

Determinación perinatal de leptina en madres y neonatos con diagnóstico de retardo de crecimiento intrauterino (RCIU)

Liliana Muñoz Molina M.Sc.^{1*}, Juan Carlos Sabogal MD², Clara Arteaga M.Sc.³,
Rubistein Hernández M.Sc.⁴, Ismena Mockus MD⁵ y Jairo Tovar Ph.D.⁶.

¹ Instituto Materno Infantil de Bogotá, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. ² Universidad Nacional de Colombia. ³ Instituto Materno Infantil de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. ⁴ Gimnasio Moderno. ⁵ Universidad Nacional de Colombia. ⁶ Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.

Recibido: 23-07-03; Aceptado: 24-09-03

RESUMEN

Recientemente se ha descrito que la leptina presenta actividad hormonal actuando sobre receptores y se ha involucrado con la regulación de la eficiencia metabólica, gasto energético e ingesta alimenticia. Se ha encontrado que es sintetizada en los sincitiotrofoblastos y es secretada dentro de la circulación materna. La leptina ha sido también relacionada con el depósito de grasa. Dado que en el último trimestre del embarazo humano, de manera característica, existe un depósito relativamente aumentado de grasa, y que éste se ve evidentemente depletado en los casos de RCIU, resulta entonces probable que la leptina guarde relación con la entidad. El objetivo de este estudio fue investigar si existen diferencias entre las mediciones de leptina obtenidas en un grupo de pacientes sanas y con RCIU. El estudio fue realizado en 12 pacientes con RCIU (casos) y 9 pacientes sin RCIU (controles). Se tomaron muestras de sangre materna, sangre de cordón y de líquido amniótico (LA). En el estudio pareado (n=9), los niveles de leptina en niños nacidos con RCIU presentaron concentraciones más bajas que los niños control ($p = 0.05$). Las concentraciones de leptina en sangre de cordón se correlacionaron significativamente con el peso del neonato ($p = 0.0002$) y peso placentario ($p=0.048$). No se encontró una correlación estadísticamente significativa de los niveles de leptina en sangre materna con el peso del neonato y el peso placentario. Las concentraciones de líquido amniótico mostraron una correlación inversa y estadísticamente significativa con el peso neonatal ($p=0.035$), pero no con el peso placentario ($p = 0.071$). Se observaron correlaciones inversas y estadísticamente significativas entre: concentraciones de leptina materna y leptina en sangre de cordón ($p=0.034$); leptina de cordón con leptina en líquido amniótico ($p = 0.011$) y correlación positiva entre leptina materna y leptina de líquido amniótico ($p = 0.01$).

Palabras claves: Leptina, líquido amniótico, edad gestacional apropiada, suero materno, sangre de cordón, retardo de crecimiento intrauterino.

* Correspondencia: Dra. Liliana Muñoz Molina, E-mail: lilimuñoz1@hotmail.com

ABSTRACT

Perinatal determination of Leptin in mothers and neonates with diagnosis of retard of intra-uterine growth (RCIU)

Recently it has been described that the leptin presents hormonal activity, acting on receivers and that it is involved in the regulation of the metabolic efficiency, spend energy and nutritious ingestion. Has been synthesized in the sincitiotrofoblastos and it is secreted inside the maternal circulation. The leptin has also been related in the deposit of fat. Since in the last trimester of the human pregnancy, in a characteristic way a relatively increased deposit of fat exists and that this leaves depletado evidently in the cases of RCIU, it is then probable that the leptin keeps relationship with the entity. The objective of this study was to investigate if differences exist among the leptin mensurations obtained in a group of healthy patients and with RCIU. The study was carried out in 12 patients with RCIU (cases) and 9 patients without RCIU (you control). For such a reason they took samples of maternal blood and blood cord and of amniotic liquid (THE). In the paired study (n=9) the leptin levels in children born with RCIU presented lower concentrations that the children control (p=0.05). The leptin concentrations in blood cord were correlated significantly with the weight of the neonate (p = 0.0002) and I weigh placentario (p = 0.048). It was not to significant correlation statistically of the leptin levels in maternal blood with the weight of the neonate and the placentario weight. The concentrations of amniotic liquid showed an inverse and statistically significant correlation with the weight neonatal (p = 0.035), but not with the placentario weight (p = 0.071). Inverse and statistically significant correlations were observed among: concentrations of maternal leptin and leptin in blood cord (p = 0.034); cord leptin with leptin in liquid amniotic (p = 0.011) and positive correlation between maternal leptin and leptin in the amniotic fluid (p = 0.01).

Keywords: Leptin, amniotic fluid, appropriate for gestacional age, maternal serum, blood cord, intrauterin growth retarded.

Introducción

La leptina (proteína OB) es un monómero de un peso molecular de 16 Kda y 146 aminoácidos que está presente en el plasma. Esta proteína ha sido llamada "leptina", derivada del griego leptósque significa delgado (1). El gen humano OB de la leptina está localizado en el cromosoma 7q31 (2); su DNA tiene más de 15.000 pares de bases con 3 exones y dos intrones (3).

La clonación y secuenciamiento del gen ha permitido establecer que es un gen altamente conservado, con una homología del 84% entre el humano y el ratón (4). Estudios posteriores mostraron que la leptina humana tiene un 67% de secuencia idéntica de aminoácidos con otras especies como gorila, chimpancé, orangután, macacus rhesus, perro, vaca, cerdo, rata y ratones (5).

A pesar de la homología del gen con otras especies, no hay una secuencia aparentemente similar con ninguna otra proteína, por lo tanto, fue difícil el establecer un modelo de estructura. La leptina humana se cristalizó substituyendo un aminoácido de Glutamina (Glu) por un Triptófano (Trp) en la posición 100, dando como resultado una proteína llamada leptina E-100, con una función biológica activa, soluble y fácil de cristalizar (5).

Los receptores de la leptina (OB-R) también pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas clase I (6, 7), median la interacción de la leptina con el sistema hipotálamo neuroendocrino y regulan la concentración de leptina en la circulación (7, 8).

El gen receptor de leptina OB-R presenta 6 variantes OB-R (a-e) (9), que se encuentran tanto en humanos como en ratones, aunque su expresión difiere marcadamente

entre los diferentes tejidos. El receptor transmite la señal vía Janus cinasa (JAK). Un dominio extracelular es igual para todas las isoformas del OB-R. Los dominios intracelulares difieren en tamaño y composición de secuencia (9). El dominio extracelular del OB-R en ratones es homólogo al humano en un 78%, mientras que el dominio intracelular de la forma larga es homólogo en un 71% y es particularmente bien conservado (6).

Los efectos sobre el metabolismo de lípidos en cultivos celulares sugieren que la leptina interviene en la homeostasis de la glucosa. La leptina directamente inhibe la concentración de lípidos intracelulares, reduciendo las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) y la síntesis de triglicéridos (TG) y, a su vez, incrementando la oxidación de lípidos (10).

Los niveles de leptina en circulación están directamente correlacionados con la cantidad de grasa corporal e índice de masa corporal (IMC) (11). Las personas obesas tienen más altos los niveles de leptina, comparados con personas normales, y las de bajo peso tienen extremadamente reducidos los niveles de leptina (1, 12).

En la etapa prepubertal, los niveles de leptina están estrechamente relacionados con la masa grasa tanto en niñas como en niños. El desarrollo de la pubertad probablemente es inducido cuando el depósito de grasa alcanza un cierto nivel, incrementando la liberación de leptina desde los adipocitos hacia la corriente sanguínea (13).

En el período de la pubertad se presentan cambios en la composición de sustancias corporales, algunos son dependientes del sexo. Las niñas ganan más masa grasa, mientras que los niños aumentan la masa grasa libre. La masa grasa es la que más aporta leptina a la circulación, pero una relación negativa con la masa grasa libre no es explicada. Sin embargo, se considera que la producción de leptina puede verse alterada por los efectos de otras hormonas como la testosterona, la cual tiene un efecto directo sobre los adipocitos (14).

Aunque la expresión de la leptina en el tejido adiposo ha sido la más investigada, su expresión de los OB-Rs en la placenta y en el feto, sugiere que esta citoquina juega un papel importante en el desarrollo fetal, debido a una señal que la madre envía al feto, la cual depende del estado energético materno o, alternativamente, que la leptina fetal puede promover una señal hacia la madre que regula el crecimiento fetal y desarrollo. En los fetos, la leptina parece tener acciones multifactoriales, actuando de forma paracrina y endocrina (15).

Materiales y métodos

Población: La población estudiada incluye 12 recién nacidos con RCIU y 9 con peso adecuado para la edad gestacional (AGA). Las muestras de LA, sangre materna y sangre fetal, se tomaron de pacientes que ingresaron al IMI con diagnóstico ecográfico de RCIU. El LA se obtuvo por amniocentesis para maduración pulmonar fetal o en el momento de la cesárea; en pacientes que tuvieran más de 34 semanas de gestación y que fueran a ser desembarazadas en los siguientes 6 días de la toma del LA. Este se conocerá como «grupo de estudio».

Como grupo control se tomó un número similar de pacientes de edad gestacional similar, sin diagnóstico clínico de RCIU, a quienes se les practicó amniocentesis para maduración pulmonar fetal y que fueran a ser desembarazadas en los siguientes 6 días. Los casos registrados de RCIU se correlacionaron con los grupos controles por género y por edad gestacional.

Reactivos: Todas las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta realizar los análisis. Las concentraciones de leptina fueron medidas por duplicado por el método de RIA (Linco Research), utilizando un anticuerpo contra la leptina recombinante humana, con una sensibilidad de 0.5 ng/ml.

Análisis estadístico: El análisis pareado entre pacientes con RCIU y controles (n=9) por sexo y FUR se realizó utilizando la prueba de Wilcoxon, para

encontrar diferencias significativas entre las medianas de leptina en los tres compartimentos. Para establecer la relación entre dos variables continuas no normales, se utilizó la correlación categórica de Spearman.

Toma de muestras: Se tomaron muestras de líquido amniótico, sangre materna, sangre fetal, de la siguiente manera: se procedió a tomar una muestra de 10 ml de líquido amniótico en el momento en que el médico tratante indicó el perfil de maduración pulmonar fetal, o durante la cesárea. En el momento del parto (natural o por cesárea), se tomó una alícuota de sangre venosa materna y de sangre venosa fetal (del cordón umbilical, una vez ligado).

Definición de casos y controles:

Casos: Biometría con parámetros ecográficos menores al percentil 10 para la edad gestacional, según tabla de Hadlock.

Controles: Biometría con parámetros ecográficos entre el percentil 25 y 75 para la edad gestacional, según tabla de Hadlock.

Criterios de inclusión para el grupo de casos y controles: FUR confiable, más de 34 semanas de gestación, feto único, amniocentesis prenatal por indicación adicional (maduración pulmonar, excepto en el caso de que se tome durante la cesárea), parto en el IMI en los siguientes 6 días a la toma de la muestra de LA (si el tiempo fue mayor la muestra se descartó).

Criterios de exclusión para el grupo de estudio y control: Malformación congénita, diabetes materna, embarazo múltiple, infecciones perinatales del complejo TORCH, fármacodependencia, tabaquismo.

Valoración pediátrica: Registro de peso placentario y peso neonatal según la gráfica con distribución percentilar del Sistema Informático Perinatal del IMI. Se procedió a tomar la talla y determinar el IMC. En todos los casos las valoraciones se realizaron por el mismo pediatra.

Aspectos éticos: La realización de este estudio estuvo sujeta a la previa aprobación por parte del Comité de Investigación del IMI. Supeditado a los lineamientos

de la declaración de Helsinsky sobre investigaciones biomédicas con consentimiento escrito de las pacientes.

Resultados

El análisis pareado entre pacientes con RCIU y controles (n=9) encontró que las concentraciones de leptina en sangre de cordón fueron significativamente menores en los neonatos con RCIU que en los controles. La mediana para los casos con RCIU fue de 1.8 y para el grupo control de 4.05 ($p = 0.05$) (Figura 1).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de leptina en sangre materna del grupo control y el grupo con RCIU. Las medianas para la concentración de leptina materna del grupo control fue de 9.83 y para el de los casos fue de 12.22 ($p = 0.31$).

De la misma manera, tampoco los valores obtenidos en líquido amniótico del grupo control y el grupo de estudio registraron diferencias estadísticamente significativas. La mediana para las concentraciones de líquido amniótico para el grupo control fue 1.64 y para el grupo con RCIU fue de 3.14 ($p = 0.44$).

En el análisis de correlación las concentraciones de leptina en sangre materna y de cordón se relacionaron con peso fetal y placentario. Las concentraciones de leptina en sangre de cordón se correlacionaron significativamente con el peso del neonato ($p = 0.0002$) y peso placentario ($p = 0.048$). No se encontró una correlación estadísticamente significativa de los niveles de leptina en sangre materna con el peso del neonato y el peso placentario.

Las concentraciones de líquido amniótico mostraron una correlación inversa y estadísticamente significativa con el peso neonatal ($p = 0.035$), pero no con el peso placentario ($p = 0.071$).

Se observaron correlaciones inversas y estadísticamente significativas entre: concentraciones de leptina materna y leptina en sangre de cordón ($p = 0.034$); leptina de cordón con leptina en líquido

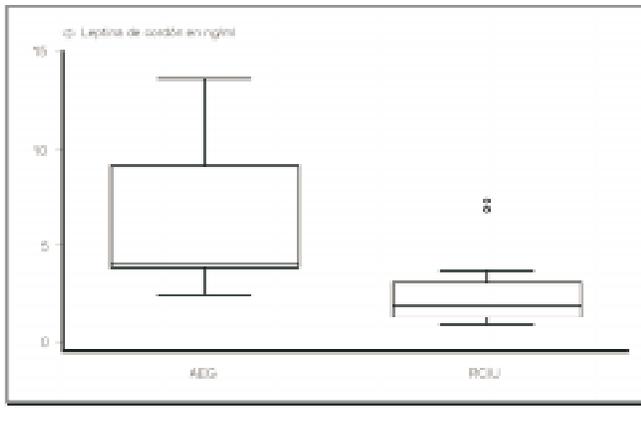


Figura 1. Comparación de los resultados de la concentración de leptina en sangre de cordón entre el grupo control (AEG) y RCIU. Hay diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de leptina de cordón de neonatos normales y la concentración de leptina de cordón de neonatos con RCIU ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como ng/ml de leptina. Esta figura representa la mediana de cada población con su respectiva desviación estándar. Los valores extremos se representan en círculo.

amniótico ($p = 0.011$) y correlación positiva entre leptina materna y leptina de líquido amniótico ($p = 0.01$).

Discusión

Encontramos diferencias significativas entre las concentraciones de la leptina en sangre de cordón entre el grupo de casos y controles, siendo más altas las concentraciones en los controles (6.21 4.03 ng/ml) que en los casos (2.21 1.79 ng/ml).

Estas diferencias, también han sido reportadas por varios investigadores como Koistinen, et al. (16) en los RCIU 3.3 0.5 g/L ($p < 0,001$) comparado con los AGA 14.5 2.8 g/L; (17), Managaya, et al. reportaron una concentración de 1.6 1.1 ng/ml en RCIU y 4.4 3.0 ng/ml en AGA ($p < 0,01$); Tarquini, et al. (18) hallaron diferencias significativas con concentraciones de leptina en RCIU de 1.58 0.32 ng/ml y 5.65 0.62 ng/ml ($p < 0,001$) en AGA. Estos hallazgos probablemente son esperables asumiendo que los niños con RCIU presentan menor cantidad de tejido adiposo, principal sitio de síntesis de leptina.

Las concentraciones de leptina en sangre de cordón se correlacionaron con el peso al nacimiento ($p =$

0.0002) en esta investigación. Matzuda et al. (19) y Koistinen, et al. (16), entre otros autores, encontraron correlación positiva entre las concentraciones de leptina en cordón con el peso del neonato con un valor $p = 0.03$ y $p = 0.001$ respectivamente.

Las concentraciones de leptina en sangre fetal aumentan en relación directa con el incremento absoluto de la masa grasa durante el período fetal, que a su vez se reflejará en el peso del neonato. Existe una fuerte asociación entre las concentraciones de leptina y peso del cuerpo del neonato, reflejadas en las diferencias en los valores de leptina en suero de cordón entre recién nacidos con y sin RCIU.

Los niveles de leptina en los niños nacidos con apropiado peso para la edad gestacional disminuyen durante los primeros días de vida; sin embargo, estos cambios son independientes del estado de crecimiento intrauterino y de las variaciones del IMC. Los niveles altos de leptina observados en el momento del nacimiento sugieren un mecanismo adaptativo para preparar al neonato a los cambios en la alimentación y en el balance energético postnatales (12, 20).

Los niños nacidos con RCIU tienen niveles de leptina significativamente más altos al final del primer año de vida que los niños sin RCIU. Lo anterior sugiere que estos niños pueden desarrollar una "resistencia" a la leptina que resulta benéfica para recuperar el crecimiento perdido in-útero, durante el primer año de vida. También las altas concentraciones de leptina en el primer año sugieren una alteración en el desarrollo del tejido adiposo en un tiempo determinado en la vida fetal.

En este estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de leptina en sangre materna en los casos (14.78 7.76 ng/ml) y los controles (15.62 16.4 ng/ml); aunque los niveles de leptina en sangre materna en fetos con RCIU fueron levemente superiores a los presentados por el grupo control.

El promedio de peso de las madres con fetos sin RCIU fue más alto que el promedio de las madres con fetos con RCIU, pero tampoco presentaron diferencias significativas, lo cual en parte puede explicar la no diferencia entre los niveles de leptina en ambos grupos. Si bien no hay correlación estadísticamente significativa entre los dos grupos, el hábito alimenticio en una de las pacientes sesga los datos lo suficiente para obtener una correlación más uniforme.

Los niveles elevados de leptina en la mencionada paciente del grupo con RCIU en parte son explicados por su patología: obesidad mórbida. Este hallazgo sugiere que la presencia de la obesidad en la madre se constituye en un factor de riesgo para RCIU, lo cual ha sido ya corroborado en otras circunstancias obstétricas (diabetes, toxemia etc.).

En esta investigación no se encontró correlación significativa entre las concentraciones de leptina materna y peso al nacimiento ($p = 0.06$), como tampoco entre leptina materna y peso placentario ($p = 0.15$). Vale la pena anotar que los niveles de leptina materna circulante se incrementan durante el embarazo de 2 a 4 veces, comparados con los niveles de mujeres no gestantes y declinan después del parto.

La expresión de la leptina por la placenta contribuye al incremento de las concentraciones circulantes de leptina materna durante el embarazo, probablemente por presentar un rol endocrino en la regulación del balance energético materno. De otra manera, la expresión de leptina en la placenta puede tener una actividad angiogénica e inmunológica, la cual afecta de una manera autocrina o paracrina. Esto también parece influenciar el crecimiento fetal y desarrollo para la unión de los receptores de leptina presente en los órganos fetales (21, 22). La falta de correlación entre los niveles de leptina materna y el peso del neonato, quizás sea debido a que la placenta libera más leptina dentro de la circulación materna y en menor proporción hacia el lado fetal.

En este trabajo, los niveles de leptina en LA se correlacionaron inversamente con las concentraciones de leptina en sangre de cordón ($p = 0.011$). El LA no representa metabólicamente una vía de eliminación de leptina y es de esperarse que sea de origen fetal. Los niveles aumentados de leptina en LA en los fetos con RCIU representan la posibilidad de una expresión aumentada del gen OB por los amniocitos, como respuesta adaptativa a la condición de hipoxemia en el feto, que limita el crecimiento de este.

La leptina del líquido amniótico puede tener tres orígenes: proveniente de la placenta, del feto o de ambos. En los casos sin RCIU, la placenta podría permitir el paso de leptina a la circulación fetal, la cual se sumaría a la leptina producida por el feto. En menor proporción pasaría leptina desde la placenta hacia el feto en los casos con RCIU. Los niveles más altos en LA comparados con los de sangre fetal en los casos con RCIU se pueden explicar a partir de la excreción de la leptina por parte del riñón fetal hacia el LA, la cual es la ruta de mayor importancia en el metabolismo de esta citoquina.

Es este quizás el mayor aporte que nuestro trabajo hace al conocimiento que hasta el momento se tiene de la citoquina en cuestión, dado que este hallazgo no ha sido reportado en la literatura mundial. Desde el punto de vista fisiopatológico es difícil explicar la razón por la cual fetos con menor tejido graso exhiben mayor concentración de leptina LA cuando se los compara con fetos de peso normal.

Nos permitimos conjeturar de manera cauta que, en los fetos sometidos a una noxa tal, el tejido trofoblástico hipóxico libera mayor cantidad de leptina hacia la circulación fetal como medida "adaptativa", estimulando el depósito de tejido fetal aún en condiciones metabólicas adversas y protegiendo al feto de la emaciación, con su efecto anabólico. De hecho, esta posibilidad adaptativa fetal ya ha sido considerada por hallazgos que han demostrado mayor producción de leptina a partir de tejido trofoblástico hipóxico.

Desde el punto de vista diagnóstico es de interés este hallazgo porque supone una vía de exploración clínica que hasta el momento no se ha realizado. El diagnóstico de RCIU es, por razones aquí ya suficientemente expuestas, particularmente difícil. Es entonces posible en aquellos casos en los cuales es necesario definir si el ambiente intrauterino es adverso para tomar la decisión de terminar el embarazo. Esta situación es muy frecuente en los casos de RCIU. Un elemento diagnóstico más sería la determinación de los niveles de leptina en LA en tales pacientes por medio de la amniocentesis. Este procedimiento es de relativa fácil realización y no entraña una tecnología particularmente difícil de acceder en el contexto clínico habitual en que se manejan las pacientes con fetos con RCIU.

Si el obstetra tratante obtiene niveles de leptina mayores a aquellos esperados para la edad gestacional, puede concluir que dicho feto está sometido a una noxa que afectará su desempeño metabólico. Este enfoque es novedoso, dado que hasta el momento el diagnóstico de RCIU, ha sido tardío al basarse en criterios evidentemente ecográficos. Ya en este momento, hay secuelas a nivel neurológico y a otros niveles que hacen necesaria la búsqueda de otras alternativas diagnósticas más tempranas como la que proponemos aquí, donde aún no se han establecido secuelas y la noxa está recién teniendo lugar.

Nuestro estudio también mostró una correlación positiva entre las concentraciones de leptina en sangre de cordón y el peso de la placenta con un valor $p = 0.048$. Schubring, et al. (16), encontraron también una relación positiva con una valor $p < 0.01$, mientras que Tarquini, et al. (18) encontraron una relación muy débil entre las concentraciones de leptina en sangre de cordón y peso placentario ($r = 0.274$; y $p = 0.105$).

Se ha demostrado la producción de leptina por tejido no adiposo, principalmente en los trofoblastos placentarios y células amnióticas (7). La localización

de leptina y receptores de leptina OB-Rb y Ob-Ra en los sincitiotrofoblastos puede ser relevante para las funciones de la placenta como órgano endocrino. El mRNA de leptina en la placenta está presente en mayor abundancia durante la gestación temprana que al término; esta disminución no predice el efecto sobre la secreción de leptina o el incremento de volumen de los sincitiotrofoblastos, el cual es proporcional al incremento general en la masa placentaria entre el primer y último trimestre. La placenta produce leptina que pasa a la cavidad fetal, lo cual puede sugerir su probable papel en el desarrollo intrauterino y neonatal (23).

Observamos una correlación inversa y estadísticamente significativa entre las concentraciones de leptina materna y de sangre de cordón ($p = 0.034$). Sin embargo, Tamura et al. (24) reportaron en 1998 una correlación positiva lineal entre las concentraciones de leptina materna y leptina en sangre de cordón ($p = 0.002$).

Una de las causas por las cuales los niveles de leptina materna se correlacionan inversamente con las concentraciones de leptina en sangre de cordón, puede ser que la placenta libera más leptina dentro de la circulación materna y en menor proporción, hacia el lado fetal (25). La expresión de la leptina por la placenta contribuye al incremento de las concentraciones circulantes de leptina materna durante el embarazo, lo cual sugiere que la placenta presenta una función endocrina en la regulación del balance energético materno.

REFERENCIAS

1. Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen S, Chait B, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-6.
2. Green E, Maffei M, Braden V, Proenca R, Desilva U, Zhang Y, et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 1995;5:5-12.
3. Gong Da-W, Bi Sh, Pratley R, Weintraub D. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *The J Biol Biochem* 1995;271:3971-4

4. Zhang F, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 1994;387:206-9.
5. Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dötsch J, Hanitsch S, 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;82:1480-3.
6. Tartaglia L. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
7. Fey H, Okano H, Li C, Lee G-H, Shako C, Darnell R, et al. Anatomical localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7001-5.
8. Schwartz M, Seeley R, Campfield L, Burn P, Baskin D. Identification of targets of leptin in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;98:1101-6.
9. Chen H, Charlat O, Tartaglia L, Woolf E, Weng X, Ellis S, et al. Evidence that diabetes Gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996;84:491-5.
10. Shimabukuro M, Kazunori K, Chen G, Wang M-Y, Trieu Y, Newgard C, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through tryglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4637-41.
11. Blum F, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel N, Müller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Endocrinol Metab* 1997;82:2904-10.
12. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N. Human obese gene expression adiposity-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995;44:855-8.
13. Hassink S, Sheslow D, Lancey E, Opentanova I, Considine R, Caro J. Serum leptin in children with obesity: relation to gender and development. *Pediatrics* 1996;98:201-3.
14. Ahmed M, Ong K, Morrel D, Cox L, Drayer N, Perry L, et al. Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:899-905.
15. Hoggard N, Hunter L, Duncan J, Williams L, Trayhurn P, Mercer J. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11073-8.
16. Koistinen H, Koivisto V, Anderson S, Karonen S, Kontula K, Oksanen L, et al. Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3328-30.
17. Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Akihiro M. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3281-4.
18. Tarquini B, Tarquini R, Perfetto F, Cornélissen G, Halberg F. Genetic and environmental influences on human cord blood leptin concentration. *Pediatrics* 1999;103:998-1006.
19. Matzuda J, Yokota I, Iida M, Murakami T, Naito E, Ito M, et al. Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *Endocrinol Metab* 1997;82:1642-4.
20. Mercer J, Moar K, Hoggard N. Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger Ribonucleic Acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology* 1998;139:29-34.
21. Anshworth C, Hoggard N, Thomas L, Mercer J, Wallace J, Lea R. Placental leptin. *Rev Reprod* 2000;84:300-6.
22. Lewandowski K, Horn R, O'Callaghan C, Dunlop D, Medley G, O'Hare P, et al. Free leptin, bound leptin, and soluble receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:300-6.
23. Hales C. Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. *Act Paediatr* 1997;423 Suppl:184-7.
24. Tamura T, Robert M, Goldenberg R, Johnston K, Cliver S. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstet Gynecol* 1998;91:389-95.
25. Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum W, Schneider H, Fusch C. Leptin production and release in the Dually in vitro perfused human placenta. *J Endocrinol Metab* 2000;85:4298-301.