leptina com variáveis clínicas maternas e do recém-nascido.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo observacional caso-controle, foram analisados um grupo de gestantes com pré-eclâmpsia e outro sem pré-eclâmpsia.

5.2 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado a partir de alfa 0,05 e beta de 0,2, com magnitude de efeito 0,6, participaram do estudo 50 pacientes com PE e 67 pacientes no grupo das normotensas.

5.3 AMOSTRA

A amostra incluiu pacientes que receberam assistência no Hospital São Lucas /PUCRS (HSL/PUCRS). A seleção é aleatória, de acordo com a chegada ao ambulatório de obstetrícia e centro obstétrico do HSL/PUCRS. Foi preenchido um protocolo de inclusão que consta de dados de anamnese, exame físico e exames complementares (Anexo A).

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As mulheres incluídas foram gestantes, com mais de 20 semanas de gravidez, de feto único, com ou sem diagnóstico de PE, que estavam hospitalizadas no HSL/PUCRS com acompanhamento do corpo assistencial.

Foi realizada uma seleção aleatória de pré-eclâmplicas que satisfaçam os critérios de inclusão. Classificadas pacientes com PE grave aquelas que apresentaram proteinúria $\geq 2\text{g}$ em 24 horas, PAS $\geq 160\text{mmHg}$, síndrome HELLP (Hemólise, enzimas hepáticas elevadas, baixo número de plaquetas) e eclâmpicas.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Gestação múltipla, hepatopatia, nefropatia, tireoideopatia, infecção ativa, sangramento ativo e pacientes que durante o estudo desistirem de participar.

5.6 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A medida da pressão arterial foi realizada conforme as recomendações específicas para gestantes. Foram utilizadas para verificação da pressão arterial as orientações do ACOG e NHBPEPWGHBPP com a paciente sentada, manguito colocado na altura do coração, após 20 minutos de repouso e em duas tomadas separadas, no mínimo, por intervalo de 4 a 6 horas. Para a pressão arterial diastólica é considerado o quinto som de Korotkoff. Os esfigmomanômetros utilizados são submetidos à aferições regulares pelo HSL/PUCRS.

5.7 VERIFICAÇÃO DO PESO DAS GESTANTES

No momento da admissão das pacientes no hospital as gestantes foram pesadas e foi calculado o índice de massa corporal (IMC). Como o IMC varia muito na gestação pois depende da idade gestacional, foi categorizado o IMC de acordo com a classificação proposta por Atalah (41) e adotada pelo Ministério da Saúde (42), classificando as gestantes em baixo peso, adequado, sobrepeso e obesidade (Anexo B).

5.8 ANÁLISE LABORATORIAL

Os exames de laboratório foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Lucas da PUC-RS. Todos exames fazem parte da rotina de internação das pacientes.

Para determinação da proteinúria foram utilizadas a relação proteinúria/creatininúria em amostra e/ou proteinúria de 24 horas, quando ambas estão disponíveis utilizado o valor mais elevado.

5.9 COLETA DO MATERIAL

Material: plasma materno e plasma do cordão umbilical.

Foram coletados em média 4 mL de sangue materno em tubo Vacutainer[®] contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de cada paciente, antes do parto. As amostras foram processadas no Laboratório de Nefrologia/HSL/PUCRS, sendo centrifugadas a 2.000g por 10 minutos. O plasma foi estocado em microtubo de centrifugação de 0,6 mL inicialmente a -20°C, e após a -80°C, até o momento da dosagem. Logo após o parto, foi puncionado 4 mL de sangue da veia do cordão umbilical, sendo processado e estocado nas mesmas condições do plasma materno

Material: placenta

Imediatamente após o parto, foram dissecados da face materna da placenta seis cubos de aproximadamente 1 cm do centro de um cotilédone localizado na metade da distância entre o cordão umbilical e a extremidade do órgão. Este material foi armazenado em microtubo de centrifugação de 1,5 mL nas mesmas condições dos plasmas materno e fetais.

As amostras de gestantes sem PE serão obtidas da mesma forma que das pré-eclâmplicas; no entanto, serão escolhidas gestantes com idade gestacional semelhante.

5.10 ANÁLISE DA LEPTINA

5.10.1 Preparação das Amostras

Foram aliqüotadas aproximadamente 0,3g de tecido placentário, às quais foi adicionado coquetel de inibidor de protease (Millipore Corporation, Catalogo #20-201) diluído em RIPA *Lysis Buffer* 10X, na concentração de 3mL/g de tecido. Em sequência, foi realizada a maceração mecânica do tecido placentário em gral e pistilo de porcelana. Após, o material foi transferido novamente ao tubo Falcon 15 mL, realizou-se um impulso de giro a 2.000 rpm, por 30seg em centrífuga refrigerada a 18°C (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha), e então o material foi desintegrado em sonicador de banho (Aquasonic, Cortland, New York, USA) por 10

minutos, em banho gelado (através da adição de gelo). Após a sonicação, o material foi transferido para microtubo de centrifugação de 1,5 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C (Sanyo, London, United Kingdom). O sobrenadante foi aliquotado a 200 µl em microtubo de 0,6 mL (2 tubos por amostra), os quais foram armazenados a -20°C até posterior análise. A concentração de proteínas da solução foi mensurada usando Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizando microtubos específicos de análise (Qubit Assay tubes, Eugene, Oregon, USA).

5.10.2 Análise das Amostras

A dosagem de leptina foi realizada em plasmas e placenta utilizando o sistema MagPlexTH-C - ensaio com microesferas (MAGPIX, Luminex, Austin, Texas, USA) e o Software Exponent (xPONENT 4.2), Kit Milliplex HCVD1MAG-67K-02 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Os ensaios foram conduzidos de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo C).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 21.0 (SPSS, 21.0) para Windows. Dados quantitativos simétricos foram expressos em média e desvio padrão (DP), enquanto dados qualitativos expressos em números e porcentagem (%). Teste *t* de Student foi usado para testar significância de diferença entre variáveis quantitativas simétricas. Teste Qui-quadrado foi empregado para comparar variáveis categóricas entre os grupos. Para comparar os valores de leptina entre os grupos, inicialmente realizou-se teste de Mann-Whitney e após, realizou-se a transformação logarítmica dos valores para Análise de Covariância (ANCOVA) ajustada para idade materna, idade gestacional e IMC. Calculadas as médias geométricas, razão das médias (RM) e intervalos de confiança (IC) de 95%. Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas análises realizadas.

5.12 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética/PUCRS, ofício-CEP 413.859 (Anexo D).

Os exames realizados não ofereceram riscos para mãe e nem para o feto. Todas pacientes foram devidamente informadas sobre a pesquisa e incluídas somente após a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. (Protocolo 368/11) (Anexo E).

6 RESULTADOS

Dados demográficos, clínicos e perinatais estão descritos abaixo, na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos, clínicos e perinatais das gestantes normotensas controle (n=67) e pré-eclâmpsia (n=50).

Variáveis	Pacientes controle	Pacientes PE	Valor p
Idade (anos)	26,4 ± 5,3	26,4 ± 6,8	0,99
Etnia branca n(%)	34 (52,3)	31 (64,6)	0,25
Tabagismo não n(%)	55 (82)	44 (88)	0,42
PE prévia não n(%)	66 (98,5)	38 (76)	<0,001
Primigesta n(%)	28 (41,8)	25 (51)	0,35
PEG (kg)	79,9 ± 19,8	83,9 ± 14,7	0,21
IMC inicial (kg/m ²)	25,8 ± 5,6	26,9 ± 5,5	0,30
IMC final (kg/m ²)	30,4 ± 5,8	32,3 ± 5,4	0,08
Delta IMC (kg/m ²)	4,40 ± 1,95	5,68 ± 2,99	0,01
IGP (semanas)	39,3 ± 1,5	36,1 ± 3,9	<0,001
PAS (mmHg)	118,7 ± 10,2	156,7 ± 17,3	<0,001
PAD (mmHg)	74,7 ± 7,7	100,8 ± 13,6	<0,001
Proteinúria (gramas)	-	0,67 (0,42-2,2)	-
Parto vaginal n(%)	45 (67,2)	12 (24,0)	<0,001
PRN (gramas)	3393 ± 458	2789 ± 903	<0,001
Sexo RN feminino n(%)	31 (46,3)	27 (54,0)	0,41
Apgar 1º minuto	8,5 ± 0,8	7,5 ± 1,8	<0,001
Apgar 5º minuto	9,4 ± 0,6	8,7 ± 1,2	<0,001
PIG n(%)	3 (4,5)	3 (6,1)	0,44
PP (gramas)	649 ± 142	590 ± 179	0,06

Dados representados em médias ± desvio padrão para variáveis contínuas e número absoluto (porcentagem) para variáveis categóricas. Proteinúria em mediana e intervalo interquartil.

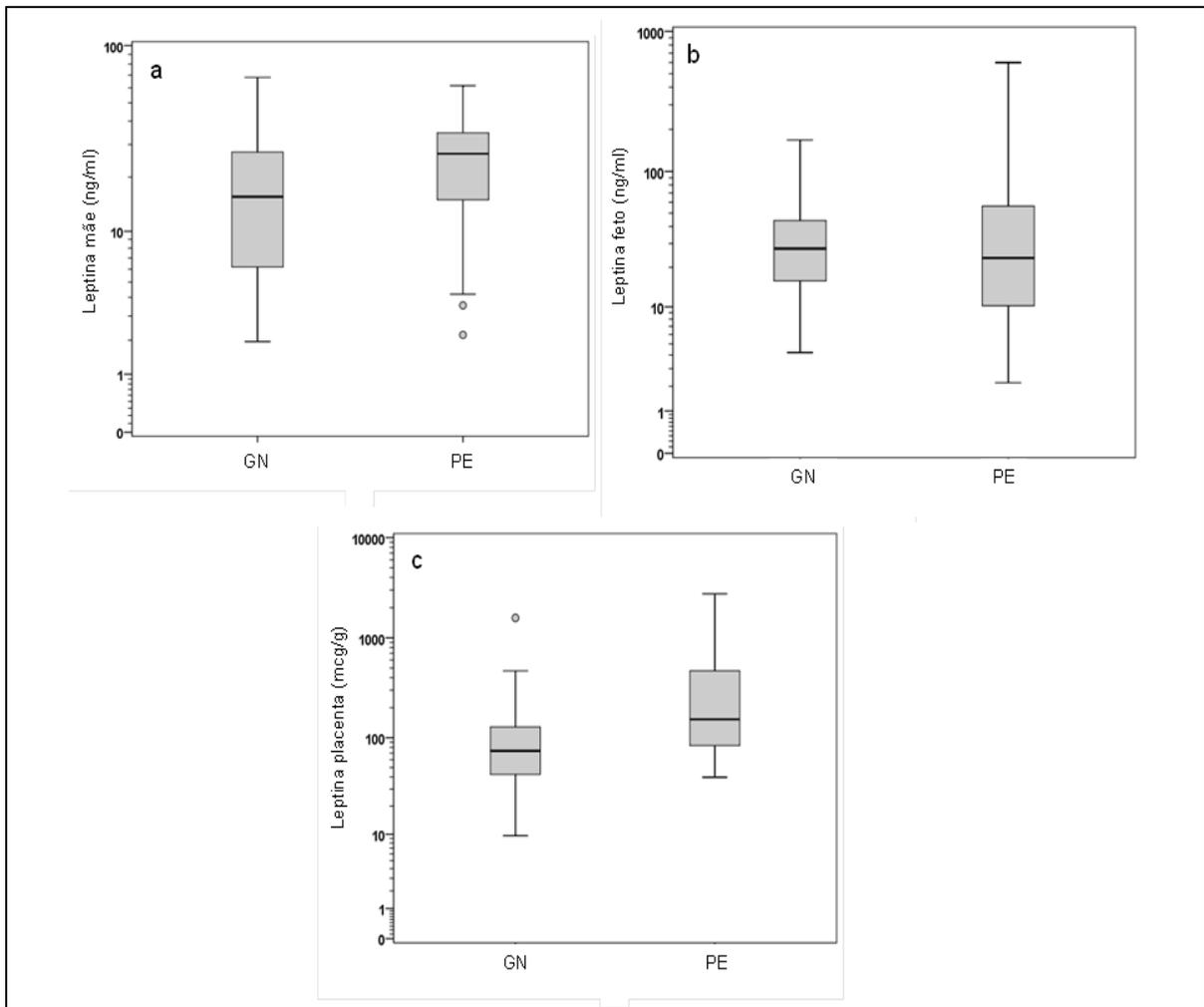
PE: pré-eclâmpsia, PEG: peso gestante parto, IMC: índice de massa corporal, IGP: idade gestacional parto, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, PRN: peso recém-nascido, IG: idade gestacional, PIG: pequeno para idade gestacional, PP: peso placenta

Os grupos não foram diferentes com relação a idade materna, tipo racial, tabagismo, paridade e peso da gestante no parto e IMC do início da gestação e final. Entretanto quando a variação do IMC entre o início e final da gestação foi calculada, as pacientes PE apresentaram maior variação. Gestantes do grupo PE apresentaram idade gestacional menor que o grupo controle, sendo a via de parto vaginal significativamente maior no grupo controle. Ambas, pressão arterial sistólica e diastólica no grupo PE foram significativamente maiores que as controles.

O peso do recém-nascido no grupo PE foi menor, assim como o índice de Apgar do RN nos primeiro e quinto minuto.

Os resultados da análise de leptina em sangue materno, cordão umbilical e tecido placentário estão plotados logo abaixo na Figura 1.

Figura 1 - Gráficos de *boxplot* representando, em escala logarítmica, os valores de leptina nas gestantes normotensas versus gestantes com pré-eclâmpsia no plasma materno ($p=0,002$), no plasma do feto ($p=0,607$) e na placenta ($p<0,001$).



Os valores de leptina na mãe e na placenta do grupo PE quando comparados ao GN mostraram diferença significativa, com $p=0,002$ e $p<0,001$ respectivamente. No feto, como mostra a Figura 1, os níveis de leptina não foram diferentes. Após o ajuste para idade materna, IMC e idade gestacional, as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos mantiveram-se na mãe e na placenta .

As Tabelas 2 e 3 mostram as médias geométricas de leptina encontrados no nosso estudo, antes e após ajuste.

Tabela 2 - Médias geométricas dos níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta das pacientes normotensas e pré-eclâmpticas - não ajustadas.

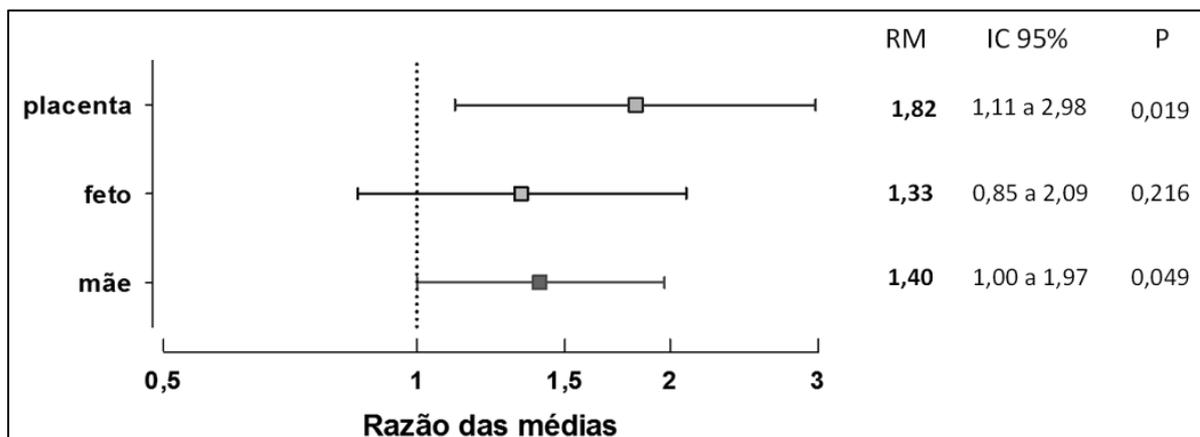
	Plasma mãe (ng/mL)	Plasma cordão umbilical (ng/mL)	Placenta (mg/g)
PE	21,97	22,53	225,73
Controle	13,10	25,27	73,65

Tabela 3 - Médias geométricas dos níveis de leptina no plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta das pacientes normotensas e pré- eclâmpticas - ajustadas para idade materna, IMC e idade gestacional.

	Plasma mãe (ng/mL)	Plasma cordão umbilical (ng/mL)	Placenta (mg/g)
PE	19,59	29,38	163,31
Controle	13,96	22,08	89,95

A razão das médias geométricas entre os grupos PE e controle após ajuste para idade materna, idade gestacional e IMC foi no plasma materno ($rm=1,40$; IC 95%: 1,00 - 1,97, $p=0,049$), no plasma do cordão umbilical ($rm=1,33$; IC 95%: 0,85-2,09, $p=0,216$) e na placenta ($rm=1,82$; IC 95%: 1,11 – 2,98, $p=0,019$) (Figura 2).

Figura 2 - Gráfico de floresta (*Forest Plot*) representando a razão das médias geométricas e seus respectivos intervalos de confiança para a comparação das gestantes normotensas versus gestantes com pré-eclâmpsia, para os níveis de leptina no plasma materno, plasma cordão umbilical e placenta.



RM: razão das médias geométricas obtida em modelo de análise de covariância ajustado para idade materna, idade gestacional e índice de massa corporal. IC: intervalo de confiança, p: significância estatística.

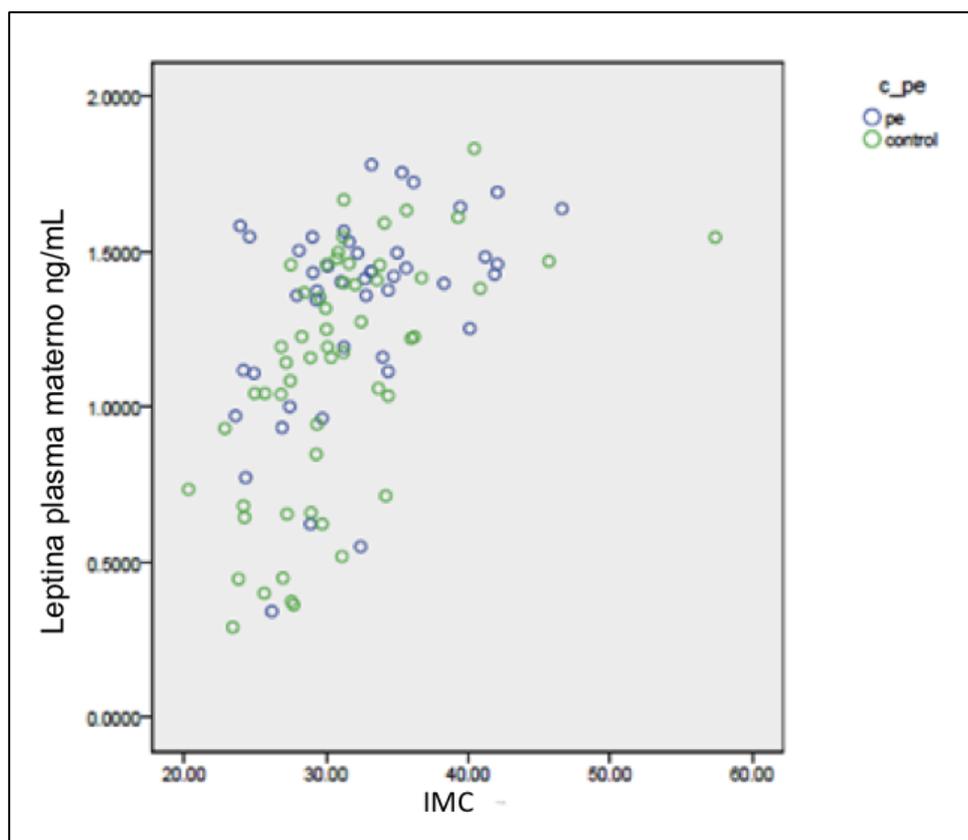
Quando o grupo PE é categorizado em *a termo* (≥ 37 semanas) e *pré-termo* (<37 semanas) e os dados são comparados com o grupo controle, a dosagem de leptina no tecido placentário mostra-se estatisticamente maior, tanto no grupo *a termo* quanto no *pré-termo* (150,66 mg/g no PE e 84,72 mg/g controle e 251,19 mg/g no PE e 84,72 mg/g no controle respectivamente, $p=0,038$).

Quando o grupo PE é dividido em relação a PAS ponto de corte 160 mmHg, observa-se que os valores de leptina no feto estão aumentados em relação ao controle quando os níveis de PAS estão inferiores ao ponto de corte (PE 37,07 ng/mL; controle 22,23 ng/mL, $p=0,041$).

Constatou-se, através de correlação de Pearson, que os níveis maternos de leptina variam com relativa semelhança às variações do IMC no final da gestação (controle $r=0,57$, $p<0,001$; PE $r=0,45$, $p=0,002$).

Na Figura 3 visualizamos a correlação supracitada:

Figura 3 - Correlação dos níveis maternos de leptina com IMC.



Os níveis de leptina no cordão umbilical do feto correlacionaram-se positivamente com peso do RN (controle $r=0,405$ $p=0,002$, PE $r=0,618$ $p<0,001$). No feto também foi detectado correlação positiva com peso da placenta nos dois grupos (controle $r=0,401$, $p=0,002$; PE $r=0,477$, $p=0,001$). No grupo PE foi encontrada associação entre níveis de leptina na veia do cordão umbilical e idade gestacional do parto ($r=0,55$, $p<0,001$).

Na placenta houve correlação positiva da leptina com níveis maternos no grupo de normotensas (controle $r=0,344$, $p=0,021$; PE $r=0,202$, $p=0,174$). Correlação inversa significativa foi detectada no grupo PE entre os níveis placentários de leptina e o peso do RN ($r=-0,45$, $p<0,001$) e idade gestacional no parto com leptina ($r=-0,44$, $p=0,001$).

O Anexo F apresenta o artigo submetido para publicação e o Anexo G mostra o comprovante de submissão ao periódico.

7 DISCUSSÃO

Níveis muito aumentados de leptina no tecido placentário e plasma materno de gestantes com pré-eclâmpsia são resultados que podem contribuir para o entendimento da fisiopatogenia e/ou tratamento desta patologia. Estes resultados tornam-se ainda mais atraentes quando é constatado que, simultaneamente, no plasma fetal estes níveis não diferem entre gestantes acometidas e controles. Neste sentido, tanto o desenho experimental quanto os resultados, tornam o presente estudo inédito, contribuindo com dados relevantes para o entendimento da pré-eclâmpsia. A dosagem de leptina alterada na pré-eclâmpsia têm sido descrita, tanto no plasma materno (43,44,45,31,46,40,47,48), quanto na placenta (35,49,37), assim como correlacionando com gravidade (50,48,26,51). Foi constatado também que seus níveis aumentam progressivamente até o final do segundo trimestre, permanecendo inalterados até o termo (52,53). Na PE o aumento em sua produção inicia no primeiro trimestre e permanece em elevação até o parto (31,43,54). Assim, hiperleptinemia na pré-eclâmpsia não é uma constatação recente e única, entretanto sua magnitude no plasma materno e placenta diferem entre os estudos, assim como dos resultados aqui encontrados. Mise (35), Grosfeld (55) e Lepercq (56) têm sugerido que a hiperleptinemia na pre-eclâmpsia resulta da produção exacerbada desta citocina inflamatória corroborando com a teoria da hipóxia-hipoperfusão placentária.

A análise da gravidade da PE, referenciada pela PAS maior 160mmHg e/ou proteinúria maior 2g realizada em nosso estudo, não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos, como sugerido por alguns estudos em que os níveis de leptina na PE grave eram significativamente maiores, permitindo aos autores estabelecer, até mesmo, um ponto de corte para predição de gravidade (48, 26,51). Vale referir que a casuística com pré-eclâmpsia grave na nossa amostra foi baixa, podendo interferir nos resultados encontrados.

Na placenta, encontramos níveis de leptina bastante elevados tanto no grupo PE quanto no controle, sendo que o nível na PE é praticamente o dobro do encontrado na gestante normotensa. Dividindo o grupo PE em *a termo* e *pré-termo*, constata-se que a diferença entre os grupos PE e controle permanece. Alguns estudos analisaram a expressão placentária de leptina em pré-eclâmplicas e observaram que sua expressão está aumentada bem como seus receptores (37,57).

Esta elevação na expressão deve ser resultante das alterações circulatórias da placenta e hipóxia que levam a maior produção de citocinas inflamatórias dentre elas a leptina. Já em relação aos receptores de leptina que supostamente poderiam estar hiporregulados, Li e cols em 2004 (37) encontraram um aumento na PE de uma isoforma solúvel destes receptores que poderia estar envolvida por exemplo na regulação da invasão trofoblástica, explicando porquê na pré-eclâmpsia esse mecanismo de invasão é alterado e patológico (57,58,59). Quanto às correlações realizadas com a leptina placentária, encontramos associação entre os níveis de leptina na mãe e placenta em pacientes normotensas, já nas pré-eclâmpticas curiosamente o mesmo não ocorre, provavelmente devido ao aumento exacerbado de sua expressão e produção placentária.

Revisando a literatura poucos são os trabalhos que quantificam a leptina no tecido placentário, nosso estudo evidenciou que na placenta, os níveis de leptina são extremamente elevados principalmente na pré-eclâmpsia, e a relação com os valores encontrados na gestante e no cordão umbilical indica que a leptina exerça papel importante na fisiopatologia da doença, sustentando a proposta de que esta citocina possa ser um importante biomarcador.

No presente estudo constatou-se correlação direta entre IMC e leptina plasmática nos dois grupos. Dados concordantes com os descritos na literatura, pois quanto maior o percentual de gordura corporal na gestante maiores serão os níveis de leptina. (26,27,34,60,61). A análise de leptina fetal pelo sangue do cordão umbilical não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos, verificou-se apenas uma tendência de elevação na PE sugerindo um estado de proteção do feto em relação as interações materno-placentárias, conforme também proposto por McCarthy e colaboradores (62). Odegard e cols, no entanto, mostraram aumento significativo da leptina fetal em pacientes com PE numa amostra de 256 pacientes pré-eclâmpticas e 607 controles (63). Achados semelhantes também foram publicados por Vitoratos em 2001 (44).

Correlação direta entre os pesos do feto e da placenta e os valores de leptina do cordão umbilical é um achado comum deste estudo para com os relatos da literatura (62,64,65,66,67). Tem sido sugerido que a massa de adipócitos fetais e o gasto energético basal fetal contribuam consideravelmente com a produção da leptina circulante verificada no sangue do cordão. Assim, sugere-se que os níveis de

leptina produzidos pelo feto contribuam para a sinalização de maturidade pulmonar, que na pré-eclâmpsia não se altera como estratégia de ganho de peso pelo feto.

Vale lembrar que no presente estudo os valores absolutos das medidas de leptina foram transformados em logaritmo para normalizar a distribuição, uma vez que o desvio padrão é muito alto. Deste modo testes paramétricos puderam ser aplicados. Se a transformação não fosse realizada, os valores seriam apresentados por mediana e comparados por testes não-paramétricos e a magnitude da diferença seria muito maior, não permitindo ajustes para variáveis que pudessem interferir nos valores encontrados. A transformação minimizou diferenças, assim, quando comparamos nossos resultados com os de outros autores que não transformaram seus resultados, deve-se pensar que as diferenças entre níveis de leptina em controles e PE são maiores ainda, o que por mediana apareceria naturalmente.

O desenho experimental do presente estudo permite que os resultados contribuam significativamente com o entendimento sobre a participação da leptina na pré-eclâmpsia. A coleta de plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta de uma mesma gestante confirmam que evidências propostas por achados com amostras isolados possam ser consideradas além do espectro estatístico e, sim como evidência biológica pois ocorre na mesma gestante. Os dados parecem confirmar que a placenta é o principal fator desencadeador de hiperleptinemia e o feto não participa dessa interação tanto na gestação normal quanto na pré-eclâmpsia. A leptina, por ser uma citocina inflamatória, participa da exacerbada cascata inflamatória desencadeada na pré-eclâmpsia. Nossos dados, tomados em conjunto com a literatura, sugerem que a proteção do feto das interações materno-placentárias, podem contribuir positivamente para a manutenção da gestação pré-eclâmpsica com vistas ao aumento de peso do nascimento.

8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- os níveis de leptina estão mais elevados no plasma materno e placenta de gestantes com PE quando comparados com os de gestantes normotensas; não ocorrendo diferença entre os níveis no cordão umbilical;
- a gravidade da PE não está associada aos níveis de leptina;
- os níveis de leptina materno variam proporcionalmente ao IMC; no cordão umbilical correlacionam-se diretamente com o peso de recém-nascido, peso da placenta e idade gestacional do parto; na placenta a relação da leptina e o peso de recém-nascido e idade gestacional do parto é inversa.

REFERÊNCIAS

1. Gifford RW, August PA, Cunningham G, et al. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000; 183: 1-2.
2. Steegers EAP, Dadelszen P V, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. Published online July 1, 2010 DOI: 10.1016/S0140-6736: (10) 60279-6.
3. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 1066–74.
4. Garovic VD. Hypertension in Pregnancy: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2000; 75:1071-1076.
5. World Health Organization. World Health Report 2005 – make every mother and child count. 2005.disponível em:
<http://www.who.int/whr/2005/en/index.html>.
6. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 2013; 170: 1-7.
7. Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Mattos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertension in Pregnancy* 2001; 20: 269-281.
8. Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, Dadelszen PV. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada* 2008; 30: 3.
9. Akinkugbe A, Gant NF, Kinkaid-Smith P, et al. The hipertensive disorders of pregnancy. Report of a WHO Study Group. World Health Organization, Geneva 1987.
10. Davey DA, Macgillivray I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Clinical and Experimental Hypertension* 1986; 5(1):97-133.
11. Lowe SA, Brown MA, Dekker GA, Gatt S, Mclintock CK, McMahan LP, Mangos G, Moore MP, Muller P, Paech M and Walters B. Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009; 49: 242–246.
12. ACOG Practice Bulletin. Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. *Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists* 2002; número 33.
13. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia, Nobre F, Brandão A, Rodrigues CIS,

- Consolin-Colombo F, Plavnik FL, Malachias MBM, Kohlmann Jr O, Amodeo C, Poli-de-Figueiredo CE, Ferreira Filho S e demais colaboradores. VI Diretriz Brasileira de Hipertensão DBH VI. Revista Brasileira de Hipertensão 2010; 17:1-63.
14. Pipkin FB. Risk factors of preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344:925-926.
 15. Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochemical Society Transactions* 2011; 39: 1619-1627.
 16. Roberts JM, Cooper. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53-56.
 17. Redman CWG, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009; 23(supA): 38-42.
 18. Tannetta D, Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? *Current Hypertension Reports* 2013; 15: 590-599.
 19. Dekker GA, Sibai BM. Primary, secondary and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 209-215.
 20. Roberts JM. Objective evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia. *American Journal of Kidney Disease* 1999; 33(5): 992-997.
 21. Kincaid-Smith PS, Fairley KF. Morphological changes in preeclampsia. In: Kincaid-Smith, P. S. & Fairley, K. F. *The kidney and hypertension in pregnancy* 1993; p25.
 22. Hayman R, Brockelsby J, Kenny L, Baker P. Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *Journal of the Society for Gynecology Investigation* 1999; 6(1): 3-10.
 23. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 179(5): 1359-1375.
 24. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999; 180: 499-506.
 25. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-742.
 26. Hendler I, Blackwell SC, Mehta SH, Whitty JE, Russell E, Sorokin Y, Cotton DB. The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005; 193: 979-983.
 27. Highman T, Friedman J, Huston L, Wong W, Catalano P. Longitudinal changes in maternal leptin serum concentrations, body composition and resting

- metabolic rate in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 178:1010-5.
28. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual Review of Physiology* 2000; 62: 413-437.
 29. Jequier E. Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 967: 379-388.
 30. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Kakui K, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fuji S. Possible role of placental leptina in pregnancy. *Endocrine* 2002; 19 (1): 65-71.
 31. Samolis S, Papastefanou I, Panagopoulos P, Galazios G, Kouskoukis A, Maroulis G. Relation between first trimester maternal serum leptina levels and body mass index in normotensive and pre-eclamptic pregnancies – Role of leptina as a marker of pre-eclampsia: A prospective case-control study. *Gynecological Endocrinology* 2010; 26(5): 338-343.
 32. Yura S, Sagawa N, Ogawa Y et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3609-3614.
 33. Bravo PE, Morse S, Borne DM, Aguilar EA, Reisin E. Leptin and hypertension in obesity. *Vascular Health and Risk Management* 2006; 2(2): 163-169.
 34. Prolo P, Wong ML, Licinio J. Leptin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1998; 30:1285-1290.
 35. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K: Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism* 1998; 83:3225-3229.
 36. Dotsch J, Nusken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression. In human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism* 1999; 84: 2755-2758.
 37. Li RH, Poon SC, Yu MY, Wong YF. Expression of placental leptina and receptors in preeclampsia. *International Journal Gynecologic Pathology* 2004; 23: 378-385.
 38. Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA. Differential placental gene expression in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2008; 199: 566, 1-11.
 39. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, Acharya G. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 2009; 30: 424-433.
 40. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karadi I, Prohaszka Z, Rigo J. Serum leptina levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion

molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011; 9: 1-9.

41. Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. *Revista Medica de Chile* 1997; 125: 1429-36.
42. Brasil, Ministério da Saúde. Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada – Manual técnico. Brasília; 2005.
43. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, Johnson MR. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Human Reproduction* 2000; 15:2033-6.
44. Vitoratos N, Chrystodoulacos G, Kouskouni E, Salamalekis E, Creatsas G. Alterations of maternal and fetal leptin concentrations in hypertensive disorders of pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2001; 96: 59-62.
45. Ning Y, Willians MA, Muy-Rivera M, Leisenring WM, Luthy DA. Relationship of maternal plasma leptin and risk of pre-eclampsia: a prospective study. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2004; 15: 186-192.
46. Dalamaga M, Srinivas SK, Elovitz MA, Chamberland J, Mantzoros CS. Serum adiponectin and leptin in relation to risk for preeclampsia: results from a large case-control study. *Metabolism* 2011; 60: 1539–44.
47. Zeron HM, Veronica JGS, Pamela MND, Adriana GA, Jonnathan GSB, Victoria DG, Carolina EB, Edgar DG. Hyperleptinemia as a prognostic factor for preeclampsia: a cohort study. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2012; 55(4): 165–171.
48. Shahat AM, Ahmed AB, Ahmed MR, Mohamed HS. Maternal serum leptin as a marker of preeclampsia. *Archives Gynecology and Obstetrics* 2013; 288:1317–1322.
49. Henson, MC, Castracane, VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biology of Reproduction* 2006; 74: 218–229.
50. Martínez-Abundis E, González-Ortiz M, Pascoe-González S. Serum leptin levels and the severity of preeclampsia. *Archives Gynecology and Obstetrics* 2000; 264:71-73.
51. Ouyang Y, Chen H, Chen H. Reduced plasma adiponectin and elevated leptin in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2007; 98: 110–4.
52. Senaris R, Caballero TG, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997; 138: 4501-4504.

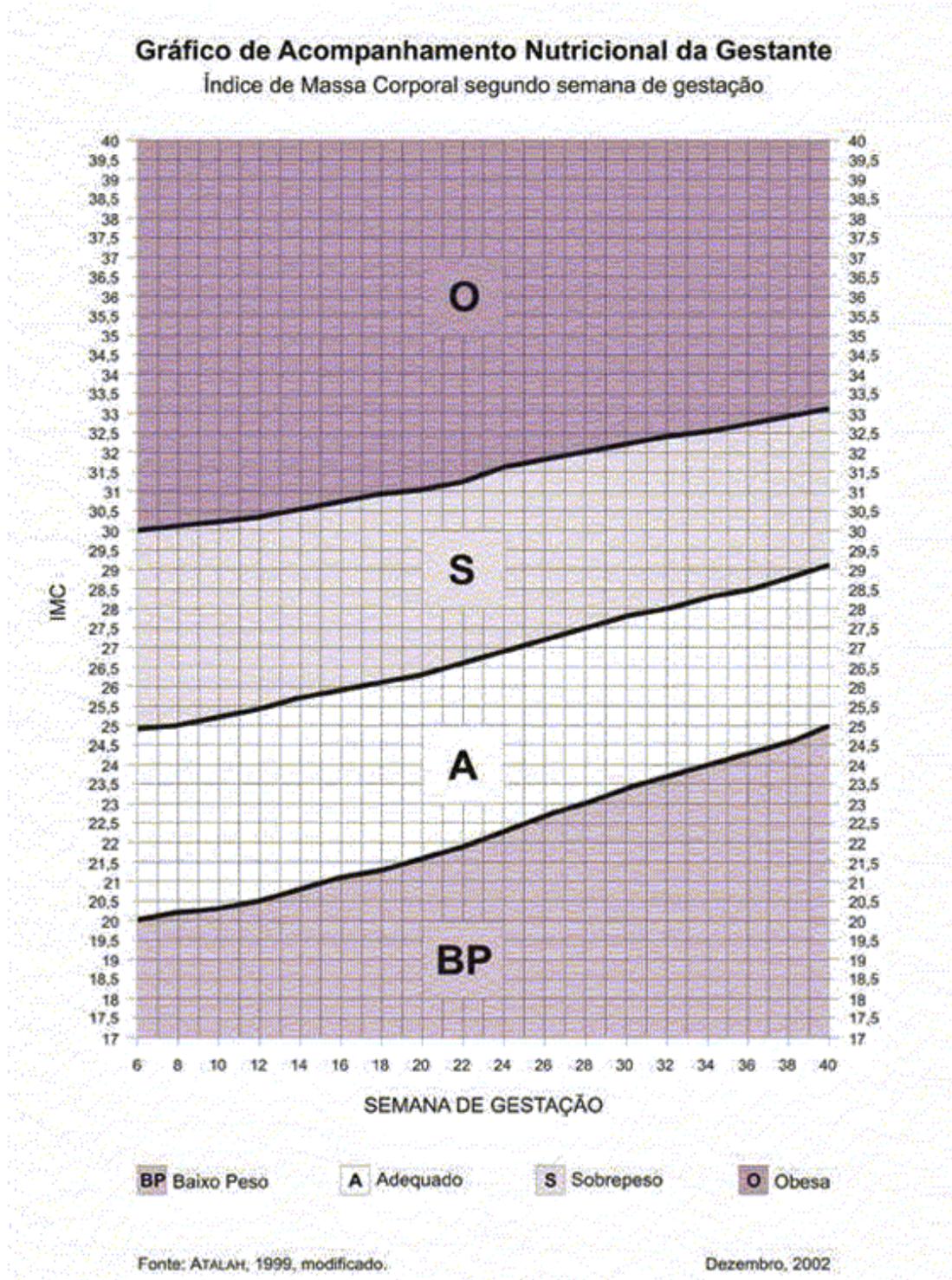
53. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine* 1997; 3:1029-1033.
54. Papastefanou I, Samolis S, Panagopoulos P, Tagia M, Bale C, Kouskoukis A, Galazios G: Correlation between maternal first trimester plasma leptin levels and birth weight among normotensive and preeclamptic women. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2010; 23:1435-1443.
55. Grosfeld A, Turban S, Andre J, Cauzac M, Challier JC, Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M: Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. *FEBS Lett* 2001, 502:122-126.
56. Lepercq J, Guerre-Millo M, Andre J, Cauzac M, Hauguel-de Mouzon S: Leptin: a potential marker of placental insufficiency. *Gynecology Obstetrics Investigation* 2003; 55:151-155.
57. Spranger RM, Hartner A, Schild RL, Stuppy A, Knerr I, Rascher W, Dotsch J. Leptin expression in primary trophoblast cells in response to incubation with the serum of preeclamptic woman. *Hypertension in Pregnancy* 2008; 27:267-277.
58. Challier J, Galtier M, Bintein T, et al. Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2003; 24:92-9.
59. Laivuori, H., Gallaher, M.J., Collura, L. et al. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction* 2006; 12, 551–556.
60. Bartha JL, Carmona RR, Llompert ME, Delgado RC. The relationships between leptin and inflammatory cytokines in women with pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001; 108:1272-1276.
61. Tamura, T., Goldenberg, R.L., Johnston, K.E, Cliver SP. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstetrics and Gynecology* 1998; 91, 389–395.
62. McCarthy JF, Misra DN, Roberts JM. Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999; 180:731-6.
63. Odegard RA, Vatten LJ, MD, Nilsen ST, MD, Salvesen KA, MD, Austgulen R. Umbilical cord plasma leptin is increased in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002; 186: 427-432.
64. Mellati AA, Mazloomzadeh S, Anjomshoaa A, Alipour M, Karimi F, Mazloomi S, Kazemi SAN. Multiple Correlations Between Cord Blood Leptin Concentration and Indices of Neonatal Growth 2010; *Archives of Medical Research* 2010; 41: 26-32.

65. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Hsu YW, Ho SC, Chu CH. Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy term neonates: positive correlation with birth weight and neonatal adiposity. *Clinical Endocrinology* 2004; 61: 88-93.
66. Christou H, Connors JM, Ziotopoulou M, Hatzidakis V, Papathanassoglou E, Ringer SA, Mantzoros CS. Cord blood leptin and insulin-like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86:935-938.
67. Grisaru-Granovsky S, Eitan R, Algur N, Schimmel MS, Diamant YZ, Samueloff A. Maternal and umbilical cord serum leptin concentrations in small-for-gestational-age and in appropriate for gestational age neonates: A maternal, fetal, or placental contribution? *Biology of the Neonate* 2003; 84:67-72.

Anexo A - Protocolo de Coleta Padronizado– Linha de Pesquisa Hipertensão na Gestação Laboratório de Nefrologia/IPB – PUCRS (Ramal 2344)

IDENTIFICAÇÃO		ANAMNESE		
1				
2	Nome:	Data da última menstruação:	Certeza: <i>Sim Não</i>	
3	Endereço:	Idade gestacional: DUM=	ECO=	
4	Cidade:	Nº de gestações:		
5	Fone:	Nº de partos:		
6	Data da avaliação:	Nº de abortos:	<i>Provocados Espontâneos</i>	
7	Registro HSL:	HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA		
8	Nº do Lab:	Infecção urinária: <i>Não Sim: Infância Fase adulta</i>		
9	Raça: <i>branca mista negra</i>	HAS: <i>Não Sim: Idade ou IG no diagnóstico:</i>		
10	Data de nascimento:	PE prévia: <i>Não Sim</i>		
11	Idade:	DM: <i>Não Sim</i>		
12	HISTÓRIA FAMILIAR		Outras doenças:	
13	HAS: <i>Não Sim : Parentesco:</i>	Drogas em uso:		
14	EXAME LABORATORIAL		EXAMES FÍSICO	
15	Data:	Data:		
16	IG: semanas dias	IG: semanas dias		
17	Hematócrito: %	PAS: mmHg		
18	Hemoglobina: g/dL	PAD: mmHg		
19	Leucócitos totais: uL	Peso: kg		
20	Bastonados: % uL	Altura: cm		
21	Segmentados: % uL	DADOS DO PARTO		
22	Basófilos: % uL	Data:		

Anexo B – Gráfico de Acompanhamento Nutricional da Gestante



Anexo C

Ensaio

Antes de começar:

Deixar os reagentes em temperatura ambiente (20-25C) antes de iniciar o ensaio

Programar a placa por escrito: padrões [0; 0.13; 0.64; 3.2; 16; 80; 400, e 2000 pg/mL], controles 1 e 2; amostras

Padrões e controles em duplicata

Colocar a placa de filtro numa estante durante a dispensação e a incubação de reagentes, de modo que a parte inferior da placa não toque em qualquer superfície

Iniciando:	Resumo
1. adicionar 200 mcl de 1X tampão de lavagem em cada poço. Vedar e agitar no agitador de placa por 10 minutos a 20-25°C	200mcl tampão de lavagem (1X) p/ poço e agitar p/ 10 min em agitador de placa
2. Remova o tampão de lavagem usando vácuo -não inverter a placa- . Retire o excesso de tampão de lavagem do fundo da placa com papel toalha	Remover o tampão à vacuo, secar o excesso com papel toalha
3. Sonicar o tubo com esferas por 30 segundos, e após vortex por 1 minuto. Adicionar 25 mcl do mixer ou premixer de esferas em cada poço. (nota: Durante a adição das esferas, agite o tubo intermitentemente para evitar a sedimentação.	Adicionar 25 mcl da sol de esferas em cada poço
4. Remova o líquido usando vácuo -não inverter a placa- . Retire o excesso de tampão de lavagem do fundo da placa com papel toalha	Remover o líquido à vacuo, secar o excesso com papel toalha
5. Adicionar 50 mcl de cada padrão e controle nos poços apropriados. O tampão de ensaio deve ser usado para o 0 pg/mL (branco)	Adicionar 50 mcl de padrão ou controle nos pocinhos
6. Adicionar 50 mcl do tampão de ensaio nos poços das amostras	Adicionar 50 mcl de tampão de ensaio no branco e poços das amostras
7. Adicionar 50mcl da solução matriz/ou sol para tecido?? no poços branco, padrão e controle. Ao fazer ensaio de soro ou plasma, usar o soro matriz que vem no kit. Quando fizer ensaio com tecido verificar qual sol deverá ser utilizada???	Adicionar 50mcl sol matriz no branco, padrões e controles

8. Adicionar 50 mcl de amostra nos poços apropriados. Antes de adicionar aos poços, as amostras devem ser centrifugadas para remover qualquer precipitado ou proteínas desnaturadas que se formam durante o armazenamento e manuseio	Adicionar 50mcl de amostra nos poços apropriados
9. Selar a placa com o papel selador, e com a tampa. Enrolar a faixa de borracha ao redor do segurador da placa, placa e tampa e encubar no agitador de placa por 16 a 18h a 4°C.	Incubar por 16-18h a 4°C agitando
10. Remova o fluido usando vácuo -não inverter a placa- .	Vacuo
11. Lavar a placa 2X com 200 mcl /poço de tampão de lavagem. Remover o tampão com vacuum entre cada lavagem. Retire o excesso de tampão de lavagem do fundo da placa com papel toalha	lavar 2x com 200mcl de tampão de lavagem + Vacuo
12. Adicionar 50 mcl de anticorpo de detecção por poço (obs: deixe o anticorpo de detecção aquecendo a temperatura ambiente antes da adição)	50 mcl de anticorpo de detecção p/ poço
13. Selar, cobrir com a tampa, e incubar na placa de agitação p/ 1 hora à 20-25°C. Não fazer o vacuum após a incubação.	Incubar p/ 1 hora a temperatura ambiente (NÃO FAZER VACUM)
14. Adicionar 50 mcl de estreptavidina p/ poço	50 mcl de estreptavidina
15. Selar, cobrir com a tampa e incubar em placa de agitação p/ 30 minutos a 20-25°C	Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente
16. Remova o fluido usando vácuo -não inverter a placa- .	Vácuo
17. Lavar a placa 2X com 200 mcl /poço de tampão de lavagem. Remover o tampão com vacuum entre cada lavagem. Retire o excesso de tampão de lavagem do fundo da placa	lavar 2x com 200 mcl de tampão de lavagem
18. Adicionar 100 mcl de bloqueador em cada pocinho. Ressuspender as esferas no agitador de placas por 5 minutos.	100 mcl de bloqueador p/ poço
19. Leitura da placa no luminex 100 TM, 200TM, ou HTS	Ler a placa no luminex (50mcl, 50 esferas por conjunto)
20. Salvar e analisar os dados de intensidade média de fluorescência (MFI) usando o weighted 5-parameter logistic ou método de spline curve-fitting para o cálculo da concentração de citocinas.	Analisar os dados registrados no Luminex

Anexo D - Ofício -CEP 413.859.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis de leptina em gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia

Pesquisador: Bartira Ercília Pinheiro da Costa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 12013913.5.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 413.859

Data da Relatoria: 06/09/2013

Apresentação do Projeto:

vide conclusões

Objetivo da Pesquisa:

vide conclusões

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide conclusões

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide conclusões

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide conclusões

Recomendações:

vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

esclarecidas as pendências. Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320--3345

Fax: (513)320--3345

E-mail: cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 413.859

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 02 de Outubro de 2013

Assinador por:
caio coelho marques
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320--3345

Fax: (513)320--3345

E-mail: cep@pucrs.br

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2012

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – VERSÃO 2012

LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA: ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL

TCLE aprovado pelo CEP em 31/05/2005 (OF N° 440/05)-CEP e aprovado pelo CONEP registro 11972

Pesquisadores Responsáveis: Bartira Ercíla Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos Otávio L d'Avila, Ivan Carlos Ferreira Antonello, João Píffero Steibel.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa:

Nome da paciente:

SOBRE A PESQUISA: A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea e pressão alta na busca do aumento do conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A idéia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO: Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e/ou urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletado amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicação durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A idéia do grupo é de acompanhar

estas mulheres, a longo prazo, com a finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:

Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Urina: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Placenta: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Cintilografia renal: ___Não solicitado___ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sensibilidade Gustativa ao Sal: ___Não solicitado___ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

*OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

MATERIAL EM ESTUDO E ARMAZENAMENTO: O material poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuros estudos. É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER DO RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem a necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____ fui informada pelo(a) _____ dos objetivos e

justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada. Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado à pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599, ou 3320 3000 - Ramais 3174, 2344 ou 3345 (Comitê de Ética em Pesquisa) para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável
CI

Investigador
CI/CRM

***EQUIPE PARTICIPANTE:** Bartira Costa, Carlos E Poli de Figueiredo, Domingos d'Avila, Ivan Antonello, João Steibel, Giovani Gadonski, Marta Hentschke, Adriana Comparsi.

Anexo F - Artigo Original

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Preeclampsia alters leptin levels in placenta tissue and maternal plasma
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Preeclampsia alters leptin levels in placenta tissue and maternal plasma
Short Title:	leptin in preeclampsia
Article Type:	Original Article
Keywords:	pregnancy induced hypertension; cytokines; placenta; pregnancy
Corresponding Author:	Bartira Ercilia Pinheiro da Costa, PhD Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Adriana Barbieri Comparsi, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Adriana Barbieri Comparsi, MD Marta Hentschke, MD, PhD Giovani Gadonski, MD, PhD Leticia Germani Paula, MD, PhD Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo, MD, PHD Bartira Ercilia Pinheiro da Costa, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Context: Preeclampsia is a pregnancy hypertensive syndrome. Leptin participates in gestational metabolism.</p> <p>Objective: To evaluate the association of leptin levels in the maternal plasma, umbilical cord plasma and placental tissue of normotensive and preeclamptic (PE) pregnant women.</p> <p>Design: Observational case-control study.</p> <p>Setting: Pregnants were selected at the Obstetrics Outpatient Clinic and Obstetrics Center of the Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), Brazil.</p> <p>Patients: 67 normal pregnant and 50 preeclamptic women.</p> <p>Main outcome measures: Leptin levels were analysed in the maternal plasma, umbilical cord plasma and placental tissue of 50 women with preeclampsia and 67 normotensive pregnant women. Plasma and placental leptin were measured using the MagPlexTH-C microspheres system.</p> <p>Results: Leptin levels were 40 times higher in the maternal plasma and 82 times higher in the placental tissue of patients with preeclampsia in comparison to the controls. The geometric means found were 19.59 ng/mL and 163.31 mg/g in the PE group, and 13.96 ng/mL and 89.95 mg/g in the normotensive group, respectively. Analysis of the umbilical cord plasma showed no significant difference between the groups. The mean ratios found after adjustment for maternal age, BMI and gestational age were: maternal plasma (MR=1.40; 95% CI: 1.00 - 1.97, p=0.049), fetal plasma (MR=1.33; 95% CI: 0.85- 2.09, p=0.216) and placenta (MR=1.82; 95% CI: 1.11 - 2.98, p=0.019).</p> <p>Conclusions: Leptin values found in patients with preeclampsia are significantly increased in maternal plasma and placental tissue in comparison to the control. The extremely high levels in the placenta are believed to have resulted from studies that specifically aimed to evaluate biomarkers.</p>

Suggested Reviewers:	<p>Hiten Mistry, PhD king's college hiten.mistry@kcl.ac.uk He is an expert in hypertension in pregnancy.</p> <p>Matias Vieira King's College matias.vieira@kcl.ac.uk He is a physician and has a great expertise in preeclampsia</p> <p>Birdie Babbette Lamarca University of mississippi medical center bblamarca@umc.edu She has a great expertise in this area.</p>
Opposed Reviewers:	



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA - HOSPITAL SÃO LUCAS - PUCRS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEFROLOGIA
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS - LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA

To *Editor-in-Chief*

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

January 17, 2014

Dear Editor

Please find enclosed the manuscript entitled “Preeclampsia alters leptina levels in placenta tissue and maternal plasma” by Adriana Barbieri Comparsi, Marta Ribeiro Hentschke, Giovani Gadonski, Leticia Germani Paula, Carlos E. Poli-de-Figueiredo, Bartira E. Pinheiro da Costa which we would like to submit for publication in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.

The present work has been developed as a master degree thesis at the 'Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde/Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil'.

The study evaluates the levels of leptin in maternal and fetal plasma and human placenta in patients diagnosed with preeclampsia, compared to normotensive controls, in 117 pregnant women. Leptin levels in maternal plasma and placenta were significantly higher in preeclampsia. We conclude that leptin might be involved in the pathogenesis of gestational disturb, suggesting it molecule as a biomarker of the disease.

Regarding authorship: Adriana Barbieri Comparsi performed the research; Bartira E. Pinheiro da Costa, Carlos E. Poli-de-Figueiredo and Leticia G Paula designed the research study; Marta R Hentschke contributed to the samples collection and assay. All authors analysed the data and wrote the paper.

The study has been approved by the University Ethics Committee.

Conflict of interests/disclosure: None conflict was performed for any author.

The research group is supported Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; National Council for Scientific and Technological Development), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS; Foundation for the Support of Research in the State of Rio Grande do Sul) and



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA - HOSPITAL SÃO LUCAS - PUCRS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEFROLOGIA
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS - LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Foundation). Poli-de-Figueiredo is a CNPq researcher.

We thank you for your consideration of our submission and look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us at any time if you need additional information regarding the enclosed materials.

Yours sincerely,

Bartira E. Pinheiro da Costa
Hospital São Lucas da PUCRS – 2º andar/IPB
Avenida Ipiranga, 6690
90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil
Fax/Phone: +55-51-3320-3000 Ramal 2344
E-mail: bart@pucrs.br

Manuscript (MUST INCLUDE TITLE PAGE AND ABSTRACT)

[Click here to download Manuscript \(MUST INCLUDE TITLE PAGE AND ABSTRACT\): renamed_5904e.docx](#)

1 **ORIGINAL ARTICLE**

2 **Title:** Preeclampsia alters leptin levels in placenta tissue and maternal plasma.

3 **Authors:** Adriana B Comparsi¹, Marta Hentschke¹, Giovani Gadonski¹, Leticia

4 Germani Paula¹, Carlos E. Poli-de-Figueiredo¹, Bartira E. Pinheiro da Costa¹.

5 ¹ Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), Institute

6 of Biomedical Research - São Lucas Hospital /School of Medicine, Pontifical

7 Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

8 **Abbreviated title:** Leptin in preeclampsia

9 **Keywords:** pregnancy induced hypertension; cytokines; placenta; pregnancy.

10 **Word count:** 2,622

11 **Corresponding author:**

12 Bartira E. Pinheiro da Costa

13 Laboratório de Nefrologia – IPB – Hospital São Lucas da PUCRS

14 Av. Ipiranga, 6690

15 Porto Alegre, RS, Brazil - ZIP code: 90610-000

16 Tel Fax. ++ 55 51 33367700

17 E-mail: adrianacomparsi@hotmail.com

18 **Grants:** Grant support was received from the Conselho Nacional de

19 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; National Council for Scientific

20 and Technological Development), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande

21 do Sul (FAPERGS; Foundation for the Support of Research in the State of Rio

22 Grande do Sul) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

23 Superior (CAPES; Coordination for the Improvement of Higher Education

24 Personnel Foundation). Poli-de-Figueiredo is a CNPq researcher.

25 **Authors have NO conflict of interests.**

26 **Abstract**

27 Context: Preeclampsia is a pregnancy hypertensive syndrome. Leptin
28 participates in gestational metabolism.

29 Objective: To evaluate the association of leptin levels in the maternal plasma,
30 umbilical cord plasma and placental tissue of normotensive and preeclamptic
31 (PE) pregnant women.

32 Design: Observational case-control study.

33 Setting: Pregnants were selected at the Obstetrics Outpatient Clinic and
34 Obstetrics Center of the Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio
35 Grande do Sul (HSL/PUCRS), Brazil.

36 Patients: 67 normal pregnant and 50 preeclamptic women.

37 Main outcome measures: Leptin levels were analysed in the maternal plasma,
38 umbilical cord plasma and placental tissue of 50 women with preeclampsia and
39 67 normotensive pregnant women. Plasma and placental leptin were measured
40 using the MagPlexTH-C microspheres system.

41 Results: Leptin levels were 40 times higher in the maternal plasma and 82 times
42 higher in the placental tissue of patients with preeclampsia in comparison to the
43 controls. The geometric means found were 19.59 ng/mL and 163.31 mg/g in the
44 PE group, and 13.96 ng/mL and 89.95 mg/g in the normotensive group,
45 respectively. Analysis of the umbilical cord plasma showed no significant
46 difference between the groups. The mean ratios found after adjustment for
47 maternal age, BMI and gestational age were: maternal plasma (MR=1.40; 95% CI:
48 1.00 - 1.97, p=0.049), fetal plasma (MR=1.33; 95% CI: 0.85- 2.09, p=0.216) and
49 placenta (MR=1.82; 95% CI: 1.11 - 2.98, p=0.019).

50 Conclusions: Leptin values found in patients with preeclampsia are significantly
51 increased in maternal plasma and placental tissue in comparison to the control.
52 The extremely high levels in the placenta are believed to have resulted from
53 studies that specifically aimed to evaluate biomarkers.
54

55 **Introduction**

56 Preeclampsia (PE) is a syndrome specific to pregnancy characterized by
57 hypertension (systolic blood pressure (SBP) \geq 140 mmHg and/or diastolic blood
58 pressure (DBP) \geq 90 mmHg) and proteinuria (300 mg or more of protein in a 24-
59 hour urine sample) developing from 20 weeks gestation (1). It is the leading
60 cause of maternal and fetal morbidity and mortality worldwide, especially in
61 developing countries, affecting 3% to 5% of pregnancies (2,3).

62 The etiology and pathogenesis of preeclampsia is still not fully
63 understood, despite numerous studies. Some aspects such as placental ischemia,
64 insulin resistance, oxidative stress, decreased antioxidant capacity, hormonal
65 alterations, poor immune adaptation, endothelial dysfunction and genetic load
66 have all been investigated (4, 5).

67 Inflammatory cytokines have been a target of major investigation as it has
68 been suggested that the hypoxic placenta releases factors that activate maternal
69 endothelial dysfunction (6), among which, leptin seems to participate (7, 8).

70 Leptin, discovered in 1994 by Zhang et al. (9), is a hormone expressed by
71 the *ob* gene, particularly in adipose tissue. It is considered a proinflammatory
72 cytokine belonging to the class I cytokine family and has a similar structure to
73 interleukin-6 (10). Its main function is to promote metabolic homeostasis,
74 namely, the balance between energy consumption and generation, in addition to
75 exerting a role in neuroendocrine regulation and the reproductive system (11,
76 12). Circulating leptin is also directly related to total body fat (13, 14).

77 Studies have demonstrated that 95% of placental production of leptin is
78 released into the maternal circulation and 5% into fetal circulation; the same has
79 also been observed in cases of PE (8, 15, 16) suggesting leptin as a possible

80 biomarker for PE severity, or even implying its involvement in disease
81 pathogenesis.

82 In the present study, leptin levels were analyzed in the maternal plasma,
83 umbilical cord plasma and placental tissue of normotensive pregnant women
84 and those with PE, comparing the clinical and laboratory characteristics
85 involved.

86

87 **Materials and methods**

88 **Sample**

89 An observational case-control study was conducted involving 67 normal
90 pregnant and 50 preeclamptic women, suggested by statistical calculation
91 assuming an α error of 0.05 and an 80% statistical power. The participants were
92 selected at the Obstetrics Outpatient Clinic and Obstetrics Center of the *Hospital*
93 *São Lucas*, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS),
94 Brazil. The inclusion criteria were: women more than 20 weeks pregnant, single
95 fetus, with or without a PE diagnosis, no history of hepatopathy, nephropathy,
96 thyroidopathy, active infections, multiple pregnancy and/or a lack of database
97 information. Normotensive pregnant women with proteinuria $\geq 1+$ for urinalysis
98 did not participate in the research. The project was approved by the Research
99 Ethics Committee of the HSL/PUCRS (document # 413.859) and all patients
100 agreed to participate in the study by signing an informed consent form.

101 The operational definition of PE was based on criteria suggested by the
102 NHBPEPWG (1) and the VI Brazilian Hypertension Guidelines 2010 (17),
103 defining a diagnosis of PE as being hypertension (SBP ≥ 140 and/or DBP ≥ 90

104 mmHg) accompanied by proteinuria (≥ 300 mg/24h and/or a protein: creatinine
105 ratio ≥ 0.3 in a sample) after twenty weeks gestation.

106 PE was classified as severe with a SBP ≥ 160 mmHg and/or DBP
107 ≥ 110 mmHg, associated with proteinuria levels ≥ 2 g. Pregnant women with
108 eclampsia and HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count)
109 syndrome were included in the study. Body Mass Index (BMI) was calculated for
110 the pregnant women and their results classified according to the gestational age
111 correction table of Atalah (18).

112 **Collections**

113 An average of 4 mL maternal blood was collected from each patient
114 before giving birth, using a Vacutainer® tube containing
115 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The samples were processed in the
116 Nephrology Laboratory, HSL/PUCRS and were centrifuged at 2000g for 10
117 minutes. The plasma was initially stored in a centrifuge 0.6 mL microtube at -
118 20°C and subsequently at -80°C until the moment of measurement. Soon after
119 delivery, 4 mL of blood was punctured from the umbilical vein and processed
120 and stored under the same conditions as the maternal plasma. Likewise, six
121 cubes of approximately 1cm were dissected immediately after delivery from the
122 maternal surface of the placenta. The procedure was performed at the center of
123 one cotyledon, located half way between the umbilical cord and the extremity of
124 the placenta. This material was stored in a 1.5 mL microtube under the same
125 conditions as the maternal and fetal plasmas.

126 A protease inhibitor cocktail (Millipore Corporation, Catalogue #20-201)
127 diluted in RIPA *Lysis Buffer* 10X was added to an aliquot part of approximately
128 0.3g of placental tissue, at a concentration of 3mL/g of tissue. Subsequently,

129 mechanical maceration of the placental tissue took place using a porcelain
130 mortar and pestle. The material was then transferred again to the 15 mL Falcon
131 tube and a rotation of 2000 rpm for 30s was conducted in a centrifuge
132 refrigerated at 18°C (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). The material
133 was next disintegrated in a bath sonicator (Aquasonic, Cortland, New York, USA)
134 for 10 minutes, in a bath cooled through the addition of ice. After sonication, the
135 material was transferred to a 1.5mL microtube and centrifuged at 10,000 rpm
136 for 10 minutes at 4°C (Sanyo, London, United Kingdom). The supernatant was
137 then aliquoted into 200 µl in a 0.6mL microtube (2 tubes per sample) and stored
138 at -20°C until further analysis. The protein concentration of the solution was
139 measured using a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Life Technologies,
140 Carlsbad, CA, USA) with specific analysis microtubes (Qubit Assay tubes, Eugene,
141 Oregon, USA).

142 Plasma and placenta leptin measurements were conducted using the
143 MagPlexTH-C system testing with microspheres (MAGPIX, Luminex, Austin, Texas,
144 USA) and Exponent software (xPONENT 4.2), Kit Milliplex HCVD1MAG-67K-02
145 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Testing was conducted in accordance
146 with manufacturer protocol.

147 **Statistical analysis**

148 Statistical analysis of the data was performed using the Windows
149 software *Statistical Package for Social Sciences*, version 21.0 (SPSS, 21.0).
150 Symmetric quantitative data were expressed as mean and standard deviation
151 (SD), whilst qualitative data were expressed as numbers and percentages (%).
152 Student's t-test was used to test the significant difference between the
153 symmetric quantitative variables and a chi-square test was used to compare

154 categorical variables between groups. The Mann-Whitney test was initially
155 carried out to compare the leptin values between groups, followed by
156 logarithmic transformation of the values for the Analysis of Covariance
157 (ANCOVA), adjusted for maternal and gestational age, and BMI. The geometric
158 mean, mean ratios (MR) and 95% confidence intervals were calculated, as well
159 as the Pearson correlation coefficients. A p value <0.05 was considered
160 statistically significant for all the performed analyses.

161

162 **Results**

163 Demographic, clinical and perinatal data are described in Table 1. The
164 groups did not differ with respect to maternal age and race, smoking, parity and
165 weight of the pregnant women at delivery, as well as in respect to BMI at the
166 beginning or at the end of pregnancy. However, when the BMI variation between
167 the beginning and end of pregnancy was calculated, the PE patients presented
168 greater variation. The pregnant women in the PE group presented a lower
169 gestational age than those in the control group, with vaginal deliveries being
170 significantly higher in the latter. Both systolic and diastolic blood pressures in
171 the PE group were significantly higher than in the control group. The newborn
172 weight in the PE group was lower, as well as the Apgar score in the first and fifth
173 minutes. Placental weight was greater in the control group but did not reach
174 statistical significance.

175 The analysis results for leptin in the maternal plasma, umbilical cord
176 plasma and placental tissue are plotted in Figure 1. Leptin values in the mothers
177 and in the placentas of the PE group showed a significant difference when
178 compared with the values obtained from the normal pregnant women, with

179 p=0.002 and p<0.001, respectively. In the fetus (Figure 1), the leptin levels were
180 not significantly different (p=0.607).

181 Figure 2 presents the geometric mean ratios and 95% CI between the PE
182 and control groups after adjustment for maternal age, gestational age and BMI, in
183 maternal plasma (MR=1.40; 95% CI: 1.00 - 1.97, p=0.049), umbilical cord plasma
184 (MR=1.33; 95% CI: 0.85- 2.09, p=0.216) and in the placenta (MR=1.82; 95% CI:
185 1.11 - 2.98, p=0.019). When categorizing the PE group into *term* (≥ 37 weeks)
186 and *preterm* (<37 weeks) and comparing data with the control group, the
187 measure of leptin in the placental tissue shows itself to be statistically higher
188 both in the *term* and *preterm* groups (150.66 $\mu\text{g/g}$ in the PE and 84.72 $\mu\text{g/g}$
189 control and 251.19 $\mu\text{g/g}$ in the PE and 84.72 $\mu\text{g/g}$ control, respectively, p=0.038).
190 When the PE group is divided in relation to the SBP cutoff point of 160 mmHg,
191 the values of leptin in the fetus are higher in relation to the control if the SBP is
192 below this point (PE 37.07 ng/mL; control 22.23 ng/mL, p=0.041).

193 The Pearson correlation verified that maternal leptin levels vary with
194 relative similarity to changes in BMI in late pregnancy (control r=0.57 p<0.001;
195 PE r=0.45, p=0.002). Leptin levels in the fetal umbilical cord showed a positive
196 correlation with NB weight (control r=0.405 p=0.002, PE r=0.618 p<0.001). A
197 positive correlation was also detected between the fetus with placental weight in
198 the two groups (control r=0.401, p 0.002; PE r=0.477, p=0.001). In the PE group,
199 an association was found between the umbilical cord vein leptin levels and
200 gestational age at delivery (r=0.55, p<0.001).

201 There was a positive correlation in the placenta for leptin with maternal
202 levels in the normotensive group (control r=0.344, p=0.021; PE r=0.202,
203 p=0.174). A significant inverse correlation was detected in the PE group between

204 placental leptin levels and NB weight ($r=-0.45, p<0.001$) and between gestational
205 age at delivery with leptin ($r=-0.44, p=0.001$).

206

207 **Discussion**

208 Greatly increased levels of leptin in the placental tissue and maternal
209 plasma of the pregnant women with preeclampsia are results that can contribute
210 to the understanding of the pathogenesis and/or treatment of this condition.
211 These results become all the more compelling when it is noted that,
212 simultaneously, these levels in the fetal plasma did not differ between the
213 affected and control women. In this sense, both the experimental design and the
214 results make the present study unique, contributing relevant data to the
215 understanding of preeclampsia. Altered leptin levels in preeclampsia have been
216 reported both in maternal plasma (19 - 24) and in the placenta (7, 25, 26), as
217 well as correlating with severity (24, 27, 28). It has also been noted that leptin
218 levels increase progressively until the end of the second trimester, remaining
219 unaltered until full-term (8). The increase in its production in PE begins in the
220 first trimester and remains elevated until parturition (21, 29). Therefore,
221 hyperleptinemia in preeclampsia is not a new or unique finding, however, its
222 magnitude in the maternal plasma and placenta differ between studies, just as
223 the results encountered here. Mise (7), Grosfeld (30) and Lepercq (31) have
224 suggested that hyperleptinemia in preeclampsia results from the overproduction
225 of this inflammatory cytokine, corroborating the theory of placental
226 hypoperfusion and hypoxia.

227 The analysis of PE severity, defined in this study as SBP >160mmHg
228 and/or proteinuria >2g, showed no statistically significant difference between

229 the groups, unlike some studies in which leptin levels in severe PE were
230 significantly higher, allowing the authors to even establish a cutoff point for
231 prediction of severity (24, 27, 28). It is worth noting that the number of cases of
232 severe preeclampsia in our sample was low, which may have affected our
233 findings.

234 Quite high leptin levels were found in the placentas for both the PE and
235 control groups, of which the level in PE was almost twice that found in normal
236 pregnant women. Dividing the PE group into *term* and *preterm*, it can be seen
237 that the difference between the PE and control group remains. Some studies
238 have analyzed the expression of placental leptin in preeclamptic women and
239 observed that its expression, as well as its receptors, increased (26, 32). This
240 increase in expression must be the result of circulatory alterations of the
241 placenta and hypoxia leading to increased production of inflammatory cytokines,
242 among them, leptin. In relation to the leptin receptors that supposedly could be
243 hyporegulators, Li et al. in 2004 found an increase in a soluble isoform of these
244 receptors in PE that could be involved, for example, in regulating trophoblastic
245 invasion. This might explain why this mechanism of invasion is altered and
246 pathologic in PE (26, 32, 33). In respect to the correlations carried out with
247 placental leptin, an association was found between maternal and placental leptin
248 levels in normotensive patients. Curiously the same did not occur in
249 preeclamptic women, probably due to the exacerbated increase in its expression
250 and placental production.

251 A review of the literature found that few studies quantify leptin in
252 placental tissue. Our study showed that leptin levels in the placenta are
253 extremely high, particularly in preeclampsia, and the relationship with values

254 found in the pregnant women and umbilical cord indicate that leptin plays an
255 important role in the pathophysiology of the disease, supporting the proposal
256 that this cytokine may be an important biomarker.

257 A direct correlation between BMI and plasma leptin was found in the
258 present study for both groups. This data is in agreement with that described in
259 the literature whereby the higher the percentage of body fat in pregnant women,
260 the greater the leptin levels (13, 15, 27, 34). Analysis of the fetal leptin in the
261 umbilical cord blood was not statistically different between the two groups with
262 only an upward trend found in PE, suggesting a form of protection for the fetus
263 in relation to the maternal-placental interactions, also proposed by McCarthy et
264 al. (35). Odegard et al., however, showed a significant increase in fetal leptin in
265 patients with PE in a sample of 256 preeclamptic patients and 607 controls (36).
266 Similar findings were also published by Vitoratos in 2001 (19).

267 Direct correlation between the weights of the fetus and the placenta and
268 the values of leptin of the umbilical cord found in this study is in accordance with
269 the scientific literature (35, 37-40). It has been proposed that fetus adipose
270 tissue mass and its basal energy cost contribute considerably to the production
271 of circulating leptin verified in the blood of the umbilical cord. Thus, it is
272 suggested that leptin levels produced by the fetus can add to the signaling of
273 pulmonary maturation.

274 The experimental design of this study enables the results to significantly
275 contribute to an understanding of the participation of leptin in preeclampsia. The
276 collection of maternal plasma, umbilical cord plasma, and placenta all from the
277 same pregnant woman confirms that evidences based on isolated samples can be
278 considered beyond statistical approaches and can be seen as biological evidences

279 since they occur in the same pregnant woman. The data appears to confirm that
280 the placenta is the primary triggering factor of hyperleptinemia and the fetus
281 does not participate in this interaction, in both normal and preeclamptic
282 pregnancy. Leptin, being an inflammatory cytokine, participates in an
283 exacerbated inflammatory cascade triggered in preeclampsia. Our data, taken in
284 conjunction with the scientific literature, suggests that protecting the fetus from
285 maternal-placental interactions can positively contribute to the maintenance of
286 preeclamptic pregnancy with a view to increasing birth weight.

287

288 **Acknowledgements**

289

290 We thank all the women, medical students, nurses and doctors who
291 participated in the study and made it possible, specially to the Obstetric and
292 Gynecology Department. We are grateful to Professor Mario Wagner for the
293 statistical analysis.

294 Grant support was received from the Conselho Nacional de
295 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; National Council for Scientific
296 and Technological Development), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande
297 do Sul (FAPERGS; Foundation for the Support of Research in the State of Rio
298 Grande do Sul) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
299 Superior (CAPES; Coordination for the Improvement of Higher Education
300 Personnel Foundation). Poli-de-Figueiredo is a CNPq researcher.

301

302 **References**

- 303 1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working
304 Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;
305 183(1):S1-S22.
- 306 2. Duley L. The global impact of pre-eclampsia e eclampsia. *Semin in perinatol.*
307 2009; 33: 130-137.
- 308 3. Steegers EAP, Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet.*
309 2010; 376: 631-44.
- 310 4. Tannetta D, Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of
311 preeclampsia: missing links? *Curr Hypertens Rep.* 2013; 15: 590-599.
- 312 5. Redman CWG, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view.
313 *Placenta* 2009; 23(supA): 38-42.
- 314 6. George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia.
315 *Curr Hypertens Rep* 2011; 13: 269-275.
- 316 7. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H,
317 Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K: Augmented placental production of leptin in
318 preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol*
319 *Metab.* 1998, 83:3225-3229.
- 320 8. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Non adipose tissue production of leptin:
321 leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997;
322 3:1029-1033.
- 323 9. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional
324 cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:
325 425- 432.
- 326 10. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-742.

- 327 11. Margetic S, Gazzola C, Pegg GC, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral
328 actions and interactions. *Int J Obes* 2002; 26: 1407-1433.
- 329 12. Sagawa N, Yura S, Itoh H, et al. Possible role of placental leptina in pregnancy.
330 *Endocrine*. 2002; 19 (1): 65-71.
- 331 13. Prolo P, Wong ML, Licinio J. Leptin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30:1285-
332 1290.
- 333 14. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav*. 2004; 81: 223-241.
- 334 15. Highman T, Friedman J, Huston L, Wong W, Catalano P. Longitudinal changes
335 in maternal leptin serum concentrations, body composition and resting
336 metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 178:1010-5.
- 337 16. Mouzon SH, Jacques L, Catalano P. The known and unknown of leptin in
338 pregnancy. *Am J Obstet and Gynecol*. 2006; 194: 1537-45.
- 339 17. Nobre F, Brandão A, Rodrigues CIS, et al. VI Diretriz Brasileira de Hipertensão.
340 *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2010; 17: 1-63.
- 341 18. Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. Proposal of a new standard for the
342 nutritional assessment of pregnant women. *Rev. Med. Chil*.
343 1997;125(12):1429-36.
- 344 19. Vitoratos N, Chrystodoulacos G, Kouskouni E, Salamalekis E, Creatsas G.
345 Alterations of maternal and fetal leptin concentrations in hypertensive
346 disorders of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001; 96: 59-62.
- 347 20. Ning Y, Willians MA, Muy-Rivera M, Leisenring WM, Luthy DA. Relationship of
348 maternal plasma leptin and risk of pre-eclampsia: a prospective study. *J*
349 *Matern Fetal Neonatal Med*. 2004; 15: 186-192.
- 350 21. Samolis S, Papastefanou I, Panagopoulos P, Galazios G, Kouskoukis A, Maroulis
351 G. Relation between first trimester maternal serum leptina levels and body

- 352 mass index in normotensive and pre-eclamptic pregnancies – Role of leptina
353 as a marker of pre-eclampsia: A prospective case-control study. *Gynecol*
354 *Endocrinol.* 2010; 26(5): 338-343.
- 355 22. Dalamaga M, Srinivas SK, Elovitz MA, Chamberland J, Mantzoros CS. Serum
356 adiponectin and leptin in relation to risk for preeclampsia: results from a
357 large case-control study. *Metabolism.* 2011; 60: 1539–44.
- 358 23. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, et al. Serum leptina levels in relation to
359 circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors
360 in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 1-9.
- 361 24. Shahat AM, Ahmed AB, Ahmed MR, Mohamed HS. Maternal serum leptin as a
362 marker of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 288:1317–1322.
- 363 25. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod.* 2006;
364 74: 218–229.
- 365 26. Li RH, Poon SC, Yu MY, Wong YF. Expression of placental leptina and receptors
366 in preeclampsia. *Int J Gynecol Pathol.* 2004; 23: 378-385.
- 367 27. Hendler I, Blackwell SC, Mehta SH, et al. The levels of leptin, adiponectin, and
368 resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and
369 without preeclampsia. *Am J Obstet and Gynecol.* 2005; 193: 979–983.
- 370 28. Ouyang Y, Chen H, Chen H. Reduced plasma adiponectin and elevated leptin in
371 pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007; 98: 110–4.
- 372 29. Papastefanou I, Samolis S, Panagopoulos P, et al. Correlation between
373 maternal first trimester plasma leptin levels and birth weight among
374 normotensive and preeclamptic women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;
375 23:1435-1443.

- 376 30. Grosfeld A, Turban S, Andre J, et al. Transcriptional effect of hypoxia on
377 placental leptin. *FEBS Lett.* 2001, 502:122-126.
- 378 31. Lepercq J, Guerre-Millo M, Andre J, Cauzac M, Hauguel-de Mouzon S. Leptin: a
379 potential marker of placental insufficiency. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;
380 55:151-155.
- 381 32. Spranger RM, Hartner A, Schild RL, et al. Leptin expression in primay
382 trophoblast cells in response to incubation with the serum of preeclamptic
383 woman. *Hypert in Pregnancy.* 2008; 27:267-277.
- 384 33. Challier J, Galtier M, Bintein T, et al. Placental leptin receptor isoforms in
385 normal and pathological pregnancies. *Placenta.* 2003; 24:92-9.
- 386 34. Bartha JL, Carmona RR, Llompart ME, Delgado RC. The relationships between
387 leptin and inflammatory cytokines in women with pre-eclampsia. *BJOG.* 2001;
388 108:1272-1276.
- 389 35. McCarthy JF, Misra DN, Roberts JM. Maternal plasma leptin is increased in
390 preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *Am J*
391 *Obstet Gynecol.* 1999; 180:731-6.
- 392 36. Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Umbilical cord
393 plasma leptin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186:
394 427-432.
- 395 37. Mellati AA, Mazloomzadeh S, Anjomshoaa A, Alipour M, Karimi F, Mazloomi S,
396 Kazemi SAN. Multiple Correlations Between Cord Blood Leptin Concentration
397 and Indices of Neonatal Growth. *Arch Med Res.* 2010; 41: 26-32.
- 398 38. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, et al. Cord plasma concentrations of adiponectin and
399 leptin in healthy term neonates: positive correlation with birth weight and
400 neonatal adiposity. *Clin Endocrinol(Oxf).* 2004; 61: 88-93.

- 401 39. Christou H, Connors JM, Ziotopoulou M, et al. Cord blood leptin and insulin-
402 like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin*
403 *Endocrinol Metab.* 2001; 86:935-938.
- 404 40. Grisar-Granovsky S, Eitan R, Algur N, Schimmel MS, Diamant YZ, Samueloff A.
405 Maternal and umbilical cord serum leptin concentrations in small-for-
406 gestational-age and in appropriate for gestational age neonates: A maternal,
407 fetal, or placental contribution? *Biol Neonate.* 2003; 84:67-72.

408 Legend

409 Figure 1 - Box plots on a logarithmic scale representing leptin values of
410 normotensive pregnant women *versus* women with preeclampsia, in the
411 maternal plasma ($p = 0.002$), fetal plasma ($p = 0.607$) and placenta ($p < 0.001$).

412

413 Figure 2 - Forest Plot representing geometric mean ratios and their respective
414 confidence intervals for the comparison of normotensive pregnant women *versus*
415 those with preeclampsia, for leptin levels in maternal plasma, umbilical cord
416 plasma and the placenta.

417 * MR: geometric mean ratios obtained in an analysis of covariance model,
418 adjusted for maternal age, gestational age and body mass index.

419 CI: confidence interval, p: statistical significance.

Table

[Click here to download Table: tabela1 ingles adriana janeiro 2014 \(2\).docx](#)

Table 1 – Demographic, clinical and perinatal characteristics of controls and preeclamptic patients.			
Variables	NG (n=67)	PE (n=50)	p
Maternal age, years	26.4 ± 5.3	26.4 ± 6.8	0.99
White race, n(%)	34 (52.3)	31 (64.6)	0.25
Non-smokers, n(%)	55 (82)	44 (88)	0.42
Previous PE, n(%)	1 (1.5)	12 (24)	<0.001
Primigesta, n(%)	28 (41.8)	25 (51)	0.35
Maternal weight, kg	79.9 ± 19.8	83.9 ± 14.7	0.21
Inicial BMI, kg/m ²	25.8 ± 5.6	26.9 ± 5.5	0.30
Final BMI, kg/m ²	30.4 ± 5.8	32.3 ± 5.4	0.08
Delta BMI, kg/m ²	4.40 ± 1.95	5.68 ± 2.99	0.01
GA, wk	39.3 ± 1.5	36.1 ± 3.9	<0.001
SBP, mmHg	118.7 ± 10.2	156.7 ± 17.3	<0.001
DBP, mmHg	74.7 ± 7.7	100.8 ± 13.6	<0.001
Vaginal delivery, n(%)	45 (67.2)	12 (24.0)	<0.001
Birth weight, g	3393 ± 458	2789 ± 903	<0.001
Female NB, n(%)	31 (46.3)	27 (54.0)	0.41
Apgar 1 st minute	8.5 ± 0.8	7.5 ± 1.8	<0.001
Apgar 5 th minute	9.4 ± 0.6	8.7 ± 1.2	<0.001
SGA, n(%)	3 (4.5)	3 (6.1)	0.44
Placental weight, g	649 ± 142	590 ± 179	0.06

Data are presented as median for continuous variables and as number (percentage) for categorical variables.

NG: normotensive gestation, PE: preeclampsia, BMI: body mass index, GA: gestacional age at delivery, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, NB: newborn, SGA: small for gestacional age infants.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

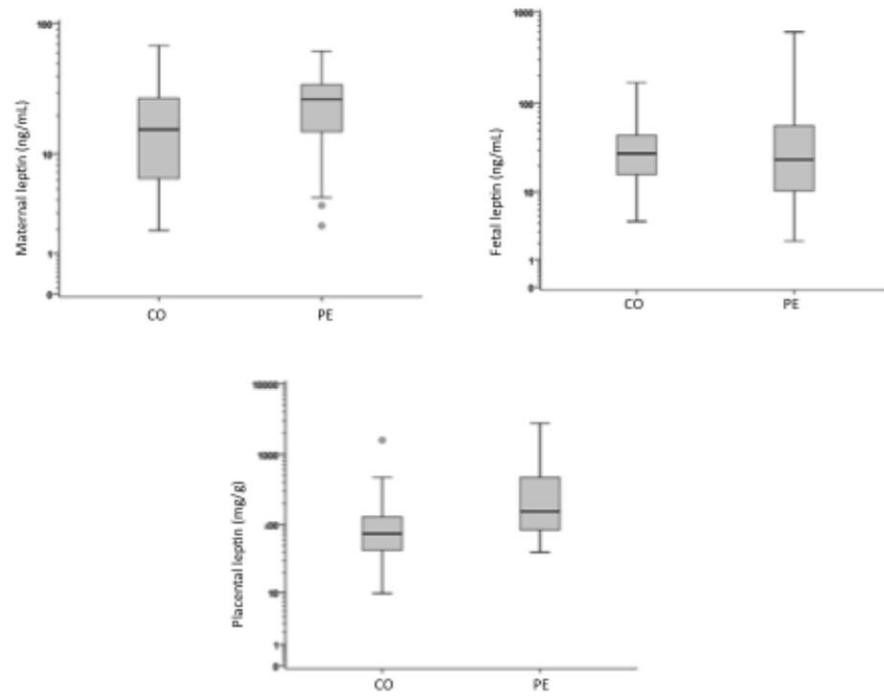
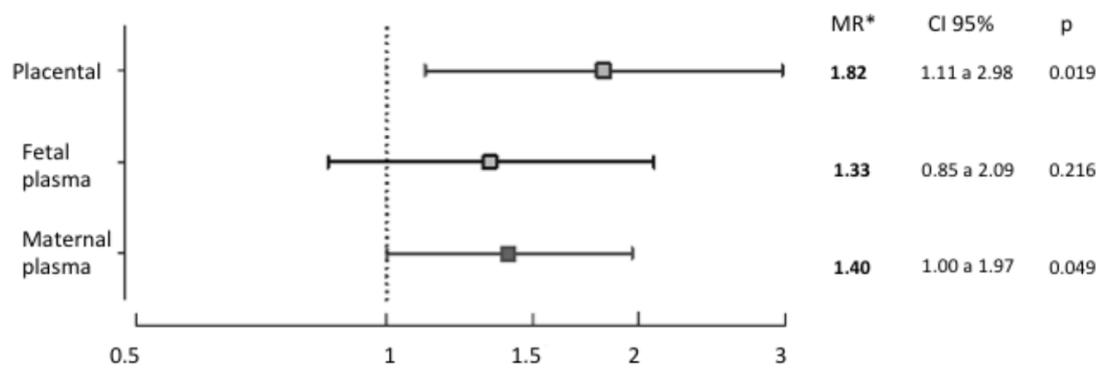


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



Anexo G - Comprovante Submissão Artigo

The screenshot shows a web browser window displaying the Editorial Manager interface. The page title is "Submissions Being Processed for Author Bartira Ercilia Pinheiro da Costa, PhD". The page indicates "Page: 1 of 1 (1 total submissions)" and "Display 10 results per page." Below this, there is a table with the following data:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Preeclampsia alters leptin levels in placenta tissue and maternal plasma	01/17/2014	01/17/2014	Manuscript Submitted

Below the table, there is a button labeled "<< Author Main Menu". The browser's address bar shows the URL "http://www.editorialmanager.com/jcem/". The taskbar at the bottom shows the Start button and several open applications, including "Caixa de entra...", "Your PDF Pree...", "Delfos - Espaç...", "Editorial Man...", and "Desktop". The system clock shows the time as 19:26.