

**Maria Carmen Neves Souza Carmo**

**Influência da concentração de leptina no  
sangue materno, no sangue do cordão  
umbilical e na placenta no peso e condições  
do feto ao nascimento**

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

**Maria Carmen Neves Souza Carmo**

**Influência da concentração de leptina no sangue materno, no sangue do cordão umbilical e na placenta no peso e condições do feto ao nascimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

## **ATA DA DEFESA**

**“Somente quando sonha um homem vai ao céu  
E o resto é pelo chão”...**

(Almir Sater)

**Dedico esse trabalho àquele que foi exemplo de vida e de quem recebi amor incondicional durante toda a vida: meu primeiro professor de bioquímica e inesquecível pai, Armando Gil de Almeida Neves.**

**AGRADECIMENTOS**

Sou privilegiada por ter tantos a agradecer:

À Jacqueline Alvarez Leite, amiga, antes de orientadora. Pela paciência, pela inspiração, pelo apoio, pelo convívio de muitos anos.

Às minhas colaboradoras Danielle Fernandes Durso, Lilian Teixeira Gonçalves, Raquel Neves Ruas e Solange Silveira Pereira. Só posso dizer que sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

A todos que indiretamente inspiraram e/ou apoiaram esse projeto, entre eles, Isabel Correia, Ênio Cardillo Vieira, Ana Luiza Farias, Ricardo Marinho, Rachel Horta, Dr. Márcio Ibrahim, Márcio Bunte.

A todos os “labinianos”, que me acolheram e auxiliaram durante a realização desse trabalho.

Aos plantonistas do HC, em especial à Dra. Júnia Franco de Oliveira Neves, por terem me recebido em seus plantões, pela sua ajuda e compreensão.

Ao corpo clínico do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pela acolhida e colaboração.

Ao Trajano, rocha firme sobre a qual construí minha família e felicidade.

Ao Pedro e Carolina, por fazerem parte da minha vida. Por serem a melhor parte da minha vida.

À toda a minha família, apoio em todos os momentos.

A Deus, por todas as bênçãos (e não foram poucas) recebidas.

## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE TABELAS</b>	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	X
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	XI
<b>RESUMO</b>	XIV
<b>ABSTRACT</b>	XVII
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	23
<b>3. OBJETIVOS</b>	25
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b>	27
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	57
5.1 Caracterização das voluntárias	58
5.2 Amostras de sangue e placenta	59
5.3 Dosagem da concentração de leptina por ELISA	60
5.4 Dosagem de proteína na placenta (método de Lowry)	62
5.5 Análise da expressão de RNA em placenta	62
5.5.1 Isolamento de RNA	63

5.5.2 Preparação e amplificação do cDNA	64
5.5.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)	64
5.6 Análise histológica	65
5.7 Análise estatística	66
<b>6. RESULTADOS</b>	67
<b>7. DISCUSSÃO</b>	83
<b>8. CONCLUSÃO</b>	94
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	96



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ganho de peso recomendado durante a gestação.....	30
Tabela 2: Aumento cumulativo de peso.....	31
Tabela 3: Características gerais de todas as gestantes.....	69
Tabela 4: Parâmetros qualitativos referentes às mães e RN	70
Tabela 5: Leptina no sangue materno e de cordão, leptina placentária	71
Tabela 6: Coeficientes de correlação significativos (<0,05) com a leptinemia materna	72
Tabela 7: Caracterização materna segundo a leptinemia	73
Tabela 8: Caracterização dos RN.....	75
Tabela 9: Coeficientes de correlação estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre os diversos parâmetros e leptina no sangue materno, do cordão e placenta nas parturientes com leptinemia baixa	80
Tabela 10: Coeficientes de correlação estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre os diversos parâmetros e leptina no sangue materno, do cordão e placenta nas parturientes com leptinemia alta	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação da placenta.	33
Figura 2: Sistema de transporte sanguíneo feto-materno	35
Figura 3: Concentração sérica de leptina durante a gravidez	46
Figura 4: Funções da leptina na mãe e no feto	48
Figura 5: Classificação do ganho de peso materno e do tipo de parto	74
Figura 6: Peso e comprimento da criança nos primeiros meses de vida..	76
Figura 7: Leptinemia no cordão umbilical.....	77
Figura 8: Leptina placentária.....	78
Figura 9: Imunofluorescência para leptina na placenta.....	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

ASP: proteína estimuladora de acilação

BeWo: linhagem celular usada como modelo do trofoblasto no primeiro trimestre de gravidez

BSA: albumina de soro bovino

°C: graus Celsius

cm: centímetro

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

Da: daltons

DAPI: diaminofenilindol

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOHaD: origem da saúde e doença do adulto durante o desenvolvimento  
(*Developmental Origins of Adult Health and Disease*)

E<sub>1</sub>: estrona

E<sub>2</sub>: 17βestradiol

E<sub>3</sub>: estriol

EDTA: ácido tetraacético etilenodiamino

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

g: gramas

G2/S: fase G2 e S do ciclo celular

HC: Hospital das Clínicas

hCG: gonadotrofina coriônica humana

hPL: lactogênio placentário

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

IGF-1: fator de crescimento insulina símile-1

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

JAR: linhagem celular usada como modelo do trofoblasto no primeiro trimestre de gravidez

kDa: quilodaltons

kg: quilograma

m: metro

M: molar (mol/litro)

mL: mililitro

mmHg: milímetros de mercúrio

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

NPY: neuropeptídeo Y

*ob*: gene da leptina

*ob/ob*: camundongo nocaute para o gene da leptina

Ob-Rb: receptor de leptina B

OPD: 1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina

PA: pressão arterial

PBS: salina tamponada com fosfato

PGE2: prostaglandina E-2

PMSF: fenilmetanosulfonilfluorido

POMC: proopiomelanocorticotropina

RN: recém-nascido

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

Sem: semanas

TNF: fator de necrose tumoral

UCP1: proteína desacopladora 1

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

A gravidez é caracterizada por adaptações endócrinas e metabólicas do organismo materno, incluindo aumento do peso e do tecido adiposo. A leptina é secretada pelo tecido adiposo, além de ser expressa também em outros sítios como trato gastrointestinal, ossos, pulmões, intestino, rins, fígado, pele, estômago, coração, baço e placenta, sugerindo sua ação pleiotrópica. Embora os mecanismos que regulam os pesos da mãe e do feto durante a gravidez não estejam claros, é possível que a leptina tenha papel como fator regulador. Dessa forma, nosso objetivo nesse trabalho foi analisar os níveis de leptina no sangue materno e no cordão umbilical em parturientes e sua relação com o peso e condições fetais ao nascimento.

Para isso, vinte e cinco parturientes saudáveis e com gestações sem complicações foram recrutadas em maternidades públicas e amostras de sangue materno periférico, fragmento de tecido placentário e sangue da veia e das artérias umbilicais foram coletados. No sangue foi realizada avaliação da concentração de leptina e na placenta foi analisada a expressão de leptina e seu receptor (Ob-Rb). Após análise conjunta de todas as parturientes, essas foram divididas em dois grupos (leptinemia baixa e leptinemia alta), de acordo com a concentração de leptina no sangue periférico materno, para permitir comparações nas análises estatísticas. Avaliações de correlações também foram realizadas.

A idade média das parturientes foi 28 anos, com índice de massa corporal (IMC) de  $22,5\text{kg/m}^2$  e ganho de peso médio de 12,8kg. Os recém-

nascidos apresentaram peso médio de 3,15kg e comprimento médio de 45,9cm.

Após a divisão dos grupos, foi observado que as parturientes do grupo leptinemia alta apresentaram idade, peso pré-gestacional, IMC pré-gestacional e peso ao final da gravidez significativamente maior que as parturientes do grupo leptinemia baixa e apresentavam ainda maior expressão do receptor de leptina (Ob-Rb) na placenta.

Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto às concentrações séricas de leptina nas artérias e veia umbilicais, foi verificado aumento significativo da leptina retida nos fetos do grupo leptinemia alta.

Os dois grupos apresentaram correlação positiva entre as concentrações de leptina na veia e artérias umbilicais e ainda entre as concentrações de leptina na placenta com IMC e peso maternos pré-gestacionais.

No grupo leptinemia baixa, foram observadas apenas correlações positivas entre os níveis de leptina na veia e artérias umbilicais e entre as concentrações de leptina na placenta e IMC e peso das mães antes da gestação.

Já no grupo leptinemia alta, além das mesmas correlações verificadas no grupo leptinemia baixa, encontrou-se ainda correlação positiva entre a leptina materna e peso da mãe antes da gestação, correlação negativa entre leptinemia materna e expressão do Ob-Rb na placenta, correlação positiva

entre peso fetal e níveis de leptina no sangue do cordão umbilical e correlação negativa entre o Apgar dos RN e concentração de leptina na veia umbilical.

Concluindo, os níveis de leptina no cordão umbilical, mas não no sangue materno ao final da gestação, parecem ser importantes na determinação do peso do feto ao nascer, porém níveis maiores de leptina na veia umbilical estavam associados a níveis menores de Apgar.

**Palavras chaves:** gravidez, leptina, parturientes, recém-nascidos.



## **ABSTRACT**

Pregnancy is characterized by endocrine and metabolic adaptations of the mother, including increasing in weight and adipose tissue. Leptin is secreted by adipose tissue, and it is also expressed in other organs such as gastrointestinal tract, bone, lung, intestine, kidney, liver, skin, stomach, heart, spleen and placenta, suggesting pleiotropic actions. Although the mechanisms that regulate the weights of mother and fetus during pregnancy are unclear, it is possible that leptin has a role as a regulator factor. Thus, our goal in this study was to analyze leptin levels in maternal blood and umbilical cord and their relationship with fetal weight and conditions at birth.

For this, twenty-five patients were recruited at public hospitals and maternal peripheral blood samples and, after parturition, placental tissue fragment and blood of the umbilical arteries and vein were collected. Leptin concentration in maternal and fetal blood, leptin expression in placenta and leptin receptor expression in placenta (Ob-Rb) were obtained. After the combined analysis of all pregnant women, they were divided into two groups (low leptin and high leptin levels), according to leptin concentration in maternal peripheral blood, to enable comparisons in statistical analyzes. Correlations were also performed.

The average age of mothers was 28 years, with body mass index of 22.5 kg/m<sup>2</sup> and average weight gain of 12.8 kg. The newborns had a mean weight of 3.15 kg and average length of 45.9 cm. After the division of the groups, it was observed that the mothers in high leptin level group had age, BMI and weight

before pregnancy and weight in late pregnancy significantly higher than the mothers of low leptin level group.

Although no statistical differences were observed between groups regarding serum concentrations of leptin in the umbilical arteries and vein, it was observed a significant increase in fetal leptin retained in the high leptin level group.

Both groups presented positive correlation between umbilical vein and arteries leptin levels and also between placenta leptin levels and maternal BMI and weight before pregnancy.

In the low leptin level group it was observed only positive correlation between umbilical vein and arteries leptin levels and also between placenta leptin levels and maternal BMI and weight before pregnancy.

In the high leptin level group it was observed the same correlations observed in the former group and also positive correlation between maternal leptin levels and maternal weight before pregnancy, negative correlation between maternal leptin levels and Ob-Rb expression in placenta, positive correlation between blood cord leptin levels and fetal weight and negative correlation between newborn Apgar score and umbilical vein leptin levels.

In conclusion, cord leptin levels, but not maternal blood leptin levels, may play a role in determining fetal weight. Nevertheless, higher umbilical vein leptin levels were associated with low Apgar scores.

**Keywords:** pregnancy, leptin, pregnant women, newborns.



## **1. INTRODUÇÃO**

## **INTRODUÇÃO**

A gravidez é caracterizada por adaptações endócrinas e metabólicas do organismo materno, incluindo aumento do peso e do tecido adiposo.

Os principais fatores que induzem as alterações adaptativas no organismo materno durante a gravidez são hormônios e enzimas; aumento do volume uterino e da sua circulação; demanda fetal por oxigênio e nutrientes.

Todas as mulheres devem ganhar peso durante a gestação, inclusive as obesas. Acredita-se que um dos fatores mais importante na determinação do peso do feto ao nascer, durante as gestações normais, é o ganho de peso pela mãe. O ganho de peso adequado é essencial para desenvolvimento do feto, bem como de estruturas relacionadas à gravidez, como placenta, mamas e reserva materna.

A placenta é um órgão complexo que permite ao embrião sobreviver dentro do ambiente intrauterino. Entre as muitas funções da placenta estão o ancoramento do embrião e prevenção de sua rejeição pelo sistema imunológico da mãe, difusão de oxigênio e nutrientes do sangue materno para o fetal, assim como difusão de produtos de excreção do feto para o sangue da mãe.

A obesidade é, atualmente, epidemia mundial e é caracterizada pelo aumento do número ou tamanho das células adiposas, ou combinação de ambos. Nos últimos anos o papel do tecido adiposo e seus produtos no

desenvolvimento da obesidade tem sido desvendado. Leptina, interleucina-6, (IL-6), adiposina, proteína estimuladora da acilação (ASP), adiponectina, fator de necrose tumoral (TNF), proteína ligadora do retinol-4, prostaglandina E-2 (PGE2), fator de crescimento insulina símile-1 (IGF-1), entre outros, são secretados pelas células adiposas e exercem efeitos diretos ou indiretos sobre adipócitos, células musculares e hepáticas precocemente na vida. Todas essas citocinas podem ter papel importante na etiopatogenia da resistência à insulina e das doenças cardiovasculares.

A leptina é uma das citocinas produzidas pelo tecido adiposo e foi inicialmente descrita como o fator ausente no camundongo *ob/ob*, que tem mutação espontânea no gene da leptina e se torna obeso, hiperfágico, intolerante ao frio e infértil. A leptina é um polipeptídeo não glicosilado, com 167 aminoácidos e peso molecular de 16 kDa, que pode circular livre ou como um complexo estável com alfa 2-macroglobulina. É secretada pelo tecido adiposo de forma pulsátil, usualmente 2 a 3 horas após uma refeição. Os níveis circulantes de leptina refletem diretamente a quantidade de energia armazenada no tecido adiposo, assim, indivíduos obesos tipicamente produzem mais leptina do que indivíduos eutróficos. Além disso, leptina é expressa em outros sítios como tecido adiposo marrom, trato gastrointestinal, ossos, pulmões, intestino, rins, fígado, pele, estômago, coração, baço e placenta, sugerindo ação pleiotrópica. O padrão de expressão sugere seu envolvimento numa variedade de ações tais como controle do balanço energético, regulação da massa gorda, metabolismo ósseo, manutenção da função reprodutora e da gravidez. A leptina pode atuar também como citocina

pró-inflamatória, sendo capaz de estimular diretamente a proliferação e ativação de monócitos e linfócitos T circulantes.

Embora os mecanismos que regulam os pesos da mãe e do feto durante a gravidez não estejam claros, é possível que a leptina tenha papel como fator regulador. As concentrações de leptina aumentam significativamente nas fases iniciais da gestação, sendo 30% maiores com 12 semanas de gestação quando comparadas com níveis pré-gestacionais e voltam a esses níveis imediatamente após o parto.

A placenta humana expressa quantidades significativas de mRNA da leptina e alguns estudos *in vitro* mostram que ao termo da gestação 98% da leptina placentária é secretada para a circulação materna. A expressão de leptina no feto é alterada por diferentes condições intrauterinas, como subnutrição materna, hiperglicemia e hiperinsulinemia fetais crônicas.

Devido ao importante papel da leptina não só no metabolismo energético, mas também na inflamação e resposta imune, uma melhor compreensão da distribuição desse hormônio durante a gravidez, pode levar a intervenções mais efetivas e à diminuição da incidência e da mortalidade por todas as doenças ligadas à obesidade, como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer.



## **2. JUSTIFICATIVA**

## JUSTIFICATIVA

Os efeitos da leptina e de outras adipocinas são bem compreendidos no adulto. Porém, seus efeitos na evolução da gestação e nas interações materno-fetais são menos estudados. Devido ao importante papel da leptina não só no metabolismo energético, mas também na inflamação e resposta imune, uma melhor compreensão da distribuição desse hormônio durante a gravidez, pode contribuir para o melhor entendimento da obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer. Melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na influência do meio ambiente uterino nas doenças que esse ser em desenvolvimento poderá apresentar no futuro poderá levar a intervenções mais efetivas e, talvez, à diminuição da incidência dessas doenças e da mortalidade por todas as doenças ligadas à obesidade.





### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral:**

Analisar os níveis de leptina do sangue materno, cordão umbilical e placenta em parturientes e relacioná-los com crescimento e condições do feto ao nascer.

### **3.2 Objetivos específicos:**

1. Verificar as possíveis correlações entre leptina materna e fetal com IMC da mãe antes da gravidez e ganho de peso durante a gravidez.
2. Analisar a contribuição da leptina placentária para os níveis de leptina do sangue periférico e das artérias e veia umbilicais das parturientes e fetos.
3. Analisar e correlacionar níveis altos ou baixos de leptina no sangue materno com aqueles encontrados no sangue do cordão umbilical e na placenta.
4. Analisar as influências de níveis altos ou baixos de leptina no sangue materno no peso final da mãe, no peso e Apgar do recém-nascido e seu crescimento nos primeiros meses de vida.

---

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

## **GRAVIDEZ**

### **Modificações do organismo materno**

A gravidez é caracterizada por adaptações endócrinas e metabólicas do organismo materno, incluindo aumento do peso e do tecido adiposo.<sup>1</sup>

Os principais fatores que induzem as alterações adaptativas no organismo materno durante a gravidez são: hormônios e enzimas; aumento do volume uterino e da sua circulação; demanda fetal por oxigênio e nutrientes.<sup>2</sup>

Com a finalidade de manter um suprimento ininterrupto de glicose e de aminoácidos para o feto o organismo materno diminui sua utilização periférica de glicose. Os ácidos graxos livres, ao contrário da glicose e dos aminoácidos, não atravessam a placenta e, portanto, não podem suprir as necessidades energéticas do feto nos períodos de jejum materno. O consumo contínuo de glicose pelo feto e seu rápido transporte pela placenta influenciam o metabolismo dos carboidratos na gestante.<sup>2</sup>

A segunda metade da gravidez é caracterizada por um estado “diabetogênico” devido ao aumento da resistência à insulina. Essa alteração não reflete uma condição patológica, mas uma adaptação fisiológica, fundamental para garantir ao feto suprimento contínuo de nutrientes e preparar o organismo materno para o parto e a lactação. Nesse contexto a importância do tecido adiposo materno e da placenta já é reconhecida. O tecido adiposo secreta uma série de citocinas, em conjunto conhecidas como adipocinas, que

têm efeitos parácrinos e endócrinos. A placenta produz hormônios como o lactogênio placentário e hormônios esteroides (estrógenos e progestágenos), cujos efeitos diabetogênicos foram demonstrados por diferentes estudos *in vitro*<sup>3</sup> e *in vivo*.<sup>4</sup> É interessante observar que as células trofoblásticas expressam as mesmas citocinas que o tecido adiposo, sugerindo que tais moléculas podem afetar a interface materno-fetal desde a implantação do embrião até o terceiro trimestre da gestação.<sup>1</sup>

## **Gravidez e ganho de peso**

Todas as mulheres devem ganhar peso durante a gestação, inclusive as obesas. Acredita-se que o fator mais importante na determinação do peso do feto ao nascer é o ganho de peso pela mãe (mais importante que a quantidade de peso perdida antes da gestação, no caso de mulheres obesas que se preparam para a gestação perdendo peso).<sup>5,6</sup>

A gravidez deve ser iniciada com uma relação peso/ altura materna entre 90 e 120% do peso ideal, equivalente a um índice de massa corporal (IMC) de 20 a 26kg/m<sup>2</sup>.<sup>6</sup>

Associação entre ganho de peso insuficiente pela mãe e crescimento intrauterino restrito foi estabelecida desde a Segunda Guerra Mundial. O ganho de peso insuficiente na gravidez pode levar ao crescimento intrauterino restrito, nascimento de feto com baixo peso para a idade gestacional e risco de obesidade e outras doenças na idade adulta.<sup>7</sup>

Desde 1990, o *Institute of Medicine* não divulgava recomendações sobre o ganho de peso ideal durante a gestação. O novo protocolo agora inclui recomendações específicas para todas as mulheres, inclusive aquelas que estão obesas antes de uma gravidez (tabela 1). As recomendações começam com um exame inicial que inclui a avaliação do peso e da altura, dieta e exercícios físicos antes de engravidar e discute o uso de contraceptivos até que mulheres com sobrepeso ou obesas alcancem o peso ideal para iniciar uma gestação. É importante que as mulheres iniciem a gravidez com um peso adequado, se possível, visando à manutenção e promoção da saúde da gestante e do feto.<sup>8</sup>

Baseado no IMC, as recomendações básicas para o ganho de peso durante a gestação de feto único estão descritas nas tabelas 1 e 2

**Tabela 1: Ganho de peso recomendado durante a gestação (g)**

Classificação	IMC <sup>a</sup> pré gestacional	Ganho de peso na gestação *	Ganho de peso semanal médio 2º e 3º trimestres <sup>#</sup> (kg)
Baixo peso	> 18,5	12.700g - 18.143g	0.453 (0.453 - 0.589)
Normal	18,5 - 24,9	11.339g - 15.875g	0.453 (0.362 - 0.453)
Sobrepeso	25,0 - 29,9	6.803g - 11.339g	0.272 (0.226 - 0.317)
Obesidade	> 30,0	4.989g - 9.071g	0.226 (0.181 - 0.272)

<sup>a</sup> IMC: Índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>). \* Os valores convertidos da unidade em libras no protocolo original são valores aproximados. <sup>#</sup> Os cálculos aceitam um ganho de peso de 0,5 a 2 quilos durante o primeiro trimestre da gravidez. Fonte: *Institute of Medicine*.<sup>8</sup>

**Tabela 2: Aumento cumulativo de peso (g)**

	10 sem.	20 sem.	30 sem.	40 sem.
--	---------	---------	---------	---------

<b>Feto</b>	5	300	1500	3400
<b>Placenta</b>	20	170	300	650
<b>Líquido amniótico</b>	30	350	750	800
<b>Útero</b>	140	320	600	970
<b>Mamas</b>	45	180	360	405
<b>Sangue</b>	100	600	1300	1450
<b>Líquido extra vascular</b>	0	30	80	1480
<b>Reserva materna</b>	310	2050	3480	3345
<b>Total</b>	650	4000	8500	12500

Sem. = semanas.<sup>9</sup>

## Placenta

A placenta é um órgão complexo, único, autônomo e transitório, responsável pela tolerância materna aos antígenos paterno-fetais, ancoramento do embrião/ feto e transporte de nutrientes da mãe para o feto e produtos da excreção do feto para a mãe, permitindo assim sua sobrevivência no ambiente intrauterino.<sup>10</sup>

Durante o primeiro trimestre da gravidez uma população de células do citotrofoblasto migra e invade as artérias espiraladas do útero. Essa invasão resulta em perda de camadas musculoesquelásticas e do endotélio. Essa remodelação é essencial para um fluxo sanguíneo adequado através do leito vascular uteroplacentário promovendo crescimento e desenvolvimento normais

do feto. Os mecanismos pelos quais é regulada a invasão das artérias espiraladas são ainda não são completamente conhecidos.<sup>10</sup>

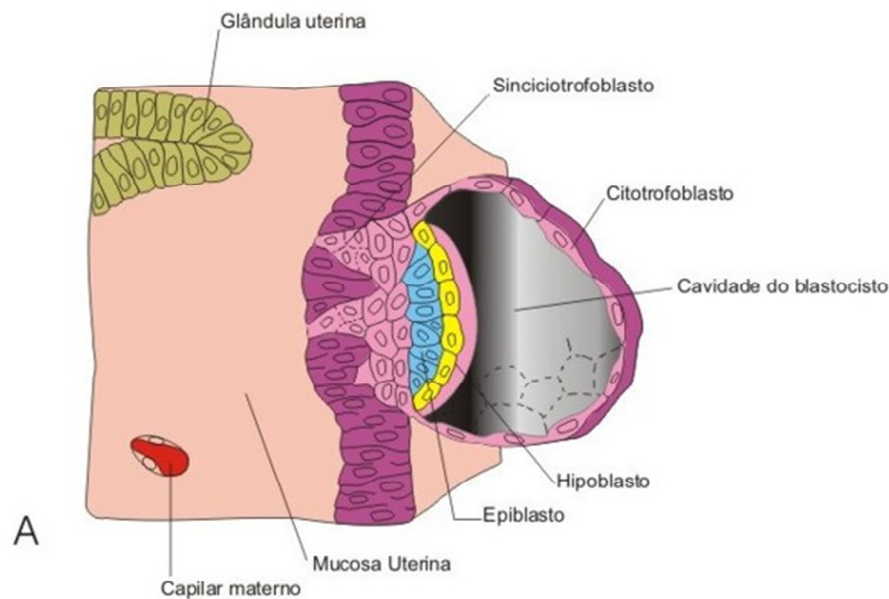
Os hormônios placentários são necessários para estabelecimento e manutenção da gravidez, adaptação do organismo materno à gestação e crescimento fetal. A placenta é sítio importante de produção de hormônios esteroides, principalmente progesterona e estrógenos. Os estrógenos incluem estriol ( $E_3$ ) e quantidade significativa de  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ) e estrona ( $E_1$ ).<sup>10</sup>

Os estrógenos regulam a produção hormonal das células trofoblásticas.  $E_2$  induz aumento significativo na produção diária de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e também estimula a expressão lactogênio placentário (hPL), de uma maneira independente de hCG. Os estrógenos regulam ainda a expressão de leptina pelas células trofoblásticas.<sup>10</sup>

A principal função da placenta durante o desenvolvimento fetal é proporcionar difusão de oxigênio e nutrientes do sangue materno para o fetal, assim como difusão de produtos de excreção do feto para o sangue da mãe.<sup>11</sup>

**Formação da placenta:** O óvulo é normalmente fecundado na trompa e chega à cavidade uterina na forma de mórula, que rapidamente se transforma em blastocisto. Esse adere ao endométrio e aí se implanta 5 a 6 dias após a fecundação. O blastocisto é constituído pelo embrioblasto e trofoblasto. O trofoblasto se diferencia em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. A camada exterior de células do blastocisto e que se tornará a placenta é o sinciotrofoblasto. A placenta definitiva aparece entre 10 e 12 semanas após fecundação (figura 1).<sup>11,12</sup>





**Figura 1:** Formação da placenta. O zigoto adere-se ao endométrio e aí se implanta 5 a 6 dias após a fecundação. O blastocisto é constituído pelo embrioblasto e trofoblasto. O embrioblasto se diferencia em duas camadas superpostas (epiblasto e hipoblasto) que darão origem ao embrião. Logo após o trofoblasto se diferencia em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. A camada exterior de células do blastocisto e que se tornará a placenta é o sinciotrofoblasto. As células do sinciotrofoblasto erodem as glândulas endometriais e os vasos sanguíneos.

O fluxo de sangue não se estabelece até 12 semanas. Antes disso, plasma (mas não sangue) flui nos espaços intervilosos. Circulação uteroplacentária acontece quando as artérias espiraladas uterinas são transformadas de vasos de alta pressão e baixa capacitância em vasos de baixa pressão e alta capacitância.<sup>12</sup>

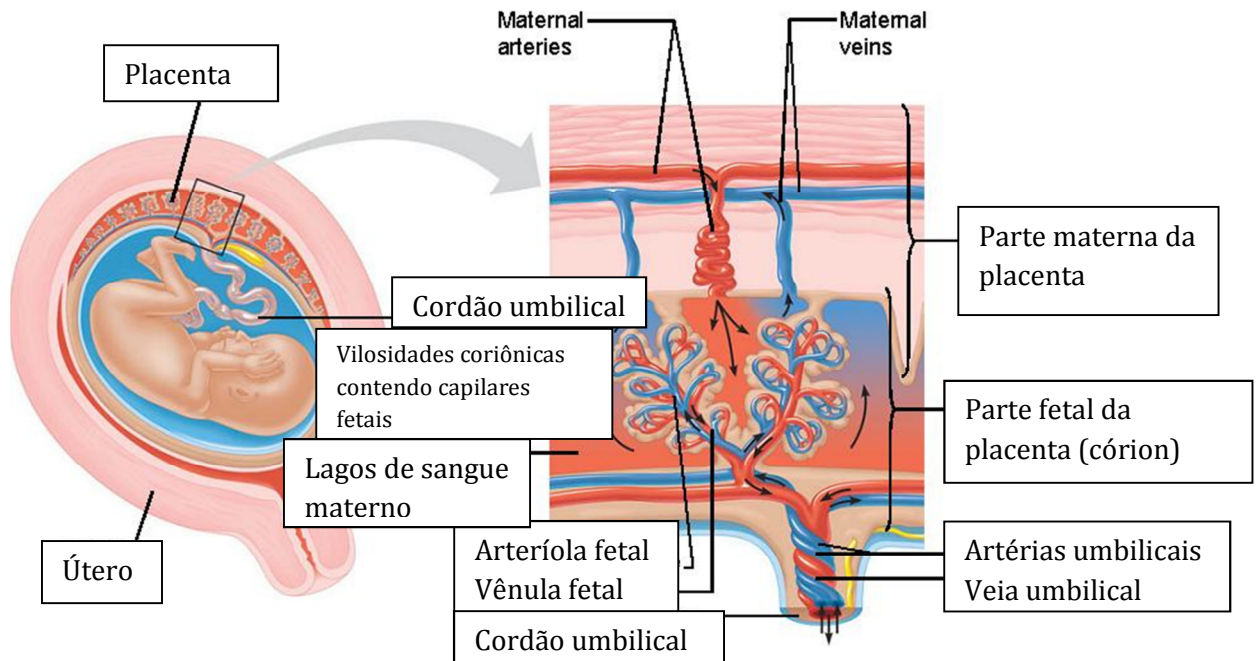
A implantação resulta da ação das células trofoblásticas que se desenvolvem sobre a superfície do blastocisto. Essas células secretam

enzimas proteolíticas que digerem e liquefazem as células do endométrio uterino adjacentes. Uma vez tendo ocorrido a implantação, as células trofoblásticas e outras células adjacentes (do blastocisto e do endométrio) proliferam rapidamente formando a placenta e os outros anexos embrionários.<sup>11</sup>

Enquanto os cordões trofoblásticos dos blastocistos estão ligando-se ao útero, capilares sanguíneos crescem nos cordões do sistema vascular do embrião em formação. Em torno do 16º dia após a fertilização, o sangue começa a ser bombeado pelo coração do próprio embrião. Simultaneamente, sinusoides sanguíneos supridos de sangue materno desenvolvem-se em torno das partes externas dos cordões trofoblásticos. As células trofoblásticas enviam cada vez mais projeções, que se tornam vilosidades placentárias nas quais crescem capilares fetais. Assim, as vilosidades carregando sangue fetal são envolvidas por sinusoides que contêm sangue materno.<sup>11</sup>

O sangue fetal flui através de duas artérias umbilicais para os capilares das vilosidades e volta através de uma única veia umbilical para o feto. O sangue materno flui das artérias uterinas para os sinusoides maternos que circundam as vilosidades e em seguida volta para as veias uterinas da mãe (figura 2).<sup>11</sup>

Como a placenta é primariamente um órgão fetal, seu tamanho é um reflexo do tamanho e da saúde do feto.<sup>12</sup>



**Figura 2: Sistema de transporte sanguíneo feto-materno.** O sangue fetal flui através de duas artérias umbilicais para os capilares das vilosidades e volta através de uma única veia umbilical para o feto. O sangue materno flui das artérias uterinas para os sinusoides maternos que circundam as vilosidades e em seguida volta para as veias uterinas da mãe.

Desenvolvimento e funcionamento anormais da placenta podem contribuir para o desenvolvimento das complicações associadas à gestação, como diabetes gestacional e pré eclâmpsia.<sup>13</sup>

### Saúde e doença têm origem no ambiente intrauterino

Saúde e doença podem ter origem no período de desenvolvimento intrauterino. Fatores ambientais como nutrição materna, composição corporal, níveis hormonais, entre outros, podem mandar sinais para o feto em

desenvolvimento e influenciar o fenótipo metabólico desse indivíduo e assim, seu risco de desenvolver doenças crônicas no futuro.<sup>14</sup>

Há cerca de vinte anos surgiram os conceitos de “**plasticidade**” e “**fenótipo econômico**”.<sup>14</sup>

Plasticidade é uma qualidade universal dos seres vivos durante o período de seu desenvolvimento. Dentro dos limites impostos pelos seus genes e restrições mecânicas, cada indivíduo tem uma série de opções para sua história de vida e forma e função final do corpo. A definição formal de plasticidade do desenvolvimento é “a habilidade de um único genótipo produzir mais de uma forma alternativa de estrutura, estado fisiológico ou comportamento em resposta às condições ambientais.”<sup>15</sup>

Fenótipo econômico é um termo cunhado para descrever a hipótese pela qual resistência à insulina e diabetes tipo 2 originam-se da desnutrição durante o período intrauterino. Essa hipótese propõe que o bebê desnutrido torna-se “econômico”. Ele mantém altos níveis de glicose na corrente sanguínea para beneficiar o cérebro, mas menos glicose é estocada nos músculos. O crescimento muscular é prejudicado para proteger o cérebro. Desde que adotado, esse comportamento econômico se torna permanente e, se combinado com a adiposidade na vida adulta, pode levar ao desenvolvimento de diabetes tipo 2.<sup>15</sup>

Esses dois conceitos foram sugeridos inicialmente para explicar a relação entre baixo peso ao nascer e condições como intolerância à glicose. Ambas as características poderiam ser adaptações benéficas do organismo em

desenvolvimento ao meio ambiente pobre em termos nutricionais, especialmente se esse meio ambiente é mantido durante a vida extrauterina. Assim, um fenótipo “econômico” é induzido quando a nutrição materna é inadequada. Essa ideia foca na plasticidade do desenvolvimento, que em situações normais provê configurações de mecanismos homeostáticos que permitam flexibilidade individual para modificar seu fenótipo para que este corresponda ao provável futuro meio ambiente. Entretanto, há evidências de que quando essa predição não é correta e o ambiente nutricional após o nascimento não é o mesmo que o ambiente intrauterino, essa disparidade confere uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças metabólicas no decorrer da vida pós natal.<sup>14</sup>

Animais expostos a essa disparidade entre ambiente intra e extrauterino desenvolvem obesidade. Observa-se hipertrofia de adipócitos, atividade física reduzida, resistência à insulina e à leptina, hipertensão arterial, disfunção de células endoteliais e alteração das funções cardiovasculares e renais. Evidências moleculares recentes mostraram que restrição materna de proteínas seguida de crescimento acelerado do recém-nascido pode alterar o perfil de expressão gênica do adipócito e que essas alterações persistem na vida adulta do indivíduo contribuindo para o aparecimento das características da síndrome metabólica.<sup>14</sup>

É pertinente supor que essa plasticidade possa operar dentro de uma série de meio ambientes, não apenas o de restrição calórica materna, mas também nas situações de excessivo aporte nutricional para o feto, como nos quadros de diabetes gestacional ou obesidade materna, condições cada vez

mais prevalentes na sociedade ocidental. Estudos experimentais preliminares mostraram também que superalimentação durante a amamentação leva à hipertrofia permanente dos adipócitos.<sup>16</sup> Resultados recentes obtidos com modelos animais de obesidade materna e dieta hiperlipídica durante o período inicial de desenvolvimento mostraram que na vida adulta esses filhotes têm tolerância prejudicada à glicose, hipertensão, dislipidemia, resistência hipotalâmica à leptina e esteatose hepática não alcoólica.<sup>17</sup> É provável que as dietas hiperlipídicas usadas nesses estudos tenham forçado a plasticidade metabólica além da sua capacidade adaptativa. Como resultado, exposição à dieta semelhante (hiperlipídica) após o nascimento pode piorar ainda mais esse fenótipo mal adaptado. Suportando essa teoria, estudos recentes mostraram que a deposição ectópica de tecido adiposo (fígado e gônadas) induzida por dieta hiperlipídica no período de desenvolvimento é exacerbada quando esse desafio nutricional persiste após o desmame.<sup>18</sup> E assim acontece amplificação de um fenótipo obeso através das gerações.<sup>14</sup>

Eventos precoces acontecendo no feto têm sido associados ao aparecimento de doenças durante a vida desse indivíduo. A descoberta dessa interrelação foi denominada “programação fetal”. De fato, nutrição/desnutrição materna, assim como mudanças na homeostase da glicose durante a gestação tem papel importante no desenvolvimento de resistência à insulina na vida pós-natal.<sup>19</sup>

## **Tecido adiposo**

### Origem do tecido adiposo

O tecido adiposo branco está presente em humanos já ao nascimento. Não há evidência de que haja diferenças relacionadas ao sexo na localização do tecido adiposo durante o período de desenvolvimento fetal. A diferença na distribuição do tecido adiposo entre os sexos masculino e feminino desenvolve-se mais tarde, presumivelmente devido à atuação dos hormônios sexuais. Fatores angiogênicos e adipogênicos parecem desencadear o desenvolvimento de capilares e aglomerados de adipócitos que vão se desenvolver em tecido adiposo maduro. Células endoteliais, fibroblastos, pré adipócitos e adipócitos sintetizam e secretam, por exemplo, IGF-1 e suas proteínas ligadoras. Como consequência, mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos influenciam o desenvolvimento do tecido adiposo precocemente na vida, por exemplo, através da cascata de sinalização do IGF-1/ receptores IGF-1.<sup>19</sup>

O tecido adiposo branco é detectado em fetos humanos a partir da 14<sup>a</sup> – 16<sup>a</sup> semanas de gestação naquelas regiões onde caracteristicamente se acumula depois do nascimento. O segundo trimestre de gestação parece ser o período crítico da adipogênese. Nesse estágio, agrupamento de células mesenquimais e formação de vasos sanguíneos adjacentes são descritos como os primeiros sinais da adipogênese em humanos. Depois da 23<sup>a</sup> semana de vida intrauterina, o número de lóbulos de gordura nos sítios onde o tecido adiposo caracteristicamente se deposita permanece constante. Nas semanas subsequentes, o tamanho desses lóbulos aumenta e aparece o aspecto multilocular dos adipócitos. Por volta do terceiro trimestre, adipócitos já são

encontrados nos principais locais de deposição de tecido adiposo, mas essas células são relativamente pequenas.<sup>19</sup>

Ao nascimento a gordura corporal corresponde a aproximadamente 16% do peso fetal. Análise de amostras de tecido adiposo colhidas por biópsia mostrou que o aumento da gordura corporal durante os primeiros doze meses de vida de 0,7 para 2,8kg é devido ao aumento no tamanho das células, enquanto o número de células permanece estável. A proporção de tecido adiposo subcutâneo é maior por volta dos nove meses de vida e diminui continuamente até por volta dos seis anos de vida, quando volta a aumentar até a pré adolescência, quando as diferenças entre os sexos se tornam aparentes.<sup>19</sup>

#### Regulação da diferenciação dos adipócitos

Durante a vida fetal e nos primeiros anos de vida o tecido adiposo é composto por diferentes populações celulares: células que contêm lipídeos e também células aparentemente livres de lipídeos, não reconhecidas prontamente como adipócitos. Parcela importante do tecido adiposo nessa fase é formada por essas pequenas células nos estágios iniciais de acumulação de gordura. Presume-se que o acúmulo gradual de tecido adiposo após o nascimento se dá principalmente à custa do aumento do tamanho das células adiposas. Acredita-se que apenas na obesidade grave o número total de células adiposas pode aumentar (até três vezes) mais tarde na vida.<sup>19</sup>



O processo de diferenciação do adipócito leva o adipoblasto a pré adipócito, adipócito imaturo e finalmente ao adipócito maduro. Vários hormônios contribuem nesse processo de diferenciação: catecolaminas, hormônios tireoidianos, insulina, hormônio do crescimento, glicocorticoides e esteroides sexuais. A parada do crescimento da célula, mais que o contato entre as células, é necessária para desencadear o processo de formação de pré adipócitos a partir de adipoblastos. O aparecimento da enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase e a capacidade da célula de acumular triacilglicerol caracterizam a diferenciação completa do adipócito. Vários fatores adipogênicos ou indutores externos são necessários para desencadear o processo final de diferenciação, enquanto fatores antiadipogênicos podem agir em oposição a esses fatores.<sup>19</sup>

### Citocinas

Na década de 1990, a descoberta da leptina caracterizou o tecido adiposo como órgão endócrino e não mais um mero armazenador de energia.<sup>1</sup>

Adipocinas e/ou seus receptores são expressos pela placenta e podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina e, conseqüentemente, com o crescimento fetal. Os níveis da maioria das adipocinas, inclusive a leptina, aumentam com a evolução da gestação (exceto a adiponectina, cujos níveis declinam com o avançar da gravidez).<sup>1</sup>

### **Leptina**

A leptina foi inicialmente descrita como o fator ausente no camundongo *ob/ob*, que tem mutação espontânea no gene da leptina e se torna obeso, hiperfágico, intolerante ao frio e infértil.<sup>20</sup>

A administração de leptina a esses camundongos restaurava seus pesos normais, aumentando a expectativa de que a leptina viria a ser a cura da obesidade. Entretanto, logo se percebeu que as concentrações de leptina eram proporcionais ao índice de massa corporal e que a maioria dos indivíduos obesos apresentava, na verdade, resistência à leptina e altos níveis de leptina circulante.<sup>21,22</sup>

Essas descobertas levaram a uma compreensão diferente das funções da leptina. Foi então proposto que a leptina sinaliza que o armazenamento de gordura está adequado, e que a perda da leptina, como ocorre durante o jejum ou a perda sustentada de peso, funciona para conservar a energia. As características do camundongo deficiente em leptina (*ob/ob*) - hiperfagia, menor atividade física, menor taxa metabólica e infertilidade - são adaptações de um indivíduo desnutrido, permitindo a ele conservar seus recursos.<sup>23</sup>

Assim, compreender o papel da leptina na resposta à desnutrição durante a gravidez pode ser importante na descoberta dos mecanismos da origem da saúde e doença do adulto durante o desenvolvimento (ou *Developmental Origins of Adult Health and Disease - DOHaD*). Já foi demonstrado que tanto a desnutrição quanto a superalimentação materna durante a gestação podem levar à obesidade e a outras consequências negativas para a saúde daquele recém-nascido. Um dos primeiros e mais esclarecedores artigos sobre a evidência de DOHaD é o *the Dutch Hunger*

*Winter Study*, que mostrou que homens cujas mães sofreram restrição nutricional no início da gravidez, mas não no final da gravidez, tinham índices maiores de doenças metabólicas e cardiovasculares quando adultos.<sup>24,25</sup>

A leptina é um polipeptídeo não glicosilado, com 167 aminoácidos e peso molecular de 16 kDa, que pode circular livre ou como um complexo estável com alfa 2-macroglobulina. É secretada pelo tecido adiposo de uma forma pulsátil, usualmente 2 a 3 horas após uma refeição. Os níveis circulantes de leptina refletem diretamente a quantidade de energia armazenada no tecido adiposo, assim, indivíduos obesos tipicamente produzem mais leptina que indivíduos eutróficos. Além disso, leptina é expressa em outros sítios como tecido adiposo marrom, trato gastrointestinal, ossos, pulmões, intestino, rins, fígado, pele, estômago, coração, baço e placenta, sugerindo sua ação pleiotrópica. O padrão de expressão sugere seu envolvimento numa variedade de ações tais como controle do balanço energético, regulação da massa gorda, metabolismo ósseo, manutenção da função reprodutora e da gravidez. A leptina pode atuar também como citocina pró-inflamatória, sendo capaz de estimular diretamente a proliferação e ativação de monócitos e linfócitos T circulantes. Essa ação se deve, provavelmente, à semelhança estrutural entre a leptina e outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6.<sup>1</sup>

A leptina atua como fator de sinalização na regulação do apetite e do peso tanto em humanos quanto em roedores. Os níveis de leptina são maiores nas mulheres do que nos homens, uma vez que as mulheres tem um percentual de gordura corporal maior que os homens, com uma razão gordura

subcutânea/ gordura visceral maior; além disso, os níveis maiores de leptina nas mulheres podem estar relacionados aos esteroides ovarianos.<sup>26</sup>

Em animais adultos o papel da leptina no controle do balanço energético está bem caracterizado. Leptina é primariamente sintetizada no tecido adiposo branco e age como um sinal endócrino das reservas energéticas para o hipotálamo e outros tecidos, em função do apetite, metabolismo e disponibilidade de nutrientes. Na vida adulta, a leptina age no controle do balanço energético, tanto na regulação em longo prazo do peso corporal como num curto prazo na regulação das respostas endócrinas e metabólicas ao jejum. Também foi demonstrado que a leptina está envolvida na atividade do sistema imunológico e no início e manutenção da função reprodutora.<sup>7</sup>

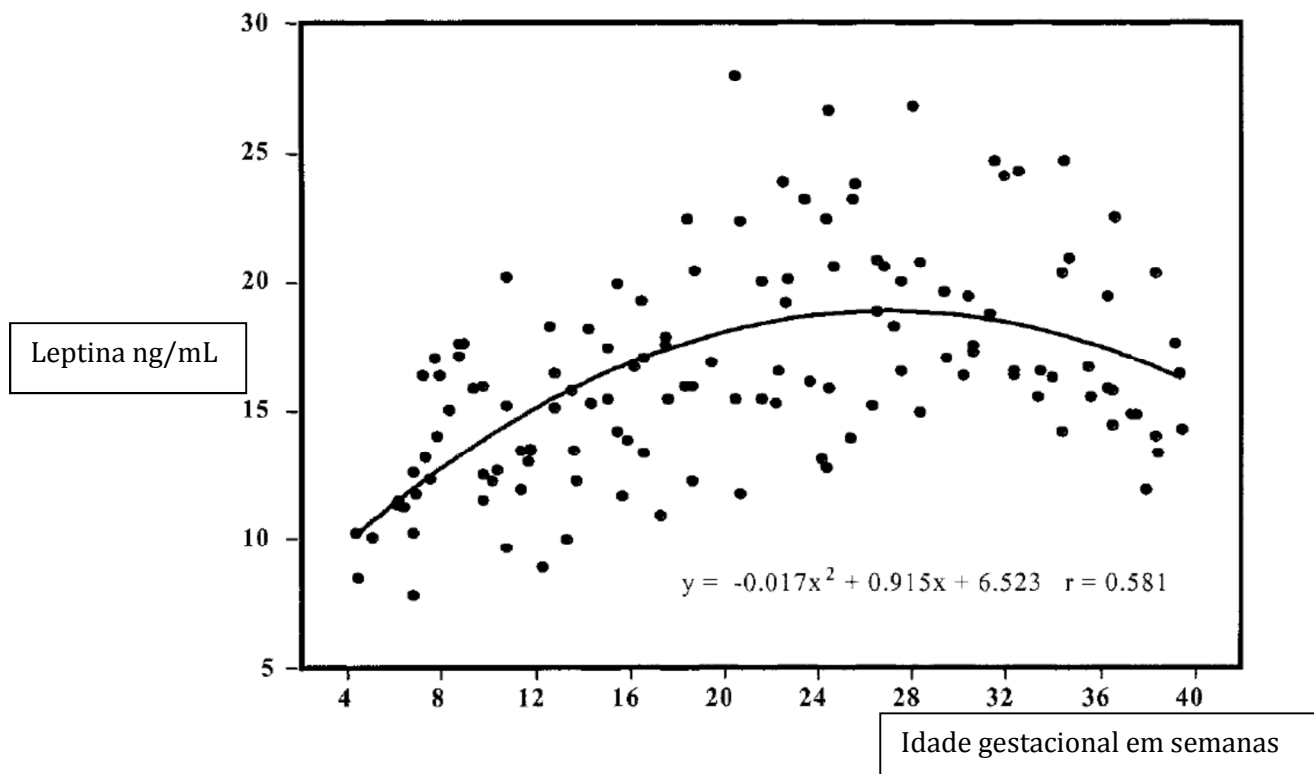
Deficiência congênita de leptina é uma causa rara de obesidade nos primeiros anos de vida. Essa deficiência leva a quadro de hiperfagia acompanhado por insulinemia, hiperlipidemia e outras disfunções metabólicas, neuroendócrinas e imunológicas. Tratamento com leptina recombinante leva à diminuição do apetite e da ingestão alimentar e à completa reversão de alterações hormonais, como o hipogonadismo encontrado em pacientes com deficiência grave de leptina. Polimorfismos no DNA do gene *ob* podem estar ligados a casos de obesidade poligênica. Sequências variantes encontradas na região flanqueadora 5' do gene *ob* foram associadas à obesidade ou com redução do índice de massa corporal após dieta hipocalórica. Variantes genéticas também foram observadas para o receptor de leptina humano.<sup>19</sup>

## Leptina e gravidez

Embora os mecanismos que regulam os pesos da mãe e do feto durante a gravidez não estejam claros, é possível que a leptina tenha papel como fator regulador. As concentrações de leptina aumentam significativamente nas fases iniciais da gestação, sendo 30% maiores com 12 semanas de gestação quando comparadas com níveis pré-gestacionais e voltam a esses níveis imediatamente após o parto.<sup>1,26</sup>

As concentrações de leptina materna começam a aumentar desde o início da gestação e seus valores são maiores que nas mulheres não grávidas, durante toda a gestação. O IMC antes da gestação, mais que a tolerância à glicose na gravidez, é o determinante primário das concentrações séricas de leptina durante a gravidez.<sup>27</sup>

Segundo Henson, a leptina alcança seus maiores valores na metade da gravidez e esses valores estão relacionados com o peso do feto ao nascer. Esse autor sugere ainda que os níveis de leptina podem e devem ser usados como fatores preditivos do peso do feto ao nascimento (figura 3).<sup>28</sup>



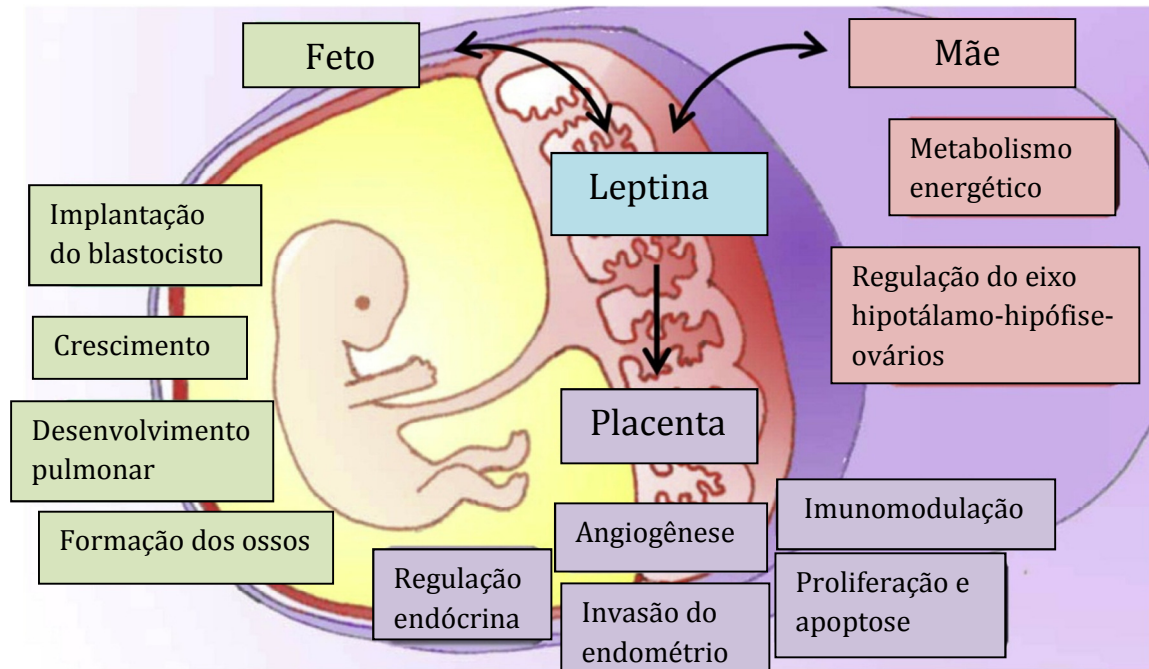
**Figura 3: Concentração sérica de leptina durante a gravidez.<sup>28</sup>**

Schubring mediu a concentração de leptina no líquido amniótico, sangue materno e de cordão umbilical ao termo da gravidez num estudo que analisou gestantes saudáveis que tiveram partos a termo e mulheres saudáveis não grávidas pareadas por idade.<sup>29</sup> Os níveis de leptina eram maiores nas mulheres grávidas do que nas não grávidas, assim como maiores no sangue materno do que no sangue de cordão. Esses autores encontraram a correlação inversa entre o peso da placenta e os níveis maternos de leptina, correlação positiva entre níveis de leptina no sangue de cordão e peso fetal ao nascimento e com o peso da placenta. Não foi encontrada correlação entre níveis maternos de leptina e peso do feto ao nascer. Os níveis de leptina no líquido amniótico correlacionavam-se com os níveis maternos, mas não com os encontrados no sangue fetal, sugerindo que a leptina do líquido amniótico é derivada da mãe. Os altos níveis de leptina encontrados no sangue arterial e venoso do cordão

sugerem que essa seja expressa pelos tecidos fetais e/ou placenta e a queda abrupta desses níveis após o parto poderia ser o principal estímulo para aparecimento do apetite e alimentação do RN.

Luo et al (2012) mostraram que a sensibilidade à insulina do feto estava associada com a leptina do cordão umbilical. Associações semelhantes foram vistas em gestações a termo de mulheres não diabéticas. Os resultados sugeriram impacto materno nos níveis de leptina fetal que poderia ser uma via precoce de transmissão materno-fetal da propensão à obesidade e resistência à insulina.<sup>30</sup>

Atualmente, a leptina é considerada um hormônio multifuncional que regula não apenas o peso corporal, mas também termogênese, angiogênese, hematopoiese, osteogênese, condrogênese, funções imunológicas e neuroendócrinas e a pressão arterial. Há evidências de que a leptina esteja ainda implicada na função reprodutora, regulando a fertilidade, função ovariana, maturação de oócitos, implantação e desenvolvimento do embrião. A leptina derivada da placenta afeta as funções maternas, fetais e placentárias (figura 4): regula o eixo reprodutor e o metabolismo energético da mãe, tem ações na placenta incluindo angiogênese, crescimento e imunomodulação. Atua ainda na implantação, desenvolvimento e crescimento do embrião, desenvolvimento do esqueleto fetal, agindo tanto na diferenciação quanto na proliferação dos condrócitos e osteoblastos. A leptina pode ainda estar associada ao desenvolvimento pulmonar do feto.<sup>10</sup>



**Figura 4: Funções da leptina na mãe e no feto.** Leptina derivada da placenta afeta as funções maternas, fetais e placentárias. Leptina regula o eixo reprodutor e o metabolismo energético da mãe, tem ações na placenta incluindo angiogênese, crescimento e imunomodulação. Atua ainda na implantação, desenvolvimento e crescimento do embrião, desenvolvimento do esqueleto fetal, agindo tanto na diferenciação quanto proliferação dos condrócitos e osteoblastos.<sup>10</sup>

#### Leptina durante o desenvolvimento fetal

Antes do nascimento, o papel da leptina como sinal do estado nutricional do feto e o conceito de “apetite” no ambiente intrauterino não são claros, uma vez que o feto recebe suprimento contínuo de glicose e outros nutrientes.

A leptina pode ser mensurada na circulação fetal em diferentes espécies animais, inclusive seres humanos, desde o início da gestação<sup>28</sup> ou a partir da metade da gestação<sup>31</sup>, segundo diferentes autores. Alguns autores sugerem



que o tecido adiposo fetal é a maior fonte da leptina circulante *in útero*.<sup>31</sup> Entretanto, a leptina plasmática pode também se originar de outros tecidos fetais e placentários.

A leptina e o receptor de leptina estão presentes em tecidos placentários e fetais. Portanto, a leptina pode ter ações locais e endócrinas no feto que podem ser importantes para desenvolvimento e crescimento normal antes do nascimento.<sup>7</sup>

Já ficou claro que a leptina tem papel fundamental na regulação do peso e da massa corporal gorda na vida adulta. Porém, de que maneira os pesos materno e fetal/ neonatal são regulados durante a gestação e no início da vida pós-natal não é ainda conhecida. Altos níveis de leptina são observados nas mulheres durante a gravidez e no sangue de cordão umbilical ao termo. Estudo de Kiess sugere que os altos níveis de leptina ao termo da gestação representam importante indicador da regulação do suprimento energético. Subsequentemente a leptina poderia sinalizar o estado do tecido adiposo durante a gestação e no período neonatal.<sup>19</sup>

A extensão de transporte, síntese e secreção de leptina pela placenta e a contribuição da leptina da mãe e da placenta para os níveis circulantes do feto parecem variar entre as diversas espécies e com o estágio da gravidez.<sup>7</sup>

### Leptina e placenta

A placenta humana expressa quantidades significativas de mRNA da leptina, alguns estudos *in vitro* mostram que ao termo da gestação 98% da leptina placentária é secretada para a circulação materna.<sup>32</sup> Porém, não existe correlação entre a concentração de leptina no plasma materno e no sangue de cordão umbilical ao nascimento.<sup>7</sup>

A expressão de leptina no tecido adiposo do feto é aumentada por diferentes condições intrauterinas, como subnutrição materna, hiperglicemia e hiperinsulinemia fetais crônicas.<sup>7</sup>

Em relação ao seu receptor, tanto a forma longa quanto a forma curta do receptor de leptina são encontradas na placenta. A forma longa do receptor de leptina atua na transdução de sinais e acredita-se que a forma curta do receptor sirva como proteína ligadora no transporte de leptina.<sup>13</sup>

A observação recente de que a placenta expressa leptina e seu receptor sugere que a leptina pode ser potencialmente reguladora das funções do trofoblasto durante a implantação. Esse processo depende da degradação e remodelação da matriz extracelular, mudanças no repertório de moléculas de adesão do trofoblasto e ainda, proliferação e migração das células trofoblásticas e invasão do endométrio. Além disso, é necessário extenso processo angiogênico nas vilosidades placentárias e no endométrio para prover suprimento sanguíneo adequado à unidade feto placentária. Cada um desses passos é finamente regulado por várias moléculas, incluindo moléculas de adesão celular, proteinases e citocinas. As moléculas de adesão estão envolvidas na migração celular. As proteinases estão envolvidas na degradação e remodelação da matriz extracelular, permitindo que o embrião

penetre profundamente na decídua. As proteinases incluem serina proteases, metaloproteinases e colagenases. As citocinas modulam a expressão das moléculas de adesão tanto do lado materno quanto fetal, regulam a expressão de metaloproteinases, estabilizam a interação entre o blastocisto e a superfície uterina e promovem a invasão e diferenciação do trofoblasto.<sup>1</sup>

Está bem estabelecido que a leptina exerce ações parácrinas e/ou autócrinas na placenta. Receptores de leptina são encontrados no trofoblasto e endotélio umbilical durante a gravidez em várias espécies. Algumas ações locais da leptina foram propostas e incluem: ação pró mitogênese e antiapoptose do trofoblasto, estímulo à atividade do sistema de transporte de aminoácidos, produção de interleucina 6, indução da angiogênese, efeito na invasão trofoblástica e modulação da síntese de esteroides placentários.<sup>13</sup>

Leptina e seu receptor estão colocalizados nas células do sinciciotrofoblasto que estão expostas ao sangue materno, células do citotrofoblasto extra vilosas e células endoteliais fetais que estão em contato direto com o sangue fetal.<sup>1</sup>

Estudos *in vitro* sugerem que a leptina promova a invasão trofoblástica através da modulação de vários fatores de crescimento do trofoblasto, incluindo IL-6 e  $17\beta$  estradiol.<sup>33</sup> Há também evidências de que a leptina tenha papel trófico por estimular a progressão da fase G2/S no ciclo celular de células BeWo e JAR, células largamente usadas como modelo do trofoblasto no primeiro trimestre. Essa ação deve-se possivelmente à ativação de vias intracelulares específicas envolvidas na síntese de DNA. Outro estudo mostra diminuição do índice de apoptose em células trofoblásticas tratadas com

leptina.<sup>34</sup> Alguns estudos *in vitro* sugerem ainda efeito da leptina na angiogênese e sugerem possível envolvimento dessa adipocina no processo de formação dos vasos placentários.<sup>1,35,36</sup>

Por volta da metade da gestação a placenta é responsável pela toda a troca de nutrientes e fatores de crescimento entre as circulações materna e fetal e é o principal fator determinante do crescimento fetal. Já foi demonstrado também que a leptina influencia, *in vitro*, várias funções da placenta: diferenciação do trofoblasto, produção de hormônios, invasão trofoblástica e transporte de nutrientes.<sup>37</sup>

O estudo de Schulz<sup>37</sup> compara o desenvolvimento da placenta e o perfil de expressão gênica da placenta em fêmeas de camundongos grávidas divididas em três grupos: 1) controle, 2) grupo submetido à restrição de alimentos e 3) grupo submetido à restrição de alimentos com suplementação de leptina. O grupo trabalhou com a hipótese de que altas concentrações de leptina alteram a resposta adaptativa à restrição alimentar durante a gravidez, principalmente as adaptações placentárias. Comparando os dois grupos que foram submetidos à restrição alimentar, os autores mostraram que o tratamento com leptina preveniu a perda significativa do peso da placenta causada pela restrição de alimentos. A diferença mais importante na expressão gênica entre os dois grupos que sofreram restrição de alimentos foi a superexpressão de genes ribossomais e, em segundo lugar, superexpressão de genes relacionados ao splicing e processamento do RNA no grupo que foi tratado com leptina, corroborando a hipótese de que a leptina estimula a síntese proteica de uma maneira dependente da dose.<sup>37</sup>

O estudo de Castro et al, realizado em nosso meio, mostrou associação entre níveis maternos de leptina e IMC materno, tanto no início quanto ao final da gestação, mas não com o peso do RN, da placenta e índice placentário (razão entre peso da placenta em gramas e peso do RN também em gramas). Por outro lado, nesse estudo, observou-se associação entre o peso do RN e as concentrações de leptina tanto na veia quanto nas artérias umbilicais.<sup>38</sup>

Os níveis de leptina das artérias umbilicais ( $1,80 \pm 0,76 \text{ ng/mL}$ ) são significativamente mais baixos do que os encontrados nas veias umbilicais ( $2,76 \pm 0,98 \text{ ng/mL}$ ) em gestações normais.<sup>26,38</sup>

De forma similar, nos quadros de diabetes gestacional os níveis de leptina nas veias umbilicais ( $4,59 \pm 1,60 \text{ ng/mL}$ ) são maiores que nas artérias umbilicais ( $2,08 \pm 0,90 \text{ ng/mL}$ ). Entretanto os níveis de leptina na veia umbilical estão aumentados em relação aos controles normais. Ainda, nas mulheres diabéticas, mas não nos controles, o peso dos recém-nascidos e as concentrações de leptina no cordão umbilical estão positivamente relacionados aos níveis de insulina no cordão. Esses dados sugerem que há hiperleptinemia na circulação fetoplacentária das mulheres com intolerância aos carboidratos e nesses casos insulina e leptina podem ter papéis antagônicos no desenvolvimento fetal. Os maiores níveis de leptina no sangue de cordão no diabetes gestacional podem sugerir um possível papel da placenta agindo localmente no tecido adiposo fetal. Considerando que o peso dos RN de mães diabéticas estava dentro do normal, sugere-se que, nos casos de diabetes gestacional, níveis adequados de leptina na circulação fetoplacentária podem compensar os níveis aumentados de insulina e prevenir a macrossomia fetal.<sup>26</sup>

A significativa diferença entre as concentrações de leptina entre a veia e as artérias umbilicais sugere que placenta contribui para as concentrações de leptina na circulação fetoplacentária e aponta para um papel da leptina no desenvolvimento fetal. Tem sido sugerido que a leptina regula o desenvolvimento e o crescimento do feto influenciando a proliferação ou função do trofoblasto.<sup>26</sup>

O gene *ob* é expresso na placenta e, segundo alguns autores, há evidências de que a placenta seja uma das maiores fontes da leptina fetal durante a gestação normal. Assim, em caso de hiperleptinemia materna, a placenta parece ser o sítio para regulação da leptina *in utero*.<sup>26</sup>

A produção de leptina pela placenta está aumentada em algumas condições patológicas, como a pré eclâmpsia.<sup>26</sup>

Por outro lado, o peso molecular da leptina é 16000kDa e moléculas com peso maior que 500kDa usualmente não atravessam a barreira placentária. Entretanto, não se pode excluir completamente a possibilidade de passagem de leptina materna para o feto. Alguns autores acreditam que 98% da produção de leptina pela placenta sejam lançados no sangue materno e apenas 2% atinjam a circulação fetal. Dessa forma o tecido adiposo fetal seria a principal fonte de leptina para o feto.<sup>30</sup>

### Leptina e o feto

A síntese e a concentração de leptina circulante no útero são influenciadas pelos nutrientes, hormônios e fatores genéticos. A leptina pode

ser um entre os hormônios, incluindo insulina, glicocorticoides e hormônios tireoidianos, que sinalizam mudanças no meio ambiente intrauterino e que atuam no crescimento e desenvolvimento dos tecidos fetais.<sup>7</sup>

A presença de receptores de leptina no feto em desenvolvimento, especialmente nos ossos e cartilagens, levou a se pensar que a leptina está envolvida no controle do crescimento fetal.<sup>7</sup>

Concentrações baixas de leptina foram encontradas em RN pequenos para a idade gestacional, enquanto níveis altos de leptina ocorreram em RN macrossômicos filhos de mães diabéticas.<sup>39</sup> É difícil determinar se a quantidade de leptina *in utero* é um regulador fisiológico do crescimento fetal ou se simplesmente reflete a massa de tecido adiposo e placentário, e/ou a concentração de insulina na circulação fetal.<sup>7</sup>

Enquanto a evidência de que a leptina é fator de crescimento antes do nascimento permanece inconclusiva, a relação entre a leptina circulante e tamanho do feto, especialmente da massa adiposa, sugere que a leptina sinaliza as reservas energéticas *in utero*, assim como na vida adulta.<sup>7</sup>

A leptina derivada da placenta pode ter papel importante no controle do crescimento e função da própria placenta e, conseqüentemente, no crescimento do feto. Além disso, a leptina parece estar envolvida no estabelecimento da rede neural que regula o comportamento alimentar na vida pós natal.<sup>7</sup>

Em condições normais, a leptina pode ser responsável pela supressão da produção endógena de glicose *in utero* quando o tecido adiposo está

aumentando no final da gestação e a nutrição transplacentária é suficiente para as necessidades energéticas do feto. Em RN macrossômicos, filhos de mães diabéticas, entretanto, a hiperleptinemia pode contribuir para a hipoglicemia neonatal prejudicando a capacidade de glicogenólise e gliconeogênese ao nascimento.<sup>7</sup>



---

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/ UFMG) em 08/04/2011 (parecer número ETIC 0650.0.203.000-10), pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG, pela Unidade Funcional Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia do HC/UFMG e pelo Núcleo de Ensino e Pesquisa do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

### **5.1 Caracterização das voluntárias**

Vinte e sete voluntárias foram recrutadas na maternidade do Hospital das Clínicas da UFMG e do Hospital Risoleta Tolentino Neves no período de maio de 2011 a junho de 2012. Foram incluídas pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, com gestação única a termo, de risco habitual (sem hipertensão, diabetes ou outras doenças), não tabagistas e que não estivessem em uso de medicação anti-inflamatória. Duas parturientes foram excluídas do estudo devido à não obtenção da concentração de leptina circulante, restando 25 gestantes no grupo total.

Às pacientes, depois de admitidas na maternidade para o parto, foi solicitado que permitissem a coleta de amostra de sangue periférico e, após o parto, de fragmento de tecido placentário e sangue da veia e das artérias umbilicais. Todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

As parturientes foram separadas em dois grupos, segundo o nível de leptina plasmática. As pacientes com leptinemia abaixo da média, ou seja, leptinemia < 20ng/mL foram alocadas no grupo leptinemia baixa e aquelas com leptina acima desse valor foram alocadas no grupo leptinemia alta.<sup>40</sup>

## **5.2 Amostras de sangue e placenta**

As amostras de sangue foram recolhidas em frascos estéreis, sem anticoagulante e conservadas em gelo. Após centrifugação, o soro foi guardado em freezer à temperatura de -80°C.

As amostras de placenta para realização de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) e ELISA foram recolhidas em recipientes livres de RNase e DNase, conservadas em gelo para transporte e armazenadas à temperatura de -80°C. As amostras para histologia foram recolhidas em recipientes contendo formol ou dimetilsulfóxido (DMSO).

Dos prontuários das pacientes foram colhidas informações a respeito do acompanhamento pré-natal (altura, peso pré-gestacional, peso ao final da gestação, evolução da pressão arterial durante a gravidez, intercorrências, uso de medicamentos). Após o parto foram registrados os dados referentes ao recém-nascido: sexo, peso, comprimento e índice de Apgar. Este último é um parâmetro para avaliar as condições gerais do recém-nascido no primeiro e quinto minuto após o nascimento. É composto de cinco elementos que recebem pontuação de 0 a 2, totalizando 10 pontos. Os sinais avaliados são a cor da pele, a frequência cardíaca, a irritabilidade reflexa, a respiração e o

tônus muscular. O índice de Apgar acima de 7 denota boas condições do recém-nascido, enquanto índices abaixo desse nível denotam algum grau de comprometimento fetal. Para a análise de nossas gestantes o índice de Apgar de um recém-nascido do grupo leptinemia baixa e outro do grupo leptinemia alta índices foram excluídos por serem muito baixos em relação aos demais, (índice de 3 e 5,5 no primeiro minuto, respectivamente), o que poderia ser o reflexo de outras condições não incluídas naquelas previstas neste estudo.

A concentração de leptina do sangue periférico da mãe e do sangue da veia e das artérias umbilicais foi medida através de ELISA.

A expressão de leptina e receptor de leptina na placenta foi avaliada por RT-PCR.

### **5.3 Dosagem da concentração de leptina por ELISA**

A concentração de leptina foi dosada no soro derivado do sangue materno, no soro derivado do sangue das artérias e veia umbilical e na placenta e expressos em ng/mL. Na dosagem placentária, a concentração de leptina foi normalizada por proteína e dosada pelo método de Lowry<sup>41</sup> para permitir a comparação entre os grupos. Para isso, a amostra de placenta foi limpa com PBS1x, pesada em balança analítica e homogeneizada com solução de extração de citocinas (BSA 0,05%; Aprotinina 0,02µL/mL; cloreto de benzetônio 0,05mg/mL, NaCl 0,023mg/mL; EDTA 0,37mg/mL; PMSF 0,02mg/mL, Tween20 0,5µL/mL em PBS1x), centrifugado a 10000rpm por 10

minutos a 4°C e o sobrenadante foi usado no ensaio de ELISA e para a dosagem de proteínas.

O ensaio de ELISA, com duração de três dias, foi feito com kits de anticorpos (R&D Systems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, no primeiro dia a placa de 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura e incubada em câmara úmida no escuro a 4°C por 24 horas. No segundo dia, após lavar a placa seis vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi feito o bloqueio com PBS1x acrescido de albumina bovina a 1% (Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada duas vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), as amostras foram adicionadas e foi feita incubação durante a noite em câmara úmida no escuro a 4°C. No terceiro dia, após lavar a placa seis vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi acrescentado o anticorpo de detecção e feita incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro a 4°C; a placa foi lavada seis vezes, foi acrescentada estreptavidina e feita incubação por 45 minutos. A placa foi novamente lavada por seis vezes, foi então acrescentado o cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma), as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a reação foi parada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm.

Para a determinação da leptina retida no feto a leptinemia da artéria umbilical foi subtraída da leptinemia da veia umbilical e o resultado expresso em ng/mL.

#### **5.4 Dosagem de proteína na placenta (método de Lowry)**

Os homogenatos preparados como descritos anteriormente foram diluídos 1:50 com água deionizada e homogeneizadas. Foram adicionados a cada tubo 250µL de solução 1:100 de tartarato de sódio em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 25µL de reagente de Folin 1:2 (diluído em água deionizada); os tubos foram agitados e pausados por 30 minutos. As amostras foram então plaqueadas e lidas no espectrofotômetro a 660nm.<sup>41</sup>

#### **5.5 Análise da expressão de RNA em placenta.**

Foi avaliada a expressão de leptina e receptor de leptina na placenta por meio de PCR em tempo real.

##### **5.5.1 Isolamento de RNA**

As amostras foram descongeladas em gelo, colocadas em trizol (1mL para 50g de tecido) e homogeneizadas. A seguir foi adicionado clorofórmio (0,2mL em cada tubo) e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos. A seguir, foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para tubo contendo 0,5mL de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e colocados à temperatura de -80°C por 30 minutos para facilitar a precipitação do RNA. As amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado com etanol 75% (1mL de etanol para 1mL de trizol). Seguiu-se então nova centrifugação a 13000 rpm a 4°C por 10 minutos. O etanol foi removido e o pellet deixado para secar por 10 minutos. Foram

adicionados 100µL de água livre de RNase em cada um dos tubos, homogeneizando-se com a pipeta. Os *pellets* foram então incubados por 10 minutos e as amostras foram recolocadas em gelo. Foi separada uma alíquota de 5µL para a quantificação (NanoDrop ND-100 UV/Vis (NanoDrop Technologies, USA) e visualização em gel de agarose desnaturante 1% de RNA e o restante da amostra foi estocado a -80°C.

### **5.5.2 Preparação e amplificação do cDNA**

Para a produção do cDNA, o RNA extraído anteriormente foi diluído para a concentração 0,2µg/µL em água livre de RNase e DNase. Para 10µL de RNA a 0,2µg/µL foi adicionado 1µL de Oligo dT 50uM e 2,5µL de água livre de RNase e DNase. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados no termociclador (PCR System 9700 – Applied Biosystems) a 72°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura 6,7µL do segundo mix, composto de 4uL de MMLV5x tampão, 1uL de MMLV RT (200uni/amostra), 1uL de dNTPs 10mM, 0,2uL de RNAsin e 0,5uL de água livre de RNase e DNase. Os tubos foram colocados no termociclador a 42°C por 3 horas; em seguida a 72°C por 15 minutos e armazenados a -20°C para posterior uso para RT-PCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real).

### **5.5.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)**

As amostras de cDNA foram descongeladas em gelo. Foi preparada mistura contendo 5µL de Syber Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix da Applied Biosystems), primers senso (0,75µL) e antissenso (0,75µL) (Leptina – primer senso: 5'-TTCTTGTTGGCTTTGGCCCTA-3' e primer antissenso: 5'-

TGTCATTGATCCTGGTGACAA-3'; receptor de leptina – primer senso: 5'-GCTATTTTGGGAAGATGTTCCG-3' e primer antissenso: 5'-TGCTTGATAAAAAGATGCTCAA-3'; beta-actina – primer senso: 5'-ATCCCCCAAAGTTCACAATG-3' e primer antissenso: 5'-GTGGCTTTTAGGATGGCAAG-3') e água MiliQ (1µL) para cada amostra. A ciclagem de temperaturas para a reação de PCR foi feita em placas de 384 poços. Em cada poço da microplaca foram colocados 7,5µL da mistura contendo o Syber Green e os respectivos primers e 2,5µL de cDNA não diluído. A microplaca foi colocada no aparelho de RT (ABI 7900 HT Fast PCR Real Time System da Applied Biosystems), por 10 minutos a 95°C para desnaturação, seguidos de 45 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C para anelamento e extensão.

### **5.6 Análise histológica**

Os fragmentos de tecido placentário foram conservados em blocos de parafina e as lâminas para histologia preparadas a partir destes. Para realização da imunofluorescência os cortes foram desparafinados pela lavagem com xilol (três lavagens de 10 minutos) e etanol 100% (duas lavagens de 10 minutos). Em seguida as lâminas foram incubadas em solução de saponina 0.05% em água deionizada por 30 minutos em temperatura ambiente para revelação dos epitopos. O bloqueio dos antígenos inespecíficos foi feito com BSA a 1% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com o anticorpo primário (Ob A-20, Santa Cruz) diluído 1:100 com solução de BSA 0,1% e saponina 0.05% e incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente. Após três lavagens com solução de bloqueio (a mesma



especificada acima), as lâminas foram cobertas com o anticorpo secundário (Alexa fluor 546 anti goat diluído 1:200) e incubadas no escuro por 60 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação as lâminas foram novamente lavadas como descrito anteriormente. Em seguida, foi colocado meio de montagem contendo DAPI, as lâminas foram então cobertas com lamínulas e levadas ao microscópio de fluorescência.

### **5.7 Análise estatística**

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos resultados. Para detecção de outliers, foram utilizados o teste de Grubbs (amostras que seguem a normalidade) ou o teste Box-Plot (amostras não normais). Para avaliar diferenças entre os grupos foi feito teste t ou Mann-Whitey para amostras com distribuição normal ou não normal, respectivamente. Para dados não paramétricos foram usados teste de Fisher ou Qui-quadrado. O coeficiente de correlação (Pearson ou Spearman) foi calculado e interpretado de acordo valor de  $\rho$  (- ou +), sendo fraca quando entre 0,00 a 0,39; moderada quando entre 0,40 a 0,69 e forte quando acima de 0,70. Um nível de significância de 5% foi estabelecido. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados são apresentados em média e erro padrão ou mediana com máximo e mínimo.



## **6. RESULTADOS**

---

---

## RESULTADOS

### 1- Características gerais das gestantes:

Foram avaliadas 25 parturientes, atendidas em maternidades públicas, com idade média de 28 anos e IMC médio de 22,5kg/m<sup>2</sup>. Os partos ocorreram, em média, durante a 39<sup>a</sup> semana de gestação, sendo 12,8kg a média de ganho de peso das gestantes (tabela 3). Das gestantes estudadas cinco não eram classificadas como eutróficas de acordo com o IMC, três delas com IMC < 18,5 kg/m<sup>2</sup> e duas com IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>.

A maioria dos partos foi por cesariana (12 – 48%), seguido por parto normal (9 – 36%) e outros 4 partos (16%) necessitando fórceps. Apesar dos diferentes tipos de parto, apenas 2 (8%) dos RN apresentaram Apgar menor que 7 na avaliação de 1 e 5 minutos.

Os recém-nascidos, em sua maioria meninas (n=14 ou 56%), apresentaram peso e comprimento dentro das variações de normalidade, exceto por 3 (12%) para o peso e 1 (4%) para comprimento (tabela 4). Esses dados mostram que a população estudada era homogênea e composta, na sua maioria, por RN com peso e comprimento normais (Tabela 4).<sup>42</sup>

**Tabela 3: Características gerais das gestantes (n=25)**

<b>DADOS DAS PARTURIENTES E RN</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>SE</b>	<b>MÍNIMO - MÁXIMO</b>
<b>Dados das parturientes</b>			
IMC	22,47	0,62	16,7 - 29,5
Idade (anos)	28,7	1,3	18,0 - 44,0
Idade gestacional (semanas)	39,3	0,23	37,0 - 41,0
Altura (m)	1,60	0,01	1,49 - 1,69
Peso Pré-gestação (kg)	57,35	1,66	42,00 - 76,50
Peso final (kg)	70,18	1,70	51,00 - 91,30
Ganho de peso (kg)	12,83	0,59	7,20 - 21,50
Ganho peso sem RN (kg)	9,90	0,68	4,87 - 18,34
% Ganho (relativo peso inicial)	22,89	1,30	13,33 - 39,45
PA Sistólica (mmHg)	118,00	7,54	105,0 - 140,00
PA Diastólica (mmHg)	86,88	5,38	60,00 - 90,00
<b>Dados dos recém-nascidos</b>			
Peso (kg)	3,15	0,08	2,34 - 4,34
Comprimento (cm)	45,9	0,44	34,0 - 51,5
Apgar (média 1 e 5 min)	8,85	0,30	3,00 - 10,00

**Tabela 4: Parâmetros qualitativos relativos às mães e recém-nascidos:**

Parâmetro	Nível comparado com a normalidade (% em relação ao grupo total)					
	Abaixo		Normal		Acima	
	n	%	n	%	n	%
IMC pré-gestacional	3	12	20	80	2	8
Ganho de Peso	4	16	18	72	3	12
Peso do recém-nascido	2	8	22	88	1	4
Comprimento do recém-nascido	1	4	24	96	0	0

## **2- Dados relativos à produção e concentração de leptina:**

Analisando a população geral das 25 parturientes, observa-se que a média da leptina circulante é 20,5 ng/mL. Observa-se ainda que a leptina que chega ao feto pela veia umbilical é cerca de 1/3 da concentração de leptina circulante materna e que apenas 1/3 da leptina que chega ao feto é retida por ele (tabela 5).

---

---

**Tabela 5: Leptina no sangue materno e de cordão, leptina placentária**

	<b>Média (SE)</b>	<b>Mínimo - Máximo</b>
Leptina sangue materno (ng/mL)	20,5 (2,93)	2,13 - 63,5
Leptina veia umbilical (ng/mL)	6,6 (0,99)	0,64 - 21,9
Leptina artéria umbilical (ng/mL)	4,7 (0,96)	1,02 - 16,3
Leptina retida (veia-artéria) (ng/mL)	1,9 (0,55)	0,15 - 9,4
Leptina placentária (ng/g proteína)	5,4 (2,09)	0,87 - 48,9
Expressão leptina (exp. relativa)	3,33 (1,63)	0,02 - 31,00
Expressão receptor ObRb (exp. rel.)	1,26 (0,30)	0,28 - 3,06

---

### **3- Correlações entre os parâmetros de todas as parturientes:**

A seguir foram avaliadas as possíveis correlações entre os diversos parâmetros e a leptina circulante na mãe.

Foram observadas correlações positivas apenas com dados relativos ao peso e IMC pré-gestacionais e com o peso materno ao final da gravidez (tabela 6). Os dados mostraram que os níveis de leptina maternos e placentários não se correlacionaram entre si. Porém, a leptinemia materna foi positivamente correlacionada com dados antropométricos da gestante. A concentração de leptina na placenta, por sua vez, foi correlacionada apenas com a sua

expressão no mesmo órgão e com parâmetros relacionados ao peso materno no início da gravidez (Tabela 6). Os níveis de leptina no sangue da veia umbilical, mas não no sangue das artérias, foi negativamente correlacionado com a média do Apgar.

**Tabela 6: Coeficientes de correlações significativas ( $p < 0,05$ ) com a leptinemia materna.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Leptina Mãe</b>	<b>Leptina Veia</b>	<b>Leptina Artéria</b>	<b>Leptina Placenta</b>
Peso pré-gestacional	0,469	-	-	0,325
Peso final	0,539	-	-	-
Leptina veia	-	-	0,726	-
Leptina artéria	-	0,726	-	-
Expressão de leptina	-	-	-	0,905
Apgar	-	-0,383	-	-

Correlação de Pearson (dados normais). Ob-Rb: receptor B de leptina.

#### **4-Análise considerando níveis circulantes de leptina maiores ou menores que 20ng/mL:**

---

---

Após caracterização da amostra total, as parturientes foram separadas em dois grupos, segundo o nível de leptina sérica, ou seja, aquelas com leptinemia < 20ng/mL foram alocadas no grupo leptinemia baixa e aquelas com leptina acima desse valor foram alocadas no grupo leptinemia alta.<sup>40</sup>

Comparando os grupos, foi observado que idade das parturientes com leptinemia alta foi significativamente maior. O peso pré-gestacional, o IMC e o peso ao final da gravidez também foram significativamente maiores naquelas com leptinemia alta (tabela 7).

Não foram observadas diferenças entre os grupos para ganho de peso gestacional, percentual de ganho de peso, idade gestacional e pressão arterial (tabela 7).

**Tabela 7: Caracterização materna segundo a de leptinemia**

Características	Leptinemia	Leptinemia	Valor de <i>p</i>
	Baixa	Alta	

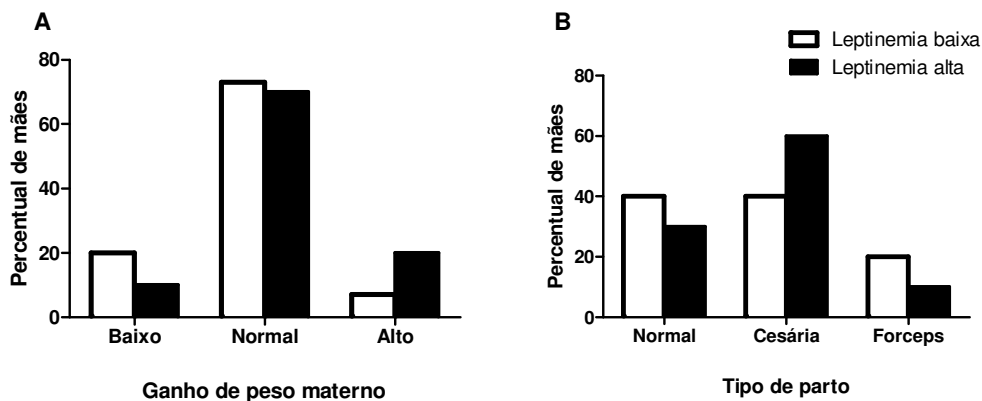


Número de gestantes	15	10	
Leptinemia (ng/mL)	10,97 ± 1,53	34,72 ± 3,79	<b>&lt;0,001</b>
Idade (anos)	24,67 ± 1,14	33,3 ± 2,09	<b>&lt;0,001</b>
Peso pré gestacional (kg)	54,42 ± 2,03	63,5 ± 3,0	<b>0,015</b>
IMC pré gestacional (kg/m <sup>2</sup> )	20,88 ± 0,73	25,47 ± 1,0	<b>0,001</b>
Peso ao final da gravidez (kg)	67,25 ± 2,06	76,88 ± 2,99	<b>0,025</b>
Ganho de peso (kg)	12,83 ± 0,89	13,35 ± 0,62	0,67
Idade gestacional (semanas)	39,1 ± 0,3	39,9 ± 0,3	0,13
Pressão arterial sistólica (mmHg)	116,8 ± 2,75	118,5 ± 4,94	0,75
Pressão arterial diastólica (mmHg)	76,4 ± 2,48	77,0 ± 2,49	0,95

Resultado expresso em média ± erro padrão. Teste t ou Mann-Whitney.

De acordo com a classificação do ganho de peso materno, pela tabela do *Institute Of Medicine*,<sup>8</sup> no grupo leptinemia baixa, três (20%) mulheres apresentaram ganho de peso abaixo do esperado e uma (7%) acima do esperado. Já no grupo leptinemia alta, uma paciente (10%) apresentou ganho de peso abaixo do esperado e duas (20%) apresentaram ganho acima do esperado (figura 5A).

Com relação ao tipo de parto, no grupo leptinemia baixa 3 partos foram normais, 6 foram cesarianas e 1 necessitou fórceps, enquanto no grupo de leptinemia alta, 6 partos foram normais, 6 cesarianas e 3 partos com fórceps (Figura 5B).



**Figura 5: Classificação do ganho de peso materno (A), e do tipo de parto (B).** Resultado expresso em percentual do n total (n=15 para leptinemia baixa e n=10 para leptinemia alta). Sem diferença estatística entre os grupos (Qui-quadrado).

Dos 25 recém-nascidos, 11 foram do sexo masculino (oito no grupo leptinemia alta e três no grupo leptinemia baixa), e 14 do sexo feminino (sete em cada grupo). Não houve diferenças entre o número de recém-nascidos femininos ou masculinos de acordo com o nível de leptinemia (Tabela 8). Não foram detectadas diferenças no peso e comprimento ao nascer entre os grupos. Entretanto foi observado menor Apgar nos recém-nascidos de parturientes do grupo leptinemia alta (tabela 8).

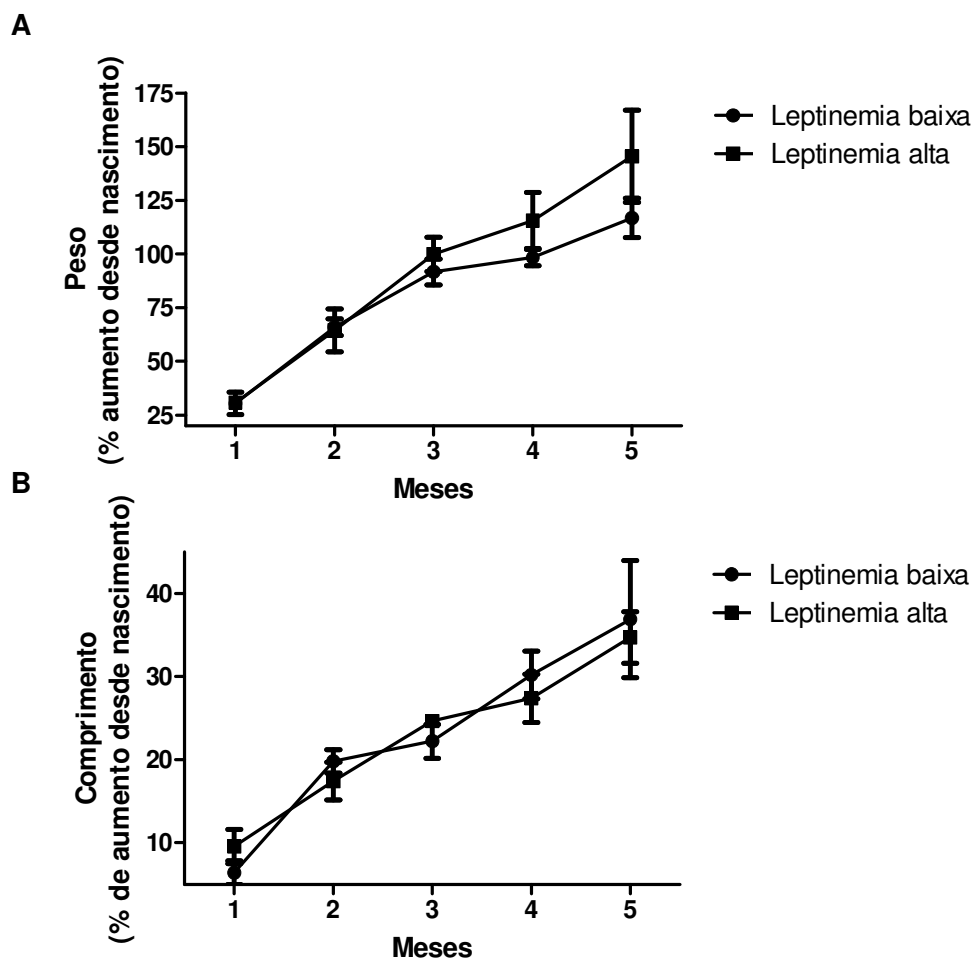
**Tabela 8: Caracterização dos recém-nascidos**

	Leptinemia baixa (n=15)	Leptinemia alta (n=10)	<i>p</i>
Sexo (masculino/feminino)*	8/7	3/7	0,41

Peso (kg) <sup>#</sup>	3,18±1,13	3,08±0,10	0,62
Comprimento (cm) <sup>#</sup>	48,6±0,6	48,8±0,5	0,84
Apgar <sup>&amp;</sup>	9,4±0,95	8,6±0,41	<b>0,038</b>

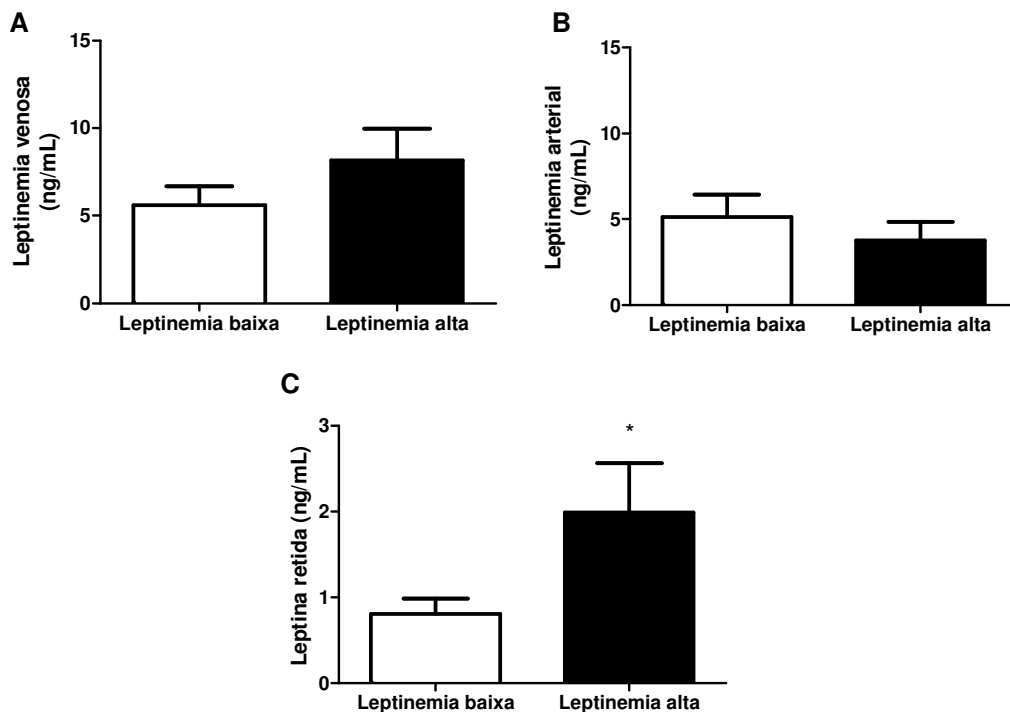
Resultado expresso em média ± erro padrão. \* Teste de Fisher, <sup>#</sup>Teste t ou <sup>&</sup>Mann-Whitney.

O crescimento (peso e comprimento) dos recém-nascidos nos primeiros cinco meses de vida, também foi avaliado, não havendo diferença entre os grupos (figura 6).



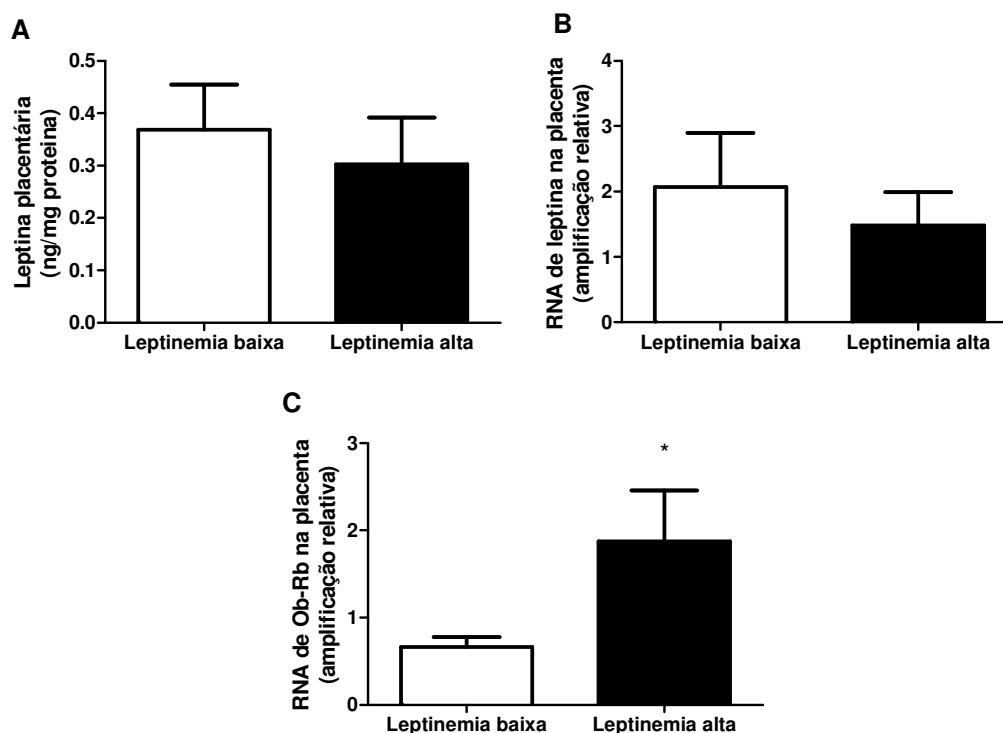
**Figura 6: Peso (A) e comprimento (B) das crianças nos primeiros meses de vida.** n=3-7 para cada grupo, para cada tempo. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste t. Sem diferença estatística, comparação área sob a curva.

Nosso próximo passo foi a avaliação das concentrações de leptina no sangue do cordão umbilical. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quando as concentrações de leptina na veia ou nas artérias umbilicais foram analisadas. Entretanto, quando se observa a leptina retida no feto (diferença entra a leptina da veia e das artérias), observa-se aumento significativo no grupo leptinemia alta (figura 7).



**Figura 7: Leptinemia no cordão umbilical.** **A:** Leptinemia na veia umbilical (n= 15 para leptinemia baixa e n=10 para leptinemia alta), p=0,19. **B:** Leptinemia na artéria umbilical (n= 14 para leptinemia baixa e n=6 para leptinemia alta), p=0,77. **C:** Leptina retida pelo feto (leptinemia venosa – leptinemia arterial) (n= 10 para leptinemia baixa e n=5 para leptinemia alta), **p=0,026**. Dosado por ELISA. Resultados expressos em média ± erro padrão. Teste t ou Mann-Whitney. \* estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

Após a análise da leptina do cordão, foi realizada a avaliação da expressão e concentração da leptina placentária e a expressão do seu receptor (ObRb) na placenta. Quanto à concentração e expressão de leptina, não houve diferença estatística entre os grupos. A expressão do receptor de leptina (ObRb), por sua vez, foi maior nas placentas do grupo leptinemia alta (figura 8).



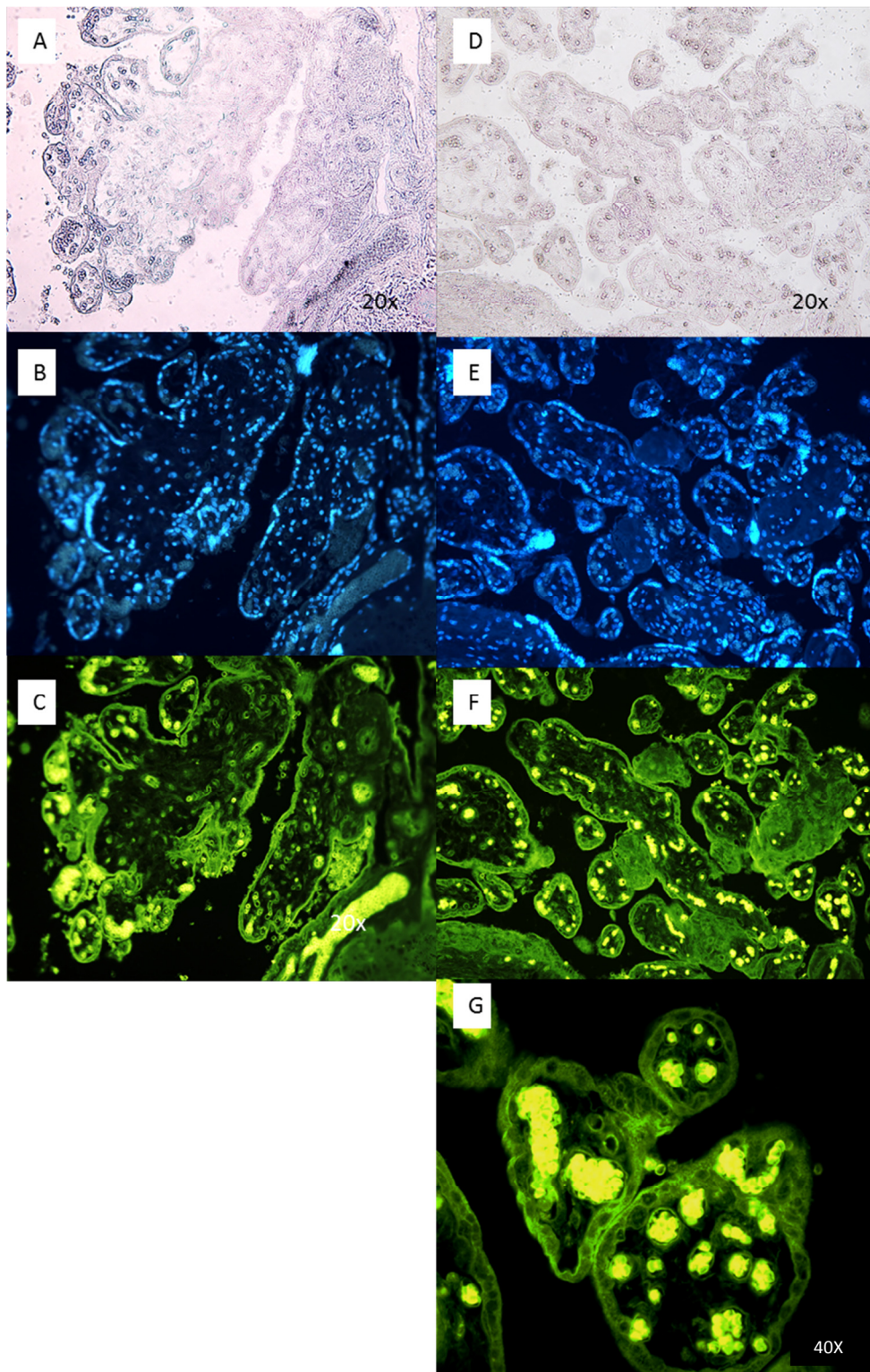
**Figura 8: Leptina placentária.** **A:** Concentração de leptina na placenta, dosado por ELISA, em ng de leptina por mg de proteínas (n=12 para leptinemia baixa e n=8 para leptinemia alta), p=0,25. **B:** Expressão de RNA de leptina na placenta, dosado por PCR em tempo real, em amplificação relativa (n=12 para leptinemia baixa e n=6 para leptinemia alta), p=0,27 **C:** Expressão de mRNA de

---

---

receptor de leptina (Ob-Rb) na placenta, dosado por PCR em tempo real, em amplificação relativa (n=6 para leptinemia baixa e n=4 para leptinemia alta), **p=0,05**. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste t ou Mann-Whitney.

Para melhor visualização da leptina placentária e sua distribuição no tecido foi realizada imunofluorescência qualitativa (figura 9). Observa-se a presença da leptina em áreas específicas e delimitadas, na periferia do tecido e nos locais de vasculatura. Não foi possível detectar diferenças na concentração ou distribuição dessa adipocina entre os grupos.



**Figura 9: Imunofluorescência para leptina na placenta.** A a C: grupo leptinemia baixa e D a F grupo leptinemia alta. **A, D:** imagem em microscópio de luz; **B, E:** fluorescência do núcleo da célula corada com DAPI.; **C, F:** leptina corada com anticorpo Ob A-20, Santa Cruz e Alexa fluor 546. **G:** maior aumento mostrando a concentração de leptina em células específicas.

---

---

A seguir foram realizados testes de correlação entre parâmetros nos dois grupos. Os resultados são apresentados nas tabelas 9 e 10.

**No grupo de gestantes com leptinemia baixa:**

Nenhuma correlação foi vista entre os diversos parâmetros e a leptinemia materna nesse grupo (Tabela 9). Correlações positivas entre a leptina na veia e artérias umbilicais e entre a concentração e expressão da leptina na placenta são algumas das poucas correlações vistas. Além dessas, apenas a concentração de leptina placentária correlacionou-se positivamente com dados antropométricos da mãe (peso pré-gestacional e IMC).

**Tabela 9:** Coeficientes de correlação estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) entre os diversos parâmetros e leptina no sangue materno, do cordão e placenta nas parturientes com **leptinemia baixa**



<b>Parâmetro</b>	<b>Sangue materno</b>	<b>Veia</b>	<b>Artéria</b>	<b>Placenta</b>
Peso pré-gestacional	-	-	-	<b>0,581</b>
IMC	-	-	-	<b>0,523</b>
Leptina veia	-		<b>0,572</b>	-
Leptina artéria	-	<b>0,572</b>		-
Expressão Leptina	-	-	-	<b>0,963</b>

Correlação de Pearson (dados normais) ou Correlação de Spearman (dados não normais). IMC: Índice de massa corporal; Ob-Rb: receptor B de leptina.

#### **No grupo de gestantes com leptinemia alta:**

Nas gestantes que apresentaram leptinemia alta, as correlações foram mais frequentes. A correlação positiva entre a concentração de leptina na placenta e o peso e IMC maternos vistos no grupo leptinemia baixa, são também vistos nas gestantes do grupo leptinemia alta. A concentração de leptina no sangue materno mostra ainda correlação positiva com o IMC pré-gestacional. Além disso, o receptor de leptina na placenta correlacionou-se negativamente com a leptinemia materna, sendo que maiores os níveis circulantes de leptina, menor a expressão do seu receptor na placenta (tabela 10).

O peso do feto ao nascer correlacionou-se positivamente com os níveis de leptina tanto da artéria quanto das veias umbilicais, mas não com a leptinemia materna. O índice de Apgar correlacionou-se negativamente com os níveis de leptina da veia umbilical.

**Tabela 10:** Coeficientes de correlação estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) entre os diversos parâmetros e leptina no sangue materno, do cordão e placenta nas parturientes com **leptinemia alta**.

<b>Parâmetro</b>	<b>Sangue materno</b>	<b>Veia</b>	<b>Artéria</b>	<b>Placenta</b>
Peso pré-gestacional	<b>0,612*</b>	-	<b>0,776</b>	<b>0,625</b>
IMC	<b>0,724</b>	-	<b>0,825</b>	<b>0,672</b>
Leptina veia	-	-	<b>0,759</b>	-
Leptina artéria	-	<b>0,759</b>	-	-
Expressão de ObRb	<b>-0,941</b>	-	-	-
Peso ao nascimento	-	<b>0,637</b>	<b>0,788</b>	-
Apgar	-	<b>-0,751</b>	-	-

\*  $p = 0.06$ . Correlação de Pearson. IMC: Índice de massa corporal; Ob-Rb: receptor B de leptina.



## **7. DISCUSSÃO**

---

---

## DISCUSSÃO

### **Análise do grupo total de parturientes:**

Apesar das diversas funções já descritas para a leptina, seu papel durante a gestação ainda não está completamente esclarecido. Nesse estudo, nosso objetivo era tentar esclarecer alguns aspectos relacionados à leptina durante a gravidez. Nosso estudo analisou gestantes que se apresentavam - tanto no momento do parto como durante a gestação - saudáveis e, em sua maioria, eutróficas. Nota-se que a maioria delas teve filhos que nasceram com peso e comprimento adequados.

A média de leptinemia encontrada em nossas gestantes está de acordo com os trabalhos da literatura: em torno de 20ng/mL.<sup>40</sup> Esses valores são comparáveis àqueles encontrados nas mulheres obesas não grávidas.<sup>43</sup> Estudos<sup>43,44</sup> mostram que os níveis de leptina aumentam continuamente durante a gestação. No momento do parto, as concentrações de leptina são maiores em mulheres grávidas (20,0±13,2 ng/mL) do que nas mulheres não grávidas (média de 5,5 ng/mL).<sup>29,43-45</sup> As concentrações de leptina no sangue da veia e das artérias umbilicais (9,7±9,4ng/mL e 8,9±8,6ng/mL respectivamente) também são altas.<sup>19,45</sup> Em nosso estudo encontramos níveis médios mais baixos para a leptina na veia e artérias umbilicais do que os descritos na literatura,, embora nos estudos seja ampla a variação desses níveis, o que pode justificar as diferenças nas médias aqui encontradas em relação às da literatura.

Foi observada correlação positiva entre a leptina materna e os dados antropométricos da mãe tanto no início quanto ao final da gestação (tabela 6),

---

---

concordando com os estudos de Castro e colaboradores.<sup>38</sup> Essa correlação sugere que o peso corporal e, provavelmente, o ganho de adiposidade são fatores importantes para o aumento dos níveis de leptina circulantes.<sup>19, 27</sup>

Embora não haja valores de referência para os níveis de leptina encontrados na placenta, nossos resultados não mostraram correlação entre a concentração de leptina nesse órgão e no sangue, sugerindo que os níveis de leptina na placenta e no sangue materno são provavelmente oriundos de compartimentos diferentes. Essa observação está de acordo com outros autores,<sup>7</sup> embora alguns estudos mostrem que quase toda a leptina da placenta é liberada na corrente sanguínea materna.<sup>30,32</sup> Porém, a síntese de leptina na placenta está correlacionada com a sua concentração, sugerindo que existe uma produção local de leptina que é relevante para a própria placenta.<sup>1,13</sup>

O gene *ob* é expresso na placenta e, segundo alguns autores, há evidências de que a placenta seja fonte importante de leptina fetal durante a gestação normal e também o local de regulação da leptina durante a gestação.<sup>26</sup>

A leptina placentária afeta as funções maternas, fetais e placentárias, como angiogênese, crescimento, imunomodulação, regulação das funções do trofoblasto durante a implantação do embrião (invasão do endométrio, degradação e remodelação da matriz celular), ação pró mitogênica e antiapoptose no trofoblasto, estímulo à atividade do sistema de transporte de aminoácidos, produção de IL-6, modulação da síntese de esteroides placentários.<sup>1,10,13,28</sup> Dessa forma é esperada a expressão do gene *ob* na placenta, assim como de seu receptor Ob-Rb.

---

---

Além da esperada correlação entre os níveis de leptina na veia e artérias umbilicais, a leptina na veia umbilical correlacionou-se negativamente com o Apgar, sugerindo que a leptina que chega ao feto pode afetar o estado geral do recém-nascido. Esses resultados estão de acordo com outros descritos na literatura, obtidos em gestantes com restrição de crescimento intrauterino, eclâmpsia e pré-eclâmpsia.<sup>37,46,47</sup> Em um estudo, recém-nascidos com Apgar <8 no primeiro minuto tinham mães com leptinemia estatisticamente mais alta que recém-nascidos com Apgar >8. As razões para essa relação não estão claras e podem se dever a condições de hipóxia intrauterina que poderiam levar à superprodução de leptina pela placenta e piora das condições fetais, o que seria refletido nos níveis de Apgar.<sup>48</sup>

Nossos dados, assim como os de outros autores,<sup>19,38</sup> não mostraram correlação entre os valores de leptinemia materna e o peso ou comprimento do recém-nascido.

Os níveis de leptina nas artérias umbilicais encontrados em nosso estudo ( $4,7 \pm 0,96$ ) são menores dos que os encontrados na veia umbilical ( $6,6 \pm 0,99$ ), mostrando que ocorre retenção de leptina pelo feto; esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>19,26</sup> Essa retenção de leptina pelo feto sugere que essa citocina possivelmente desempenha papel relevante durante a vida intrauterina.<sup>10</sup>

Quando se considera a leptina retida no feto (diferença entre a leptina da veia e das artérias), observa-se aumento significativo no grupo leptinemia alta, no entanto essa diferença não teve impacto nem no peso nem no comprimento dos RN, sendo talvez importante para parâmetros relacionados com o estado geral ao nascimento (Apgar) como discutido acima.

---

---

Nos indivíduos adultos já está bem caracterizado que a leptina sinaliza os depósitos de tecido adiposo e que a sua concentração no sangue é proporcional ao tecido adiposo. Também já foi demonstrado que a leptina age no hipotálamo regulando a ingestão de alimentos e o balanço energético. No entanto, o papel da leptina no feto não está ainda estabelecido. Como o feto recebe suprimento contínuo de glicose, que passa do sangue materno para o fetal por difusão facilitada,<sup>6</sup> não se pode falar em controle da ingestão de alimentos ou apetite do feto, porém a maior quantidade de leptina retida pelos fetos cujas mães têm maior leptinemia talvez sinalize maior necessidade de leptina por parte deles para regular o metabolismo e manter normais as suas reservas de energia e, assim, seu peso, de uma forma semelhante à do indivíduo adulto.

Castro e colaboradores<sup>38</sup> encontraram associação entre o IMC pré-gestacional e os níveis de leptina na hora do parto. Nesse mesmo estudo não foram encontradas diferenças entre a leptinemia materna e o peso do recém-nascido (assim como no presente estudo), da placenta ou índice placentário (peso da placenta/peso do recém-nascido).<sup>38</sup>

Dentre os papéis propostos para a leptina durante a vida intrauterina estão o desenvolvimento e crescimento fetal.<sup>7</sup> No entanto, é difícil determinar se a quantidade de leptina *in utero* é um regulador fisiológico do crescimento fetal ou se simplesmente reflete a massa de tecido adiposo e placentário, e/ou a concentração de insulina na circulação fetal.<sup>7</sup>

### **Parturientes com leptinemia baixa e alta:**

---

---

Embora nossas parturientes tenham apresentado níveis médios de leptina na gravidez considerados normais (20ng/mL), a maioria delas (15 delas ou 60%) apresentou, no momento do parto, leptina circulante abaixo desse valor. Assim, as gestantes foram divididas de acordo com a leptinemia nos grupos leptinemia baixa, aquelas com valores abaixo da média (20ng/mL) e leptinemia alta, aquelas com valores superiores a esses níveis.<sup>40</sup>

Comparando-se os dois grupos, observa-se que o grupo leptinemia alta era composto por mulheres mais velhas, com maior peso no início e final da gestação e com maior ganho de peso (tabela 7). Esse resultado está de acordo com a observação de que a leptina é proporcional à massa de tecido adiposo no indivíduo adulto, sinalizando as reservas de energia.<sup>19</sup> A diferença entre a idade das mães pode apenas refletir o fato de que indivíduos mais velhos tendem a apresentar maior adiposidade e, conseqüentemente, maiores níveis de leptina. Os trabalhos de Schubring<sup>29,43,44,45</sup> estabeleceram que, por volta de 6 a 8 semanas de gravidez, os níveis de leptina no soro materno correlacionavam-se significativamente com o IMC. A correlação da leptina *versus* IMC diminuiu com o aumento da idade gestacional e, ao parto, apenas uma fraca correlação persistia. Concordante com esses dados, nosso estudo mostrou correlação da leptinemia materna com o IMC materno no início da gestação, mas não com o peso da mãe ao final da gestação.

O número de gestantes que ganharam peso adequado, acima ou abaixo do desejado durante a gestação e o número de partos normais, cesarianas ou por fórceps foram similares nos dois grupos. Estudos anteriores comparando mulheres com gestação complicada por hipertensão e gestantes normais encontraram, além de maior leptinemia em mães com complicações<sup>46,49</sup>,



---

---

aumento na frequência de cesarianas naquelas com níveis elevados de leptina.<sup>46</sup> Tanto o estudo de Rytlewsky e colaboradores<sup>46</sup> quanto o de Nezar e colaboradores<sup>49</sup>, contavam com uma população que apresentava complicações na gravidez, o que difere do atual estudo.

Em relação ao sangue do cordão umbilical, não houve diferenças entre os grupos quando a leptinemia na veia ou nas artérias foram analisados. A leptina retida no feto, por sua vez, foi maior naquelas com leptinemia alta. Porém, esse parâmetro não se correlacionou com nenhum dos demais analisados, exceto com os níveis de leptina na veia e artérias umbilicais (correlação não apresentada). Mais uma vez, o peso e comprimento dos recém-nascidos foram similares entre os dois grupos.

#### **Correlações no grupo de gestantes com leptinemia baixa:**

A correlação entre níveis de leptina na placenta e o peso pré-gestacional é a mais frequente e vista em todas as análises, quer seja considerando as gestantes como um todo ou em grupos. No caso do grupo de mulheres com leptinemia baixa, ela é uma das poucas correlações vistas. Além dessa, a correlação entre a expressão e concentração de leptina na placenta (confirmando a produção de leptina pela placenta) e entre as concentrações de leptina na veia e artérias umbilicais confirmam as análises do grupo total, já discutido anteriormente.

#### **Correlações no grupo de gestantes com leptinemia alta:**

Nesse grupo, além das correlações vistas entre os vasos umbilicais, há também correlação entre leptina na placenta e peso materno no início da

---

---

gravidez. As razões para essa última correlação não são evidentes. Ainda nesse grupo, o peso corporal no início da gravidez também se correlacionou positivamente com a leptina nas artérias umbilicais, sugerindo uma influência do peso materno e leptina na circulação materno-fetal. Dessa forma, parece que direta ou indiretamente, o peso da mãe (ou sua adiposidade) poderia influenciar não só a formação da placenta,<sup>10</sup> mas também a produção de leptina naquele órgão.

Também foi encontrada correlação negativa entre leptina materna e expressão placentária do receptor de leptina. Esse fato sugere que, em condições de leptinemia alta, a placenta poderia regular a entrada de leptina pela redução de seus receptores, em um mecanismo de possível regulação negativa. Alguns estudos mostram que a leptina produzida na placenta é primordialmente lançada na circulação materna e apenas uma pequena fração poderia alcançar o feto em condições fisiológicas.<sup>28,50</sup> Com a menor captação de leptina pelos receptores, mais leptina estaria disponível para a circulação sistêmica, justificando a correlação entre esses dois parâmetros.

Nossos dados mostraram correlação positiva entre os níveis de leptina no sangue da veia e das artérias umbilicais com o peso dos recém-nascidos apenas no grupo leptinemia alta, sugerindo um papel da leptina que chega ao feto na regulação do seu peso e crescimento.<sup>38</sup> Alguns estudos, incluindo o nosso, mostram que as concentrações de leptina no sangue venoso do cordão correlacionam-se significativamente com o sangue arterial do cordão e os níveis de leptina no sangue de cordão correlacionam-se positivamente com o peso do feto ao nascimento sugerindo que no feto, assim como na vida adulta, a leptina sinaliza a expansão do tecido adiposo.<sup>19, 38,44,45</sup>

---

---

Nossas análises sugerem que as maiores concentrações de leptina que chegam ao feto pela veia umbilical contribuem para o aumento do peso ao nascimento, como sugerido pela correlação positiva entre leptina nos vasos umbilicais e peso do recém-nascido nesse grupo (Tabela 9). Esses dados estão de acordo com outros na literatura<sup>51,52</sup> que mostram correlação do peso ao nascimento apenas com a concentração de leptina da veia umbilical e não com a do sangue da mãe. Oktem e colaboradores<sup>51</sup> sugerem que esta falta de correlação indicaria que estes compartimentos podem ser unidades não comunicantes ou ter diferentes mecanismos de regulação ou degradação da leptina, e que a leptina do sangue materno pode não ter um efeito direto sobre o crescimento fetal.

Porém, os maiores níveis de leptina na veia umbilical também se correlacionaram com a piora dos níveis de Apgar (tabela 9), que já havia sido visto em uma fraca correlação no grupo total e que se torna fortemente correlacionado quando apenas as mães com leptinemia alta são analisadas. Esse fato foi também observado em estudos anteriores que compararam gestantes que apresentavam ou não pré-eclampsia.<sup>46-49</sup> Esses estudos reforçam os resultados de Mise e colaboradores<sup>48</sup> que, após observarem aumento da leptina em situações de pré-eclâmpsia, confirmaram que a secreção de leptina está aumentada em uma linhagem celular de trofoblasto humano (BeWo) cultivada em situação de hipóxia (5% O<sub>2</sub>), comparado com aquelas cultivadas em condições padrão (20% O<sub>2</sub>). Nossas parturientes com leptinemia alta não apresentavam pré-eclâmpsia, assim como seus recém-nascidos apresentavam índice de Apgar adequado (média 8,6), mesmo sendo esse índice estatisticamente menor do que o observado naquelas com

---

---

leptinemia baixa (média 9,4). Porém, esta pequena alteração no Apgar pode sinalizar situações discretas de hipóxia intrauterina, o que gerou a correlação entre os dois parâmetros. Diante do grande leque de funções da leptina no desenvolvimento tanto da placenta quanto do feto, estudos mais detalhados serão necessários para investigar outros mecanismos que levariam a uma ação direta da leptina no estado geral do recém-nascido no momento do parto. Dentro da luz de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que mostra a correlação positiva entre aumento de leptina no sangue de cordão e redução do índice de Apgar em mulheres eutróficas e sem intercorrências durante a gravidez e o parto.

### **Sumário dos principais resultados:**

- 1- Nosso estudo mostrou que a os níveis de leptina no sangue materno e também a leptina placentária estão positivamente correlacionadas com o peso da gestante no início da gravidez.
- 2- Os níveis de leptina na circulação materna não se correlacionaram com a concentração de leptina na placenta, sugerindo que os níveis de leptina na

---

---

placenta e no sangue materno são provavelmente oriundos de compartimentos diferentes.

3- A expressão de leptina placentária é positivamente correlacionada com a presença dessa adipocina na placenta. Porém, seus receptores nesse mesmo órgão são correlacionados negativamente com os níveis de leptina circulante no grupo leptinemia alta sugerindo possível mecanismo de regulação negativa ou resistência à leptina.

5- Em parturientes com leptinemia alta, os níveis dessa adipocina tanto na veia umbilical quanto nas artérias umbilicais estão positivamente relacionados com o do peso do recém-nascido.

6- O aumento dos níveis de leptina nos vasos umbilicais também está relacionado com uma discreta, mas significativa, piora do índice de Apgar, sugerindo que os níveis de leptina podem estar relacionados ao bem estar do recém nascido.

7- A leptinemia da mãe, por sua vez, não se correlaciona com os dados do recém-nascido, não sendo assim um parâmetro útil para predizer as condições do feto ao nascer.

8- Não houve diferença entre os grupos leptinemia alta e baixa quando analisado o desenvolvimento do peso e comprimento da criança nos primeiros cinco meses de vida.

---

---

## **8. CONCLUSÃO**

### **Conclusão:**

Quando níveis de leptina do sangue materno, do cordão e da placenta são analisados em relação ao crescimento e condições do feto ao nascer, observa-se que apenas o sangue de cordão de parturientes com leptinemia alta foram positivamente correlacionados com o peso ao

---

---

nascimento. O índice de Apgar, por sua vez, correlacionou-se negativamente com os níveis de leptina do sangue de cordão.

O peso das mães antes da gestação foi o parâmetro que mais se correlacionou com os níveis de leptina tanto no sangue materno quanto da placenta, sugerindo que o peso (ou a adiposidade) antes da gestação tem forte influência na produção de leptina pela placenta e prediz os níveis de leptina ao final da gestação.

A contribuição da placenta para a leptinemia sistêmica parece não ser relevante e não influencia os níveis encontrados ao final da gravidez.



## **9. REFERÊNCIAS**



**REFERÊNCIAS**

- 1- D'Ippolito, S., et al., Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *Biofactors*, 2012. 38(1): p. 14-23.
- 2- Cabral, A.C.V., *Obstetrícia*. 2a ed. 2002.
- 3- Brelje, T.C., et al., Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, 1993. 132(2): p. 879-87.
- 4- Barbour, L.A., et al., Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*, 2007. 30 Suppl 2: p. S112-9.
- 5- Karmon, A. and E. Sheiner, Pregnancy after bariatric surgery: a comprehensive review. *Arch Gynecol Obstet*, 2008. 277(5): p. 381-8.
- 6- McGanity, W.J., E.J. Dawson, and J.W. Van Hook, *Nutrição Materna*, in *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*, M.E. Shils, et al., Editors. 2003.
- 7- Forhead, A.J. and A.L. Fowden, The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 6): p. 1145-52.
- 8- *Medicine*, I.O., *Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines*. 2009.
- 9- Decherney, A.H., et al., *Current Diagnosis & Treatment*. 10a ed. 2006.
- 10- Gambino, Y.P., et al., Elsevier Trophoblast Research Award lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *Placenta*, 2012. 33 Suppl: p. S63-70.
- 11- Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Gestação e Lactação*, in *Tratado de fisiologia médica*. 2006.
- 12- Harris, R.D. and R.D. Alexander, *Ultrasound of the placenta and umbilical cord*, in *Ultrasonography in obstetrics and gynecology*, P.W. Callen, Editor. 2000.

- 13- Uzelac, P.S., et al., Dysregulation of leptin and testosterone production and their receptor expression in the human placenta with gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 2010. 31(7): p. 581-8.
- 14- Bruce, K.D. and M.A. Hanson, The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr*, 2010. 140(3): p. 648-52.
- 15- Barker, D.J., Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health*, 2004. 58(2): p. 114-5.
- 16- Lewis, D.S., et al., Prewaning food intake influences the adiposity of young adult baboons. *J Clin Invest*, 1986. 78(4): p. 899-905.
- 17- Elahi, M.M., et al., Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr*, 2009. 102(4): p. 514-9.
- 18- Bruce, K.D., et al., Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*, 2009. 50(6): p. 1796-808.
- 19- Kiess, W., et al., Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008. 22(1): p. 135-53.
- 20- Zhang, Y., et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994. 372(6505): p. 425-32.
- 21- Havel, P.J., et al., Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(12): p. 4406-13.
- 22- Maffei, M., et al., Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1995. 1(11): p. 1155-61.
- 23- Ahima, R.S., et al., Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996. 382(6588): p. 250-2.
- 24- Schulz, L.C., The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(39): p. 16757-8.
- 25- Vickers, M.H., Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J Diabetes*, 2011. 2(9): p. 137-48.

- 26- Vitoratos, N., et al., Fetoplacental leptin levels and their relation to birth weight and insulin in gestational diabetic pregnant women. *J Obstet Gynaecol*, 2002. 22(1): p. 29-33.
- 27- Maple-Brown, L., et al., Maternal pregravid weight is the primary determinant of serum leptin and its metabolic associations in pregnancy, irrespective of gestational glucose tolerance status. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. 97(11): p. 4148-55.
- 28- Henson ,M.C., Castracane, V.D. *Leptin in Pregnancy: An Update*. *Biology of Reproduction* 74, 218-229, 2006
- 29- Schubring, C., et al., Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(5): p. 1480-3.
- 30- Luo, Z.C., et al., *Maternal and Fetal Leptin, Adiponectin Levels and Associations With Fetal Insulin Sensitivity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012.
- 31- Forhead, A.J., et al., Plasma leptin concentration in fetal sheep during late gestation: ontogeny and effect of glucocorticoids. *Endocrinology*, 2002. 143(4): p. 1166-73.
- 32- Linnemann, K., et al., Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(11): p. 4298-301.
- 33- Bischof, P. and M. Martelli, *Current topic: proteolysis in the penetration phase of the implantation process*. *Placenta*, 1992. 13(1): p. 17-24.
- 34- Perez-Perez, A., et al., Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 477(2): p. 390-5.
- 35- Bouloumie, A., et al., Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*, 1998. 83(10): p. 1059-66.
- 36- Sierra-Honigmann, M.R., et al., Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 1998. 281(5383): p. 1683-6.
- 37- Schulz, L.C., Schlitt, J.M., Caesar, G., Pennington, K.A. Leptin and the Placental Response to Maternal Food Restriction During Early Pregnancy. *Biol Reprod*. 2012 Nov 16;87(5):120

- 38- Castro, F.C., Leite, H.V., Pereira, A.K., Reis, Z.S.N., Cabral, A.C.V., Associação entre a Antropometria e a Leptina Circulante nos Compartimentos Materno, Fetal e Placentário, na Gravidez Normal. *RBGO Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2004. 26(9):691-695.
- 39- Lea, R.G., et al., Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod*, 2000. 6(8): p. 763-9.
- 40- Ku, I.A., et al., Association of low leptin with cardiovascular events and mortality in patients with stable coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*, 2011. 217(2): p. 503-8.
- 41- Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.
- 42- WHO Child Growth Standards, 2006
- 43- Schubring, C., et al., Leptin concentrations in maternal serum and amniotic fluid during the second trimester: differential relation to fetal gender and maternal morphometry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999. 86(2): p. 151-7.
- 44- Schubring, C., et al., Longitudinal analysis of maternal serum leptin levels during pregnancy, at birth and up to six weeks after birth: relation to body mass index, skinfolds, sex steroids and umbilical cord blood leptin levels. *Horm Res*, 1998. 50(5): p. 276-83.
- 45- Schubring, C., et al., Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1999. 51(2): p. 199-204.
- 46- Rytlewski K, et al., Leptin and interferon-gamma as possible predictors of cesarean section among women with hypertensive disorders of pregnancy. *Med Sci Monit*. 2012 Aug;18(8):, 2012. 18(8): p. CR506-511.
- 47- Arslan, M., et al., Endothelin 1 and leptin in the pathophysiology of intrauterine growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004. 84(2): p. 120-6.
- 48- Mise, H., et al., Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(9): p. 3225-9.

- 49- Nezar MA, et al., Endothelin-1 and Leptin as Markers of Intrauterine Growth Restriction. *Indian Journal of Pediatrics*, 2009. 76(5): p. 485-8.
- 50- Klaffenbach, D., Meißner, U., Raake, M., Fahlbusch, F., Alcazar, M.A.A. Upregulation of leptin-receptor in placental cells by Hypoxia Regulatory Peptides 167 (2011) 156–162.
- 51- Oktem O, Dedeoğlu N, Oymak Y, Sezen D, Köksal L, Pekin T, Gökaslan H, Kavak ZN. Maternal serum, amniotic fluid and cord leptin levels at term: their correlations with fetal weight. *J Perinat Med*. 2004;32(3):266-71.
- 52- Papadopoulou FG, Mamopoulos AM, Triantos A, Constantinidis TC, Papadimas J, Assimakopoulos EA, Koliakos G, Mamopoulos M. Leptin levels in maternal and cord serum: relationship with fetal development and placental weight. *J Matern Fetal Med*. 2000 Sep-Oct;9(5):298-302