



CENTRO HOSPITALAR
LISBOA NORTE, EPE



Papel da adiponectina e leptina na doença inflamatória crónica

Mariana Leal Fernandes

Orientadora: Maria José Santos

Co-orientadora: Diana Carmona-Fernandes

Clínica Universitária de Reumatologia

2015/2016

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

RESUMO

O tecido adiposo branco tem ganho uma importância crescente com o conhecimento da produção de adipocinas, como a adiponectina e a leptina, que têm um papel relevante no desenvolvimento de processos inflamatórios sistémicos. O interesse particular pela adiponectina advém do facto de esta molécula parecer contribuir para a patogénese de doenças inflamatórias crónicas, como a artrite reumatóide (AR), o lúpus eritematoso sistémico (LES) e a aterosclerose, apesar de serem conhecidas as suas propriedades anti-inflamatórias e anti-ateromatosas. Por outro lado, a leptina, enquanto hormona moduladora do sistema imunitário, parece também estar envolvida na progressão destas doenças, embora ainda persistam algumas dúvidas sobre o papel protetor da molécula.

Assim, este estudo pretendeu observar a distribuição de adiponectina e leptina em indivíduos com doenças inflamatórias crónicas e perceber se estas hormonas apresentam uma relação com a duração ou atividade das mesmas.

Este estudo incluiu 478 indivíduos que foram divididos em 4 grupos: 1) indivíduos saudáveis, 2) doentes com AR, 3) doentes com LES e 4) doentes com aterosclerose evoluída, dos quais foram obtidos dados clínicos e laboratoriais e amostras biológicas (sangue). Estas últimas foram processadas para quantificação dos níveis séricos de adiponectina e leptina.

A análise realizada demonstrou que os níveis séricos de adiponectina e leptina são significativamente diferentes entre os grupos analisados. Os doentes com AR e LES apresentam níveis mais elevados de ambas as adipocinas em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. Os níveis de adiponectina são mais elevados nas mulheres com aterosclerose evoluída do que nos homens com este diagnóstico. A leptina associou-se positivamente ao índice de massa corporal e ao perímetro abdominal,, no entanto o mesmo não se verificou para a adiponectina. Apesar disso, nenhuma das moléculas demonstrou relacionar-se de forma consistente com a duração ou atividade da doença. Estes resultados sugerem um possível papel na patogénese de doenças inflamatórias crónicas em indivíduos com excesso de peso/obesidade, cuja prevalência é considerável nesta amostra.

Palavras-chave: adiponectina; leptina; inflamação; artrite reumatóide; lúpus eritematoso sistémico; aterosclerose.

ABSTRACT

The importance of the white adipose tissue has been growing thanks to the knowledge of the production of adipokines, as adiponectin and leptin, which contribute to the development of systemic inflammation. The particular interest in adiponectin came from its possible role in the pathogenesis of systemic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE), despite its known anti-inflammatory and anti-atheromatous properties. On the other hand, leptin, as an immune system modulator hormone, also seems to be involved in the progression of these diseases, although some doubts remain whether it has a protective rather than destructive role.

Therefore, the current study aimed to observe the distribution of serum levels of adiponectin and leptin among individuals with a chronic inflammatory disease and determine if these hormones have a relation with their duration and activity.

This study included 478 participants, who were divided into four groups: 1) a control group of healthy individuals, 2) patients with RA, 3) patients with SLE and 4) patients with advanced atherosclerosis, from whom we obtained clinical and laboratorial data and biological samples (blood). These were processed for quantification of adiponectin and leptin serum levels.

The analysis revealed statistically significant differences in serum levels of adiponectin and leptin, according to the diagnosis group. Patients with RA and SLE exhibited higher levels of both hormones. Serum levels of adiponectin are higher in women with advanced atherosclerosis than in men with the same diagnosis. Leptin displays a positive correlation with body mass index and abdominal perimeter, although the same relationship was not found for adiponectin. Nevertheless, neither adiponectin nor leptin showed a consistent relationship with the disease duration or disease activity. Our results suggest a possible role of adiponectin and leptin in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases among overweight/obese individuals, whose prevalence is significant in this sample.

Key-words: adiponectin; leptin; inflammation; rheumatoid arthritis; systemic lupus erythematosus; atherosclerosis.

ÍNDICE

Introdução	5
Objetivos	9
Materiais e Métodos	10
1. Indivíduos.....	10
2. Processamento das Amostras Biológicas.....	11
3. Análise Estatística.....	12
Resultados	13
1. Caracterização da População.....	13
A. Análise de Subgrupos – Raça.....	18
B. Análise de Subgrupos – Género.....	18
C. Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica.....	19
D. Análise de Subgrupos – Pré e Pós-Menopausa.....	23
2. Correlações.....	26
Discussão	31
Agradecimentos	39
Referências Bibliográficas	40
Anexos	46

INTRODUÇÃO

Atualmente reconhece-se uma importância crescente das adipocinas no desenvolvimento de processos inflamatórios sistêmicos, nomeadamente através de estados de inflamação proporcionados pela desregulação destas moléculas na presença de obesidade. A adiponectina é uma das adipocinas com maior interesse nesta matéria e, sobre a qual, ainda muito existe por esclarecer. Esta proteína, também designada por GBP28 (gelatin-binding protein), apM1 (adiPose Most abundant gene transcript 1), Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa) ou adipoQ, é produzida essencialmente pelo tecido adiposo branco e existe em circulação sob diferentes isoformas, todas elas com um importante grau de estabilidade. [3,4,11,12,13,15] Pode assim apresentar-se na sua forma de cadeia linear, como trímero (baixo peso molecular), hexâmero (peso molecular intermédio) e multímero (elevado peso molecular), ou na sua forma globular. [2,3,5,6,12,13,21,22]

A adiponectina exerce as suas funções biológicas através de ligação aos seus recetores, nomeadamente o recetor AdipoR1 (expresso sobretudo no músculo esquelético) e o recetor AdipoR2 (expresso maioritariamente no fígado). [1,2,3,4,5,11,13,14,15,22] Existe ainda um terceiro recetor, T-caderina, com expressão mais significativa no coração e endotélio vascular, que embora possa ter algum papel cardioprotetor, parece ter uma relevância muito limitada, uma vez que não possui domínio citoplasmático. [1,2,3,14,22] Sabe-se ainda que em algumas células existe uma proteína de ligação ao recetor da adiponectina, a APPL1 (adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1), que serve como mediador do processo de sinalização intracelular. [2,3,13,22] A adiponectina atua através de diferentes mecanismos de transdução de sinal, sendo os mais conhecidos a via de ativação da AMPK, a via de ativação PPAR e a via da ceramidase. [22]

Esta adipocina é relativamente abundante no plasma, apresentando um valor sérico normal superior ao de outras moléculas produzidas pelo tecido adiposo (cerca de 0,01-0,05% de todas as proteínas plasmáticas) e com um tempo de semi-vida relativamente curto (45-75 minutos). [3,7,13] Estes valores tendem a diminuir com o avançar da idade e com o desenvolvimento de insulino-resistência. [8] Da mesma forma, é reconhecido que em doentes centenários, isto é, em pessoas com elevada longevidade, os níveis séricos de adiponectina são superiores ao que seria de esperar para a idade, estando mantida a sensibilidade à insulina. [7,10]

Os níveis plasmáticos desta molécula tendem a apresentar-se diminuídos em doentes obesos, estando já demonstrado em vários estudos uma relação inversamente proporcional entre o Índice de Massa Corporal (IMC) e a adiponectinemia, sobretudo relacionada com a presença de obesidade central. [1,2,3,5,6,8,11,12,14] É também reconhecido o papel da adiponectina na síndrome metabólica (SM), uma vez que a sua principal ação é a sensibilização das células à insulina, que é conseguida quer através do aumento da oxidação de ácidos gordos e captação de glicose no músculo, como também pela inibição da expressão de enzimas envolvidas na gliconeogénese no fígado e, conseqüentemente, redução da síntese hepática de glicose. [1,2,3,5,6,11,13,15] A adiponectina exerce ainda uma função anti-apoptótica a nível das células β do pâncreas, através do aumento de atividade intracelular da ceramidase. [1,3,5] Desta forma, tem sido observada a presença de hipoadiponectinemia em doentes com SM. [2,3,5]

Estudos em diferentes populações demonstraram que as concentrações séricas de adiponectina são relativamente superiores em mulheres, e apesar de se verificarem algumas diferenças nos níveis basais entre raças (caucasianos exibem níveis mais elevados em comparação com afro-americanos ou asiáticos), parece ser evidente que a hipoadiponectinemia se associa a estados de insulino-resistência, diabetes *mellitus* tipo 2 e SM independentemente da raça em questão.

Para além das propriedades enunciadas anteriormente, está também descrita uma ação anti-inflamatória da adiponectina, visto que promove a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 6 (IL-6) e diminuição da fagocitose pelos macrófagos e, por outro lado, estimula a síntese de citocinas anti-inflamatórias (como a IL-10). [2,3,4,12,14] Além disso, atua no endotélio inibindo a expressão de moléculas de adesão e a progressão do processo aterosclerótico. [2, 3,20,21]

Apesar deste papel, múltiplos estudos demonstraram níveis séricos mais elevados de adiponectina em doenças crónicas, como a artrite reumatóide (AR) e lúpus eritematoso sistémico (LES), o que parece contradizer o que seria de esperar, tendo em conta o papel da inflamação na fisiopatologia destas doenças. [4,8,11,12,13,14] No que respeita concretamente à AR há também evidência da presença de concentrações aumentadas de adiponectina no líquido sinovial, parecendo atuar como promotor do processo inflamatório articular. [4,8,11,12,13,14,15] Já no LES as dúvidas são mais persistentes, tendo em conta que alguns autores descrevem este aumento sérico da proteína nos doentes com LES em relação aos controlos, sendo mesmo por vezes

descrita uma correlação com o grau de atividade da doença, enquanto noutros estudos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. [4,8,14] Sabe-se também que doentes com AR têm uma maior prevalência de SM, e que, nestes doentes, os níveis de adiponectina são menores do que em doentes com AR sem SM. [11] O mesmo se verifica nos doentes com LES com e sem SM. [4,11]

Por outro lado, seria de esperar que da mesma maneira que a adiponectina se relaciona com a SM, o mesmo se verificasse no que respeita à doença cardiovascular, visto que as entidades que compõem esta síndrome (obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão) representam fatores de risco cardiovascular. [8,11,12] Apesar disso, resultados contraditórios têm sido publicados: alguns estudos observam o papel cardioprotector da adiponectina, que parece impedir ou atrasar a remodelação cardíaca após eventos agudos, estando também a presença de níveis reduzidos desta molécula associados à doença coronária, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e aumento de risco de enfarte agudo do miocárdio [3,20,22,24]; outros estudos, não demonstraram a existência de associação entre os níveis de adiponectina e a doença cardiovascular.

[17,18,19,20]

A importância do tecido adiposo na regulação de processos inflamatórios vai muito além da adiponectina, existindo outras hormonas e citocinas também por ele segregadas com um papel interventivo no desenvolvimento de determinados estados patológicos, como é o caso da leptina. Esta molécula é também maioritariamente produzida pelo tecido adiposo branco, contudo, ao contrário da adiponectina, os seus níveis séricos têm um valor diretamente proporcional à massa deste tecido e ao próprio IMC, encontrando-se também associada à presença de SM. [4,7,11,12,28] A leptina pertence à classe I da superfamília das citocinas, sendo a suas principais funções a regulação do apetite/saciedade, a regulação do gasto energético corporal e a participação no desenvolvimento do sistema reprodutor. [4,7,11,28] Para tal, atua nos seus recetores a nível hipotalâmico, modulando a ingestão de alimentos e gasto calórico, através da estimulação de secreção de péptidos anorexigénicos e inibição da produção de péptidos orexigénicos. [4,13,15,16,25,28] A sua produção é assim diretamente dependente do estado energético, sendo regulada por fatores como a insulina, mas também mediadores inflamatórios, corticóides e hormonas esteróides. [12,16,28]

Para além da relevância associada ao balanço energético, a leptina tem ganho recentemente um novo interesse pela sua ação enquanto hormona moduladora do sistema imunitário, promovendo a ativação dos sistemas de imunidade inata e

adaptativa, nomeadamente através da proliferação e ativação de macrófagos, produção de espécies reativas de oxigénio, proliferação de células T (sobretudo com indução da resposta Th1) e supressão da produção de células T reguladoras, entre outros, o que pode contribuir para a depressão do sistema imunitário em situações de défice nutricional. [4,12,16] Assim, tal como a adiponectina, o papel da leptina no desenvolvimento de doenças inflamatórias como a AR e o LES tem sido estudado. No que respeita à AR, a sua ação ainda não é clara, uma vez que alguns estudos associam a leptina à diminuição da inflamação e proteção contra a doença, enquanto noutros, a existência de uma função pró-inflamatória é descrita, com presença de níveis mais elevados associados à atividade da AR. [4,12,15,16,28] Já no LES os resultados são mais consistentes, sendo que níveis mais elevados de leptina estão associados a maior atividade da doença. [4,12,28,31]

OBJETIVOS

Este trabalho pretende caracterizar os níveis séricos de adiponectina e leptina, em indivíduos saudáveis e em doentes, com particular foco para a patologia reumática crónica e a doença aterosclerótica evoluída.

Assim, os principais objetivos são:

- Descrever os níveis séricos de adiponectina e leptina em indivíduos saudáveis (sem doença cardiovascular ou doença inflamatória crónica conhecida), em doentes com aterosclerose evoluída (candidatos a endarterectomia carotídea) e em duas doenças reumáticas inflamatórias sistémicas (AR e LES), sem doença aterosclerótica clinicamente evidente.
- Relacionar os níveis séricos de adiponectina e de leptina com as características demográficas (idade, raça e género) e clínicas (presença de fatores de risco cardiovascular, incluindo síndrome metabólica e marcadores de inflamação sistémica) dos indivíduos em cada um dos grupos.
- Estudar a relação entre os valores séricos de adiponectina e a duração e atividade da doença inflamatória reumática crónica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Indivíduos

A amostra selecionada para este estudo inclui 478 doentes e foi dividida em 4 grupos, de acordo com 4 diagnósticos: grupo de indivíduos saudáveis (sem doença reumática crónica ou doença aterosclerótica conhecida), grupo de doentes com AR, grupo de doentes com LES e grupo de doentes com doença aterosclerótica evoluída (candidatos a endarterectomia).

Os indivíduos foram selecionados dentro da população de doentes do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE (Hospital de Santa Maria) e do Hospital Garcia de Orta, EPE, tendo a recolha de dados clínicos e amostras biológicas (sangue) sido aprovada pelas respetivas Comissões de Ética. Todos os participantes assinaram um consentimento informado e todos os procedimentos foram efetuados respeitando a declaração de Helsínquia.

Os dados clínicos e amostras biológicas (sangue) foram recolhidos nos seguintes períodos de tempo: indivíduos saudáveis entre maio de 2007 e julho de 2010; doentes com AR entre abril de 2008 e junho de 2010; doentes com LES entre maio de 2007 e maio de 2010; doentes com aterosclerose evoluída entre maio de 2012 e maio de 2015. Os dados clínicos incluíram informações acerca de idade, género, raça, diagnóstico de hipertensão arterial/dislipidemia/diabetes *mellitus* tipo 2, IMC, perímetro abdominal (PA), diagnóstico de SM, condição de pré ou pós-menopausa (no caso de doentes do sexo feminino) e idade de início da doença/duração da doença/atividade da doença (no caso dos doentes com AR ou LES). Foram ainda obtidos dados laboratoriais referentes aos valores de proteína C-reativa (PCR) e velocidade de sedimentação (VS). As amostras de sangue colhidas foram processadas para obtenção dos níveis séricos de adiponectina (nos 4 grupos) e leptina (nos grupos de indivíduos saudáveis, doentes com AR e LES).

A categorização do IMC foi efetuada de acordo com a classificação internacional da Organização Mundial de Saúde, sendo os doentes classificados como tendo excesso de peso e obesidade, quando apresentaram um $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, respetivamente.

O diagnóstico de SM foi determinado de acordo com a classificação internacional da Federação Internacional de Diabetes (IDF), que define esta síndrome

como a presença de obesidade central (PA \geq 94 cm nos homens e PA \geq 80 cm nas mulheres) simultaneamente com mais dois dos seguintes quatro critérios: 1- hipertrigliceridemia (triglicéridos \geq 150 mg/dL) ou tratamento específico para esta anormalidade lipídica; 2-redução do colesterol HDL ($<$ 40 mg/dL nos homens e $<$ 50 mg/dL nas mulheres) ou tratamento específico para esta anormalidade lipídica; 3-elevação da pressão arterial sistólica \geq 130 mmHg ou pressão arterial diastólica \geq 85 mmHg, ou tratamento para uma hipertensão previamente diagnosticada; 4-elevação da glucose plasmática \geq 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de diabetes *mellitus* tipo 2.

O grau de atividade da doença reumática nos doentes com AR foi avaliado através da escala *Disease Activity Score* (DAS 28) e impacto funcional através do *Health Assessment Questionnaire* (HAQ). O grau de atividade nos doentes com LES foi avaliado através do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K) e o dano irreversível através do *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC)- Disability Index.

2. Processamento das Amostras Biológicas

As amostras de soro foram obtidas a partir de sangue, por sua vez centrifugado após colheita a 1250G durante 10 minutos, a 4°C. O soro foi conservado a -80°C até ao momento da realização dos testes de ELISA para doseamento da adiponectina e leptina. Foram realizados os seguintes protocolos: protocolo FlowCytomix Human Adiponectin Simplex Kit – BMS82032FF (ANEXO I) foi usado no processamento das amostras de indivíduos saudáveis, AR e LES para obtenção dos níveis séricos de adiponectina; este kit tem uma sensibilidade de deteção da adiponectina sérica para valores até 0,06 ng/ml; protocolo RayBio® Human Acrp30 ELISA Kit – ELH-Adiponectin (ANEXO II) foi utilizado no processamento das amostras de doentes com aterosclerose evoluída para obtenção dos níveis séricos de adiponectina; o valor sérico mínimo de adiponectina detetado com este kit é de 25 pg/ml; protocolo FlowCytomix Human Leptin Simplex Kit – BMS82039FF (ANEXO III), foi usado no processamento das amostras de indivíduos saudáveis, AR e LES para obtenção dos níveis séricos de leptina; o valor mínimo de deteção da leptina no plasma foi definido para 1,4 ng/mL. Todos os protocolos se encontram em anexo.

3. Análise Estatística

A análise estatística descritiva dos dados clínicos obtidos e a comparação dos mesmos entre os diferentes grupos de diagnóstico foi efetuada utilizando o programa SPSS[®] (Statistical Package for Social Sciences) versão 23. O significado estatístico foi definido para a presença de um valor $p < 0,05$ e um intervalo de confiança de 95%. Uma vez que tanto a adiponectina como a leptina apresentaram uma distribuição não normal, avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov's test ($N > 30$, $P \geq 0.050$), foi assumida a não normalidade em todos os testes subsequentes.

RESULTADOS

1. Caracterização da população

Dos 478 indivíduos que compõem este estudo, 116 integram o grupo de indivíduos saudáveis (grupo 1), 103 o grupo de doentes com AR (grupo 2), 121 o grupo de doentes com LES (grupo 3) e 138 o grupo de doentes com aterosclerose evoluída (grupo 4). Os grupos 1, 2 e 3 são compostos exclusivamente por indivíduos do sexo feminino, com idades compreendidas entre 18 e 77 anos, 19 e 78 anos e 18 e 80 anos, respetivamente. O grupo 4 é composto por doentes com idades compreendidas entre os 47 e os 86 anos, sendo que 31,9% dos indivíduos são do sexo feminino (N 44) e 68,1% dos indivíduos são do sexo masculino (N 94).

Tabelas 1 e 2: Caracterização da população de indivíduos saudáveis (grupo 1)

VARIÁVEL	Média ± DP	Mediana
Idade (N 116) (anos)	47,2 ± 13,6	49,0
TA sistólica (N 113) (mmHg)	124,6 ± 19,7	124,0
TA diastólica (N 113) (mmHg)	71,8 ± 11,3	72,0
IMC (N 114) (kg/m ²)	26,8 ± 4,9	26,4
PA (N 114) (cm)	84,3 ± 11,1	85,5
PCR (N 99) (mg/dL)	0,31 ± 0,30	0,20
VS (N 95) (mg/dL)	20,7 ± 13,0	19,0

TA – Tensão arterial; IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro Abdominal; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; DP – desvio-padrão.

VARIÁVEL	% (n° absoluto)
Raça (N 116)	
Negra	1,7 (2)
Caucasiana	98,3 (114)
Oriental	0,0 (0)
Tabaco (N 114)	
Fumador	20,2 (23)
Não Fumador	73,7 (84)
Ex-fumador	6,1 (7)
Exercício (N 114)	
Sedentário	81,6 (93)
Activo	18,4 (21)
Diagnóstico HTA (N 114)	42,1 (48)
Diagnóstico Dislipidemia (N 114)	58,8 (67)
Diagnóstico Diabetes (N 114)	7,9 (9)

Diagnóstico de SM (N 112)	18,8 (21)
Pós-menopausa (N 111)	53,2 (59)

HTA – Hipertensão arterial; SM – Síndrome metabólica.

No grupo 1, os indivíduos apresentam um valor médio de IMC de 26,8 kg/m², sendo que cerca de 30,7% (N 35) têm excesso de peso e 28,1% têm obesidade. O valor médio de PA é de 84,3 cm, sendo que cerca de 59% das mulheres apresenta obesidade central (PA > 80 cm). Este grupo é composto maioritariamente por mulheres de raça caucasiana, que representam cerca de 98,3% do total. Cerca de 42,1% dos indivíduos são hipertensos, 58,8% apresentam dislipidemia e 7,9% são diabéticos. Apesar de não apresentarem patologia inflamatória crónica conhecida, cerca de 18,8% do grupo cumprem critérios de SM. 53,2% das mulheres encontram-se na pós-menopausa.

Tabelas 3 e 4: Caracterização da população com AR (grupo 2)

VARIÁVEL	Média ± DP	Mediana
Idade (N 103) (anos)	50,3 ± 14,3	53,0
TA sistólica (N103) (mmHg)	128,1 ± 21,3	126,0
TA diastólica (N103) (mmHg)	75,0 ± 12,0	74,0
IMC (N 103) (kg/m²)	27,8 ± 5,2	27,7
PA (N 98) (cm)	87,0 ± 11,2	86,5
Idade início doença (N 103) (anos)	39,3 ± 13,8	38,0
Duração da doença (N 103) (anos)	10,0 ± 7,4	8,2
PCR (N 103) (mg/dL)	1,06 ± 2,59	0,40
VS (N 103) (mg/dL)	38,8 ± 25,2	34,0

TA – Tensão arterial; IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro Abdominal; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; DP – desvio-padrão.

VARIÁVEL	% (nº absoluto)
Raça (N 103)	
Negra	9,7 (10)
Caucasiana	89,3 (92)
Oriental	1,0 (1)
Tabaco (N 103)	
Fumador	15,5 (16)
Não Fumador	78,6 (81)
Ex-fumador	5,8 (6)
Exercício (N 103)	
Sedentário	86,4 (89)
Activo	13,6 (14)
Diagnóstico HTA (N 103)	52,4 (54)

Diagnóstico Dislipidemia (N 103)	62,1 (64)
Diagnóstico Diabetes (N 103)	6,8 (7)
Diagnóstico de SM (N 98)	23,5 (23)
Pós- menopausa (N 103)	59,2 (61)

HTA – Hipertensão arterial; SM – Síndrome metabólica.

No grupo 2, 40,8% (N 42) dos indivíduos apresenta excesso de peso e 31,1% obesidade (N 32), sendo o IMC médio deste grupo de 27,8 kg/m². Verifica-se a presença de um PA médio de 87,0 cm, sendo que cerca de 72% tem PA > 80cm. Também neste grupo existe um predomínio de indivíduos de raça caucasiana, que representam cerca de 89,3% do grupo. 52,4% dos indivíduos são hipertensos, 62,1% apresentam algum tipo de dislipidemia e 6,8% são diabéticos. No grupo de doentes com AR a prevalência de SM é de 23,5% (superior ao grupo de indivíduos saudáveis) e aproximadamente 59,2% das mulheres encontram-se na pós-menopausa.

Tabelas 5 e 6: Caracterização da população com LES (grupo 3)

VARIÁVEL	Média ± DP	Mediana
Idade (N 121) (anos)	44,7 ± 13,8	43,0
TA sistólica (N 108) (mmHg)	126,5 ± 21,2	122,0
TA diastólica (N 108) (mmHg)	76,4 ± 11,0	76,5
IMC (N 120) (kg/m ²)	26,6 ± 5,0	25,9
PA (N 106) (cm)	86,2 ± 11,6	86,0
Idade início doença (N 121) (anos)	35,5 ± 14,0	34,0
Duração da doença (N 121) (anos)	8,1 ± 6,5	6,5
SLEDAI-2K (N 121)	3,5 ± 4,3	2,0
PCR (N 105) (mg/dL)	1,18 ± 3,30	0,30
VS (N 107) (mg/dL)	35,4 ± 28,3	25,0

TA – Tensão arterial; IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro Abdominal; SLEDAI-2k - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000; PCR – proteína C-reativa; VS – Velocidade de Sedimentação; DP – desvio-padrão.

VARIÁVEL	% (n° absoluto)
Raça (N 121)	
Negra	14,0 (17)
Caucasiana	86,0 (104)
Oriental	0,0 (0)
Tabaco (N 121)	
Fumador	13,2 (16)
Não Fumador	75,2 (91)
Ex-fumador	11,6 (14)

Exercício (N 121)	
	Sedentário 79,3 (96)
	Activo 20,7 (25)
Diagnóstico HTA (N 121)	52,1 (63)
Diagnóstico Dislipidemia (N 121)	64,5 (78)
Diagnóstico Diabetes (N 121)	7,4 (9)
Diagnóstico de SM (N 103)	23,3 (24)
Pós-menopausa (N 104)	50,0 (52)

HTA – Hipertensão arterial; SM – Síndrome metabólica.

No grupo 3 verifica-se também um predomínio de excesso de peso e obesidade, face aos valores de referência de IMC definidos pela OMS, e que correspondem respetivamente a cerca de 30% (N 36) e 25,8% (N 31) do grupo (IMC médio de 26,6 kg/m²). O valor médio de PA é de 86,2 cm. Neste grupo, 14% dos indivíduos são de raça negra e os restantes 86% de raça caucasiana. Apresentam um diagnóstico prévio de hipertensão, dislipidemia e diabetes cerca de 52,1%, 64,5% e 7,4%, respetivamente. 23,3% têm definido o diagnóstico de SM. Metade das mulheres deste grupo encontra-se na pós-menopausa.

Tabelas 7 e 8: Caracterização da população com aterosclerose evoluída (grupo 4)

VARIÁVEL	Média ± DP	Mediana
IDADE (N 138) (anos)	70,7 ± 9,0	72,0
IMC (N 138) (kg/m ²)	27,1 ± 4,5	26,7
PA (N 79) (cm)	101,2 ± 13,9	100,0

IMC – Índice de massa corporal; PA – perímetro abdominal; DP – desvio-padrão.

VARIÁVEL	% (nº absoluto)
Género (N 138)	
Feminino	31,9 (44)
Masculino	68,1 (94)
Raça (N 137)	
Negra	2,9 (4)
Caucasiana	97,1 (133)
Oriental	0,0 (0)
Tabaco (N 136)	
Fumador	12,5 (17)
Não Fumador	45,6 (62)
Ex-fumador	41,9 (57)
Exercício (N 137)	
Sedentário	61,3 (84)

	Activo	38,7 (53)
Diagnóstico HTA (N 133)		84,2 (112)
Diagnóstico Dislipidemia (N 126)		89,7 (113)
Diagnóstico Diabetes (N 117)		29,1 (34)

HTA – Hipertensão arterial.

Por fim, no grupo 4, apresentam excesso de peso 41,3% (N 57) e obesidade 25,4% (N 35) dos indivíduos. Neste grupo, composto por indivíduos de ambos os géneros, os valores médios de IMC e PA são respetivamente 27,1 kg/m² e 101,2 cm. Existe um claro predomínio da raça caucasiana (97,1%), face à raça negra. Nestes indivíduos com aterosclerose evoluída há uma elevada prevalência de hipertensão (84,2%), dislipidemia (89,7%) e diabetes (23,1%).

Tabela 9: Distribuição dos valores séricos de adiponectina e leptina

Tendo em conta que a adiponectina e a leptina apresentam uma distribuição não normal em todos os grupos de diagnóstico, foram utilizados testes não paramétricos para comparação da sua distribuição.

VARIÁVEL	Indivíduos Saudáveis	AR	LES	Aterosclerose evoluída	p-value ^a
N	116	103	121	138	
Adiponectina [média ± DP (mediana); (ng/mL)]	3123,1 ± 2363,1 (2400,9)	4117,4 ± 4205,3 (2653,5)	10780,1 ± 6921,6 (8518,7)	140460,7 ± 147974,1 (97400,0)	<0,001
Leptina [média ± DP (mediana); (ng/mL)]	168,9 ± 225,9 (90,2)	265,7 ± 379,7 (144,5)	178,3 ± 286,1 (103,3)	_____	0,039

AR – Artrite reumatóide; LES – Lúpus eritematoso sistémico DP – desvio-padrão.

^a De acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

* Correlação estatisticamente significativa.

A tabela 9 mostra a distribuição dos níveis de adiponectina nos grupos de diagnóstico, sendo possível observar um nível crescente dos valores séricos da molécula do grupo de indivíduos saudáveis, para os doentes com AR, doentes com LES e doentes com aterosclerose evoluída (apresentam média mais elevada), sendo esta diferença entre grupos estatisticamente significativa (valor p <0,001). Temos ainda a distribuição dos níveis séricos de leptina nos grupos 1, 2 e 3, desta vez com o grupo 2 a registar uma

média mais elevada. Embora não seja tão acentuada como no caso da adiponectina, também aqui existe uma diferença estatisticamente significativa na distribuição da molécula pelos grupos de diagnóstico (valor p 0,039).

A. Análise de Subgrupos – Raça

Tabela 10: Análise de Subgrupos – Raça

VARIÁVEL	Negra	N	Caucasiana	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	7845,8 (29,7/ 25348,5)	29	6009,0 (62,7/ 23007,9)	310	ng/mL	0,551 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	258,9 (1,4/ 806,2)	29	196,8 (1,4/ 2147,0)	310	ng/mL	0,003 ^{a*}

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Não se verificou a presença de uma relação estatisticamente significativa entre a distribuição dos níveis de adiponectina e a raça.

Já a análise de subgrupos para a leptina demonstrou a existência de uma diferença estatisticamente significativa na sua distribuição entre raças, apresentando a raça negra valores séricos mais elevados de leptina.

Nota: esta análise inclui apenas os grupos 1, 2 e 3, para os quais o método de doseamento da adiponectina aplicado foi o mesmo.

B. Análise de Subgrupos – Género

Tendo em conta que os grupos 1, 2 e 3 são compostos exclusivamente por mulheres, esta análise foi efetuada apenas para o grupo 4.

Tabela 11: Análise de Subgrupos – Género para os doentes com aterosclerose evoluída (grupo 4)

VARIÁVEL	MASCULINO	N	FEMININO	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	117984,7 (0,0/ 669000,0)	94	188477,5 (1810,0/ 1010000,0)	44	ng/ml	0,008 ^{a*}

Idade [Média (Min./Máx.)]	70,3 (47,0/ 86,0)	94	71,5 (48,0/ 86,0)	44	Anos	0,396 ^a
IMC [Média (Min./Máx.)]	27,1 (18,4/ 38,5)	94	27,3 (16,9/ 45,0)	44	kg/m ²	0,851 ^a
PA [Média (Min./Máx.)]	103,0 (76,0/ 152,0)	55	96,9 (71,0/ 140,0)	24	cm	0,053 ^a
HTA (%)	82,0	89	88,6	44		0,450 ^b
Dislipidemia (%)	88,5	87	92,3	39		0,753 ^b
Diabetes (%)	26,3	80	35,1	37		0,383 ^b
PCR [Média (Min./Máx.)]	1,49 (0,05/ 26,00)	92	0,62 (0,05/ 2,78)	44	mg/dL	0,678 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Como seria de esperar, o grupo de doentes do sexo feminino apresenta valores séricos mais elevados de adiponectina, em comparação com os valores séricos da molécula nos doentes do sexo masculino, sendo esta diferença de género estatisticamente significativa para um valor p de 0,008.

C. Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica

Não foi possível apurar a presença de SM nos doentes com aterosclerose evoluída, pelo que os seguintes resultados dizem respeito à análise efetuada para os grupos 1, 2 e 3.

Tabela 12: Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica

VARIÁVEL	Normal	N	Síndrome Metabólica	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	5625,7 (29,7/ 23686,4)	245	5560,6 (255,9/22566,4)	68	ng/mL	0,997 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	197,5 (1,4/ 2147,0)	245	260,5 (1,4 / 2007,7)	68	ng/mL	0,175 ^a

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*

De acordo com a tabela 12, nem a adiponectina nem a leptina apresentam uma relação estatisticamente significativa com o diagnóstico de SM.

Tabela 13: Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica para os indivíduos saudáveis (grupo 1)

VARIÁVEL	Normal	N	Síndrome Metabólica	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	3262,4 (193,2/ 14838,9)	91	2721,2 (517,0/ 8285,9)	21	ng/ml	0,434 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	160,9 (1,4/ 1593,3)	91	228,8 (23,5/ 570,1)	21	ng/ml	0,015 ^{a*}
Idade [Média (Min./Máx.)]	44,6 (18,0/ 71,0)	91	58,3 (34,0/ 73,0)	21	Anos	<0,001 ^{a*}
IMC [Média (Min./Máx.)]	26,0 (18,5/ 36,6)	91	30,7 (23,6/ 40,1)	21	kg/m ²	<0,001 ^{a*}
PA [Média (Min./Máx.)]	82,6 (58,0/ 104,0)	91	92,8 (78,0/ 109,0)	21	Cm	<0,001 ^{a*}
HTA (%)	33,0	91	85,7	21		<0,001 ^{b*}
Dislipidemia (%)	51,6	91	95,2	21		<0,001 ^{b*}
Diabetes (%)	1,1	91	38,1	21		<0,001 ^{b*}
PCR [Média (Min./Máx.)]	0,29 (0,10/ 1,80)	79	0,37 (0,10/ 0,70)	19	mg/dL	0,010 ^{a*}
VS [Média (Min./Máx.)]	18,2 (2,0/ 57,0)	76	30,7 (12,0/ 58,0)	19	mg/dL	<0,001 ^{a*}

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reativa; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*

^b De acordo com Teste de Fisher

* Correlação estatisticamente significativa

No grupo de indivíduos saudáveis, os níveis séricos de adiponectina distribuem-se de maneira semelhante entre os indivíduos com ou sem diagnóstico de SM. Contudo, verificam-se diferenças significativas em todas as restantes variáveis analisadas e a existência ou não desta síndrome, nomeadamente com presença de níveis mais elevados de leptina, idade mais avançada, valores superiores de IMC, PA e marcadores de inflamação (PCR e VS) e maior prevalência de HTA, dislipidemia e diabetes nos doentes com SM.

Gráfico 1: Análise de Subgrupos – Distribuição da adiponectina de acordo com o diagnóstico de Síndrome Metabólica nos indivíduos saudáveis (grupo 1)

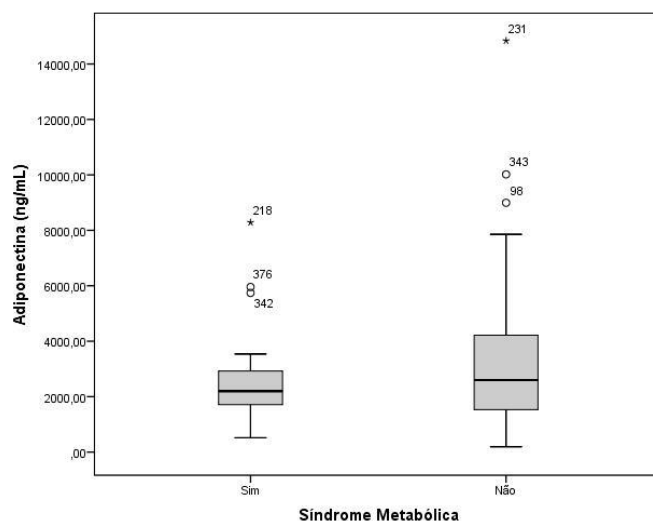


Tabela 14: Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica para os doentes com AR (grupo 2)

VARIÁVEL	Normal	N	Síndrome Metabólica	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	4161,5 (29,7/ 21255,6)	75	4124,3 (255,9/ 17831,7)	23	ng/ml	0,725 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	249,6 (1,4/ 1806,4)	75	349,6 (1,4/ 2007,7)	23	ng/ml	0,543 ^a
Idade [Média (Min./Máx.)]	47,2 (19,0/ 72,0)	75	57,7 (23,0/ 78,0)	23	Anos	0,002 ^{a**}
IMC [Média (Min./Máx.)]	26,7 (18,3/ 39,6)	75	31,3 (24,2/ 43,0)	23	kg/m ²	0,002 ^{a**}
PA [Média (Min./Máx.)]	84,4 (55,0/ 102,0)	75	95,0 (72,0/ 118,0)	22	Cm	<0,001 ^{a**}
HTA (%)	40,0	75	91,3	23		<0,001 ^{b**}
Dislipidemia (%)	49,3	75	95,7	23		<0,001 ^{b**}
Diabetes (%)	1,3	75	26,1	23		<0,001 ^{b**}
PCR [Média (Min./Máx.)]	0,75 (0,10/ 3,40)	75	2,24 (0,10/23,30)	23	mg/dL	0,376 ^a
VS [Média (Min./Máx.)]	37,3 (1,0/ 103,0)	75	44,4 (9,0/ 120,0)	23	mg/dL	0,486 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Gráfico 2: Análise de Subgrupos – Distribuição da adiponectina de acordo com o diagnóstico de Síndrome Metabólica nos doentes com AR (grupo 2)

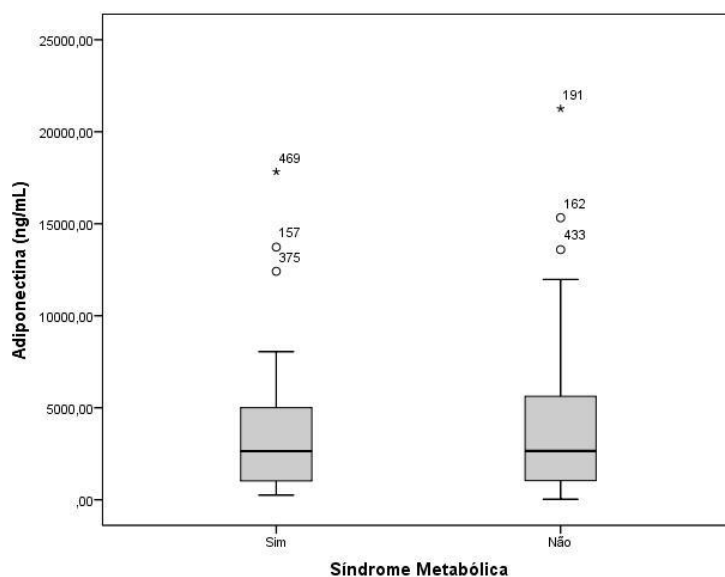


Tabela 15: Análise de Subgrupos – Diagnóstico de Síndrome Metabólica para os doentes com LES (grupo 3)

VARIÁVEL	Normal	N	Síndrome Metabólica	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	9738,0 (761,6/ 23686,4)	79	9421,6 (2098,6/ 22566,4)	24	ng/ml	0,761 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	190,3 (1,4/ 2147,0)	79	202,9 (1,4/ 989,5)	24	ng/ml	0,465 ^a
Idade [Média (Min./Máx.)]	44,6 (22,0/ 76,0)	79	51,9 (20,0/ 71,0)	24	Anos	0,014 ^{a*}
IMC [Média (Min./Máx.)]	26,6 (18,4/ 39,5)	79	29,1 (18,3/ 47,3)	24	kg/m ²	0,041 ^{a*}
PA [Média (Min./Máx.)]	85,1 (62,0/ 117,0)	79	91,4 (76,0/ 115,0)	24	Cm	0,009 ^{a*}
HTA (%)	44,3	79	87,5	24		<0,001 ^{b*}
Dislipidemia (%)	62,0	79	87,5	24		0,024 ^{b*}
Diabetes (%)	1,3	79	29,2	24		<0,001 ^{b*}

PCR [Média (Min./Máx.)]	1,05 (0,00/ 23,80)	79	1,05 (0,10/ 4,80)	24	mg/dL	0,045 ^{a*}
VS [Média (Min./Máx.)]	32,9 (2,0/ 120,0)	79	42,3 (6,0/ 107,0)	24	mg/dL	0,098 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

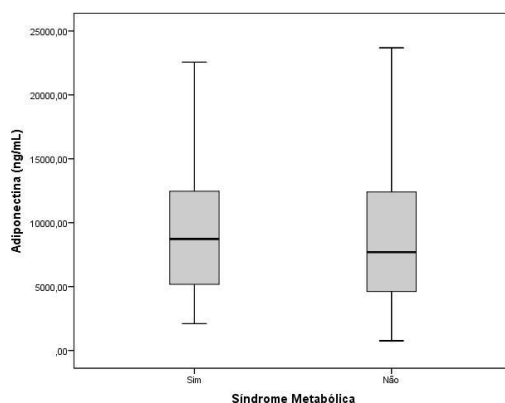
^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Tal como é possível observar nas tabelas 14 e 15, tanto nos doentes com AR como nos doentes com LES não se verificou a presença de diferenças significativamente estatísticas na distribuição dos valores séricos de adiponectina ou leptina nos doentes com e sem SM (com valores p de 0,725 e 0,543 respetivamente para a AR e 0,761 e 0,461 respetivamente para o LES). Contudo, também em ambos os grupos, a ocorrência desta síndrome relaciona-se de forma significativa com a presença de idades mais avançadas, valores superiores de IMC e PA e maior prevalência de HTA, dislipidemia e diabetes.

Gráfico 3: Análise de Subgrupos – Distribuição da adiponectina de acordo com o diagnóstico de Síndrome Metabólica nos doentes com LES (grupo 3)



D. Análise de Subgrupos – Pré e Pós- Menopausa

Não foi possível apurar os estados de pré/pós-menopausa nas doentes com aterosclerose evoluída, pelo que os seguintes resultados dizem respeito à análise efetuada para os grupos 1, 2 e 3.

Tabela 16: Análise de Subgrupos – Pré e Pós-Menopausa

VARIÁVEL	Pré-menopausa	N	Pós-menopausa	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	5303,3 (189,7/ 23007,9)	146	5774,2 (29,7/23686,4)	172	ng/mL	0,682 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	168,3 (1,4/ 1593,3)	146	246,3 (1,4/ 2147,0)	172	ng/mL	0,007 ^{a*}

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*

* Correlação estatisticamente significativa.

De acordo com a tabela 16 é possível observar que não existe uma relação estatisticamente significativa entre a distribuição de adiponectina e o estado de pré/pós-menopausa (valor p de 0,682). Por outro lado, para a distribuição sérica de leptina, verifica-se a presença de uma diferença significativa, apresentando as mulheres na pós-menopausa valores mais elevados de leptina (valor p de 0,007).

Tabela 17: Análise de Subgrupos – Pré-Menopausa e Pós-Menopausa nos indivíduos saudáveis (grupo 1)

VARIÁVEL	Pré-menopausa	N	Pós-menopausa	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	3198,5 (193,2/ 10019,1)	52	3135,7 (381,8/ 14838,9)	59	ng/ml	0,442 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	150,3 (1,4/ 1593,3)	52	196,1 (1,4/ 914,3)	59	ng/ml	0,010 ^{a*}
Idade [Média (Min./Máx.)]	35,1 (18,0/ 50,0)	52	57,6 (40,0/ 73,0)	59	Anos	<0,001 ^{a*}
IMC [Média (Min./Máx.)]	24,5 (17,7/ 36,6)	52	28,7 (19,7/ 40,1)	59	kg/m ²	<0,001 ^{a*}
PA [Média (Min./Máx.)]	79,8 (65,0/ 104,0)	52	88,0 (58,0/ 109,0)	59	Cm	<0,001 ^{a*}
HTA (%)	25,0	52	57,6	59		0,001 ^{b*}
Dislipidemia (%)	34,6	52	81,4	59		<0,001 ^{b*}
Diabetes (%)	0,0	52	15,3	59		0,003 ^{b*}
PCR [Média (Min./Máx.)]	0,39 (0,10/ 1,80)	44	0,24 (0,10/ 0,70)	52	mg/dL	0,320 ^a
VS [Média (Min./Máx.)]	18,4 (2,0/ 58,0)	41	22,6 (2,0/ 57,0)	52	mg/dL	0,077 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Tabela 18: Análise de Subgrupos – Pré-Menopausa e Pós-Menopausa nas doentes com AR (grupo 2)

VARIÁVEL	Pré-menopausa	N	Pós-menopausa	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	3640,1 (189,7/ 11970,3)	42	4446,0 (29,7/ 21255,6)	61	ng/ml	0,526 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	249,0 (1,4/ 1593,3)	42	277,1 (1,4/ 2007,7)	61	ng/ml	0,650 ^a
Idade [Média (Min./Máx.)]	35,8 (19,0/ 53,0)	42	60,3 (40,0/ 78,0)	61	Anos	<0,001 ^{a*}
IMC [Média (Min./Máx.)]	26,5 (18,7/ 42,7)	42	28,7 (18,3/ 43,0)	61	kg/m ²	0,005 ^{a*}
PA [Média (Min./Máx.)]	84,1 (55,0/ 113,0)	41	89,1 (65,0/ 118,0)	57	Cm	0,038 ^{a*}
HTA (%)	28,6	42	68,9	61		<0,001 ^{b*}
Dislipidemia (%)	42,9	42	75,4	61		0,001 ^{b*}
Diabetes (%)	0,0	42	11,5	61		0,004 ^{b*}
PCR [Média (Min./Máx.)]	1,16 (0,10/ 9,60)	42	1,00 (0,10/ 23,30)	61	mg/dL	0,048 ^{a*}
VS [Média (Min./Máx.)]	37,8 (5,0/ 96,0)	42	39,5 (1,0/ 120,0)	61	mg/dL	0,791 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Tabela 19: Análise de Subgrupos – Pré-Menopausa e Pós-Menopausa nas doentes com LES (grupo 3)

VARIÁVEL	Pré-menopausa	N	Pós-menopausa	N	Unidades	p-value
Adiponectina [Média (Min./Máx.)]	8751,4 (600,3/ 23007,9)	52	10326,1 (761,6/ 23686,4)	52	ng/ml	0,110 ^a
Leptina [Média (Min./Máx.)]	120,9 (1,4/ 605,5)	52	267,3 (1,4/ 2147,0)	52	ng/ml	0,012 ^{a*}
Idade [Média (Min./Máx.)]	35,7 (20,0/ 53,0)	52	57,5 (32,0/ 80,0)	52	Anos	<0,001 ^{a*}
IMC [Média (Min./Máx.)]	26,6 (18,3/ 47,3)	52	27,7 (19,5/ 39,5)	52	kg/m ²	0,127 ^a
PA [Média (Min./Máx.)]	84,4 (62,0/ 115,0)	52	88,8 (68,0/ 117,0)	52	Cm	0,027 ^{a*}
HTA (%)	38,5	52	69,2	52		0,003 ^{b*}
Dislipidemia (%)	59,6	52	76,9	52		0,091 ^b

Diabetes (%)	3,8	52	11,5	52		0,269 ^b
PCR [Média (Min./Máx.)]	1,10 (0,00/ 23,80)	52	0,996 (0,10/ 17,00)	52	mg/dL	0,477 ^a
VS [Média (Min./Máx.)]	34,7 (2,0/ 120,0)	52	36,3 (4,0/ 107,0)	52	mg/dL	0,497 ^a

IMC – Índice de Massa Corporal; PA – Perímetro Abdominal; HTA – Hipertensão arterial; PCR – proteína C-reactiva; VS – Velocidade de Sedimentação; Min. – mínimo; Máx. – máximo.

^a De acordo com Teste de *Mann-Whitney*.

^b De acordo com Teste de *Fisher*.

* Correlação estatisticamente significativa.

Não existe uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de adiponectina e o estado de pré ou pós-menopausa, em nenhum dos grupos de diagnósticos avaliados (1, 2 e 3), tal como é possível observar nas tabelas 17, 18 e 19. Embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas, os valores de adiponectina apresentam-se mais elevados nas doentes com AR e LES no estadió de pós-menopausa.

No que respeita aos valores séricos de leptina, observa-se uma associação estatisticamente significativa com os estados de pré/pós-menopausa nos grupos 1 e 3, com os respetivos valores p de 0,010 e 0,012.

2. Correlações

2.1 Correlação entre os níveis séricos de adiponectina e características demográficas e clínicas da população em estudo

Tabela 20: Correlação dos níveis séricos de adiponectina com a idade, IMC e PA

VARIÁVEL	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	PA (cm)
	N 340	N 337	N 318
Adiponectina (ng/mL)	: -0,051 <i>p-value</i> : 0,346	: -0,111 <i>p-value</i> : 0,041**	: -0,043 <i>p-value</i> : 0,442

IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro abdominal; - Coeficiente de correlação de Spearman (Adiponectina: Teste de Kolmogorov-Smirnov- Distribuição Não Normal)

* Correlação estatisticamente significativa

Nota: esta análise inclui apenas os grupos 1, 2 e 3, para os quais o método de doseamento da adiponectina aplicado foi o mesmo.

Não existe uma correlação entre os níveis séricos de adiponectina e a idade ou o PA. Contudo, na população de indivíduos que compõem este estudo, existe uma correlação inversa, fraca, entre o IMC e a adiponectina (valor p de 0,041).

Tabela 21: Correlação dos níveis séricos de adiponectina com os valores de idade, IMC e PA nos vários grupos de diagnóstico

	VARIÁVEL	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	PA (cm)
Indivíduos Saudáveis	N	116	114	114
	Adiponectina (ng/mL)	: -0,024 <i>p-value: 0,799</i>	: -0,119 <i>p-value: 0,207</i>	: -0,071 <i>p-value: 0,453</i>
AR	N	103	103	98
	Adiponectina (ng/mL)	: 0,059 <i>p-value: 0,556</i>	: - 0,031 <i>p-value: 0,761</i>	: - 0,001 <i>p-value: 0,989</i>
LES	N	121	120	106
	Adiponectina (ng/mL)	: -0,045 <i>p-value: 0,621</i>	: -0,180 <i>p-value: 0,049*</i>	: - 0,106 <i>p-value: 0,278</i>
Aterosclerose evoluída	N	138	138	79
	Adiponectina (ng/mL)	: 0,221 <i>p-value: 0,009*</i>	: -0,36 <i>p-value: 0,673</i>	: 0,076 <i>p-value: 0,505</i>

IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro abdominal; - Coeficiente de correlação de Spearman (Adiponectina: Teste de Kolmogorov-Smirnov- Distribuição Não Normal)

* Correlação estatisticamente significativa

De acordo com a tabela acima representada, é possível observar a presença de uma relação inversa estatisticamente significativa entre os níveis séricos de adiponectina e o IMC apenas nos doentes com LES. A idade e PA não se correlacionaram com os níveis séricos de adiponectina nos grupos 1, 2 e 3. No grupo 4 verifica-se uma correlação positiva, fraca, entre a adiponectina e a idade dos doentes.

2.2 Correlação dos níveis séricos de leptina com características demográficas e clínicas

Tabela 22: Correlação dos níveis séricos de leptina com os valores de idade, IMC e PA

VARIÁVEL	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	PA (cm)
Leptina (ng/mL)	N 340	N 337	N 318
	: 0,156	: 0,459	: 0,423
	<i>p-value</i> : 0,004 ^{**}	<i>p-value</i> : < 0,001 ^{**}	<i>p-value</i> : < 0,001 ^{**}

IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro abdominal; - Coeficiente de correlação de Spearman (Adiponectina: Teste de Kolmogorov-Smirnov- Distribuição Não Normal)

* Correlação estatisticamente significativa

Existe uma correlação positiva entre os níveis de leptina e as variáveis idade, IMC e PA nos indivíduos analisados, todos do sexo feminino (grupos 1,2 e 3).

Tabela 23: Correlação dos níveis séricos de leptina com os valores de idade, IMC e PA nos vários grupos de diagnóstico

	VARIÁVEL	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	PA (cm)
Indivíduos saudáveis	N	116	114	114
	Leptina (ng/mL)	: 0,264 <i>p-value</i> : 0,004 [*]	: 0,452 <i>p-value</i> : <0,001 [*]	: 0,455 <i>p-value</i> : <0,001 [*]
AR	N	103	103	98
	Leptina (ng/mL)	: -0,110 <i>p-value</i> : 0,268	: 0,420 <i>p-value</i> : <0,001 [*]	: 0,304 <i>p-value</i> : 0,002 [*]
LES	N	121	120	106
	Leptina (ng/mL)	: 0,257 <i>p-value</i> : 0,004 [*]	: 0,504 <i>p-value</i> : <0,001 [*]	: 0,508 <i>p-value</i> : <0,001 [*]

IMC – Índice de massa corporal; PA – Perímetro abdominal; - Coeficiente de correlação de Spearman. (Leptina: Teste de Kolmogorov-Smirnov- Distribuição Não Normal).

* Correlação estatisticamente significativa.

De acordo com a tabela acima representada é possível observar a presença correlações positivas entre os níveis de leptina e IMC e PA em todos os grupos de diagnóstico. Quanto à idade, apenas se verificaram correlações positivas nos grupos 1 e 3.

2.3 Correlação dos níveis séricos de adiponectina e leptina com a duração e atividade da doença reumática

Tabela 24: Correlação dos níveis séricos de adiponectina e leptina com a duração e a atividade (DAS 28 e HAQ) da doença nos doentes com AR (grupo 2)

VARIÁVEL	Duração da doença (anos)	AR DAS 28	HAQ
N	103		
Adiponectina (ng/mL)	: - 0,052 <i>p-value</i> : 0,603	: -0,189 <i>p-value</i> : 0,056	: 0,016 <i>p-value</i> : 0,872
Leptina (ng/mL)	: - 0,058 <i>p-value</i> : 0,559	: -0,170 <i>p-value</i> : 0,086	: -0,049 <i>p-value</i> : 0,621

- Coeficiente de correlação de Spearman. *
Correlação estatisticamente significativa.

Este estudo não demonstrou a presença de uma relação significativa entre a duração ou atividade da AR com os níveis séricos de adiponectina ou leptina, embora seja evidente uma tendência para uma relação inversa das adipocinas com a escala DAS 28.

Tabela 25: Correlação dos níveis séricos de adiponectina e leptina com a duração e a atividade (SLEDAI-2k e SLICC) da doença nos doentes com LES (grupo 3)

VARIÁVEL	Duração da doença (anos)	LES SLEDAI-2k	SLICC
N	121	121	121
Adiponectina (ng/mL)	: - 0,036 <i>p-value</i> : 0,695	: 0,166 <i>p-value</i> : 0,070	: 0,156 <i>p-value</i> : 0,089
Leptina (ng/mL)	: 0,030 <i>p-value</i> : 0,743	: -0,180 <i>p-value</i> : 0,048*	: 0,127 <i>p-value</i> : 0,167

- Coeficiente de correlação de Spearman. *
Correlação estatisticamente significativa.

De acordo com a tabela 25, verifica-se que não existe uma relação entre os níveis séricos de adiponectina e a duração ou atividade da doença no LES. Já para a

leptina, apesar de não se ter verificado uma relação com a duração da doença, a sua distribuição parece relacionar-se de forma inversa à atividade da doença, medida pela escala SLEDAI-2k. No entanto, esta correlação apresenta pouco significado clínico, uma vez que o coeficiente de correlação é muito baixo.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo compreender o comportamento das adipocinas nas doenças inflamatórias crônicas e de que forma se poderão relacionar com a atividade da doença. Para tal, observou-se a distribuição da adiponectina e da leptina em três doenças inflamatórias crônicas, designadamente a AR, o LES e a aterosclerose, tendo sido estudada a sua relação com a idade, raça, género, IMC, PA e outras características clínicas.

Adiponectina

Verificámos que os níveis séricos de adiponectina são diferentes entre géneros e entre diagnósticos (tabelas 9 e 11), o que pode implicar a existência de uma relação entre a molécula e o processo inflamatório subjacente. Quer na AR como no LES, os níveis de adiponectina são mais elevados do que em indivíduos saudáveis, o que se encontra em concordância com resultados obtidos em estudos anteriores, onde a adiponectina é apontada como uma hormona com propriedades pró-inflamatórias nestas doenças. [4,12,13,15,16,43,45] Relativamente aos doentes com aterosclerose evoluída, verificou-se que estes apresentam níveis de adiponectina superiores quer ao grupo de controlo, quer aos grupos de doentes com patologia reumática, porém, diferenças no processamento das amostras, e como tal, diferentes técnicas de diluição (entre outras) não permitem a comparação directa com os outros grupos, impossibilitando uma conclusão acerca da promoção da inflamação pela adiponectina nesta doença.

Não encontramos uma relação estatisticamente significativa entre a adiponectina e a idade ou PA. Contudo, observou-se uma relação inversa com o IMC, embora esta seja uma associação fraca. No que respeita à análise individual por diagnóstico, não se verificou uma associação com idade, IMC ou PA nos grupos 1, 2 e 4. Nos doentes com LES, objetivou-se uma correlação inversa entre adiponectina e IMC, no entanto, é necessário ter em conta que o coeficiente de correlação é baixo ($r = -0,180$), pelo que esta análise apresenta mais uma vez um significado pouco valorizável.

Este estudo não demonstrou uma relação entre a adiponectina e as raças negra/caucasiana (tabela 10), contrariamente ao observado em estudos anteriores que demonstraram a existência de níveis superiores de adiponectina na raça caucasiana, e portanto, um perfil metabólico mais favorável nesta raça. [9,29,44] Contudo, é de referir que existe uma enorme discrepância relativamente ao número de indivíduos incluídos

em cada uma das categorias de raça, o que pode justificar os resultados obtidos (N 29 na raça negra vs. N 310 na raça caucasiana).

Nos doentes com aterosclerose evoluída foi realizada a comparação dos níveis de adiponectina nos géneros feminino e masculino, apresentando as mulheres níveis mais elevados da molécula, como demonstrado em outros estudos. [62,63,64] De destacar, no entanto, que estes valores não se encontram ajustados para alguns factores individuais que poderão justificar estas diferenças (ex. indivíduos do sexo masculino uma média de PA superior).

Uma das características que se sabe estar amplamente relacionada com os níveis de adiponectina é a SM, uma vez que esta síndrome se associa à presença de obesidade central, que por sua vez estimula a produção de mediadores inflamatórios locais e inibição da síntese de adiponectina. Além disso, a prevalência aumentada de SM em doentes com AR e LES, parece justificar o elevado risco cardiovascular presente nestes doentes. No presente estudo, todavia, não foi possível apurar a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a distribuição de adiponectina e a presença ou não de SM (tabela 12). O mesmo se observou na análise realizada para cada grupo de diagnóstico (tabelas 13, 14 e 15). Apesar disso, de acordo com o gráfico 2, é possível observar que indivíduos com AR e SM parecem apresentar níveis inferiores de adiponectina, por comparação aos doentes com AR sem SM. Neste gráfico é ainda possível observar a presença de múltiplos outliers, o que poderá condicionar os resultados obtidos. Além disso, tal como acontece na categoria raça, também aqui a distribuição de indivíduos não é absolutamente equitativa.

Uma vez que a população estudada incluiu preferencialmente mulheres, com idades muito variáveis entre si, procedeu-se também à observação da distribuição dos níveis de adiponectina de acordo com os estados de pré/pós-menopausa, uma vez que se sabe que existe uma modificação do perfil metabólico após esta transição. De facto, as diferenças nos níveis de adiponectina encontradas entre homens e mulheres justificam-se pela modulação da síntese de adiponectina por hormonas esteróides, como o caso dos estrogénios. Na pós-menopausa, a diminuição abrupta dos níveis destas hormonas associa-se a um aumento da massa de tecido adiposo e insulino-resistência nas mulheres e concomitantemente a um aumento nos níveis de adiponectina. [33,35,36,39] Contudo, no presente estudo, não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre os níveis de adiponectina e os estados de pré/pós-menopausa. Estes resultados podem dever-se a vários factores, nomeadamente: 1) a inexistência de informação acerca da

utilização de terapêutica hormonal de substituição por mulheres na pós-menopausa, que se associa a uma redução dos níveis circulantes de adiponectina ^[34,40]; 2) o facto de o estado de pós-menopausa ser baseado em informação concedidas pelas doentes e não dados objetivados, pode levar a que algumas mulheres estejam de forma errada inseridas num ou outro grupo; 3) a falta de informação acerca da possibilidade de as mulheres se encontrarem no período de peri-menopausa, onde se sabe que os níveis de adiponectina são inferiores quer ao estado de pré-menopausa, quer ao estado de pós-menopausa. ^[41]; 4) por fim, a medição da adiponectina total, ao invés de medições dos níveis séricos das isoformas de adiponectina, visto saber-se que existe uma preponderância diferente das mesmas na pós-menopausa. ^[32,39]

Por último, pretendeu-se ainda perceber qual a relação entre adiponectina e a progressão das doenças em causa, pelo que foi efetuada uma correlação entre os níveis séricos de adiponectina e a duração/atividade da AR e LES. De acordo com os resultados acima expostos, é de referir que não foi encontrada uma associação entre os níveis de adiponectina e as características atrás referidas (duração da doença ou atividade) nos doentes com AR ou LES, muito embora, para a escala de avaliação DAS 28 (grupo da AR) o valor p seja de 0,056, isto é, próximo de ter um significado estatístico valorizável.

Particularmente na AR, vários estudos anteriores apontaram que a adiponectina pode atuar como um fator pró-inflamatório, através da indução da libertação de mediadores inflamatórios, como a IL-6 e a metaloproteínase 1 (MMP1) nos fibroblastos sinoviais ou da IL-6, metaloproteínases 3 e 9 (MMP 3 e MMP 9), óxido nítrico e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP 1) nos condrócitos, que em conjunto contribuem para o agravamento da lesão articular. ^[4,12,13,15,16,43,46] Alguns autores chegam mesmo a relacionar a molécula com a progressão radiográfica da doença. ^[4,12,13,15,16,43,46] Apesar disso, estudos com modelos animais de AR sugeriram que a administração exógena de adiponectina leva a uma diminuição da gravidade da doença, pelo que é interrogada a possibilidade de a molécula ter algum contributo positivo na progressão da AR. ^[12,16,43,46] Outros estudos demonstraram que apesar de existir um aumento da concentração de adiponectina no líquido sinovial de doentes com AR, esta não foi associada a diferenças significativas na concentração sérica de adiponectina entre doentes com AR e indivíduos saudáveis, sugerindo que a possível ação pró-inflamatória se relaciona com fatores locais de inflamação, característicos da doença. ^[12,43] Ainda de referir que alguns estudos não demonstraram correlação entre a atividade

da doença (ou mesmo uma correlação negativa) e os níveis séricos de adiponectina. [43] Tal possibilidade pode explicar os resultados aqui obtidos, dado que apenas foram medidos os níveis séricos de adiponectina dos vários doentes, não tendo sido analisada a concentração da molécula no líquido sinovial. Além disso, sabe-se que a produção de adiponectina é modulada por determinadas citocinas inflamatórias, como é o caso do TNF, que se encontra aumentado na AR, podendo justificar o aparente papel paradoxal da molécula nesta doença, visto que o tratamento da AR com fármacos anti-TNF se associa a um aumento da adiponectina sérica. [12,14,45,46] De ressaltar que a análise aqui efetuada apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto de os autores não terem acesso à terapêutica dos doentes, que pode condicionar a produção e libertação de adiponectina. Por último, referir que as várias isoformas da adiponectina atuam de maneira diferente, sendo que a possível ação pró-inflamatória da adiponectina associada à AR se pode dever, em parte, a um desequilíbrio na síntese destas isoformas, pelo que se considera útil que em estudos futuros esta distinção seja efetuada, ao invés da medição dos níveis de adiponectina total. [12,13] Em suma, embora o aumento dos níveis de adiponectina na AR pareça à partida indicar o papel pró-inflamatório da molécula da doença, começamos a perceber que outros fatores poderão contribuir para esse aumento e que o mesmo não se associa necessariamente a uma promoção da inflamação pela adiponectina.

A análise de correlação com a duração/atividade foi também efetuada para o grupo de doentes com LES, não se verificando, tal como aconteceu para a AR, uma associação entre estas duas características e os níveis séricos de adiponectina. De forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, outros autores relatam a existência de níveis aumentados de adiponectina em doentes com LES, sugerindo também o papel promotor da inflamação da molécula nesta doença. [12,14,28,30] Apesar disso, na maioria dos casos, os níveis aumentados da adipocina não se associam à atividade da doença, estando sim relacionados com a presença ou não de afeção renal. [12,14,28] Tal como referido anteriormente a propósito da AR, é possível que um desequilíbrio na produção de diferentes isoformas de adiponectina explique o aumento da molécula nos doentes com LES por comparação a doentes saudáveis, uma vez que foi recentemente descoberto que doentes com nefrite lúpica apresentam excreção urinária da isoforma de alto peso molecular, o que não acontece em indivíduos saudáveis. [12,48]

Leptina

A par da adiponectina, também a leptina mostrou uma variação estatisticamente significativa na sua distribuição de acordo com o diagnóstico (tabela 9), apresentando os doentes com doença inflamatória reumática níveis de leptina superiores ao grupo de indivíduos saudáveis (indivíduos saudáveis < LES < AR), o que mais uma vez sugere um papel na patogénese das doenças.

No que respeita a características individuais, observou-se que os níveis séricos de leptina se correlacionam de forma positiva com a idade, IMC e PA, o que é concordante com o facto de a leptina estar aumentada em doentes obesos e de nesta amostra existir uma grande prevalência de excesso de peso e obesidade (para todos os grupos de diagnóstico aqui incluídos a percentagem de mulheres com excesso de peso ou obesidade é superior a 55%).

Verificou-se ainda que a leptina apresenta uma distribuição significativamente diferente nas raças negra e caucasiana, apresentando as doentes de raça negra valores mais elevados de leptina (tabela 10). Estes resultados encontram-se em concordância com múltiplos estudos anteriores, que procuraram explorar esta diferença. [29,44,52]

Embora se tenha especulado que a mesma se deveria a uma distinta distribuição do tecido adiposo (indivíduos de raça negra apresentam maior percentagem de gordura subcutânea, que por sua vez é responsável por produzir maior quantidade de leptina do que a gordura visceral), esta hipótese não foi comprovada, dado que a diferença se mantém após ajuste dos resultados para a distribuição de tecido adiposo. [29,52] Na presente análise a inexistência de significado estatístico poderá dever-se ao número muito reduzido de mulheres que compõem o subgrupo de raça negra (N 29 na raça negra vs. N 310 na raça caucasiana).

Como descrito anteriormente, a leptina é produzida maioritariamente pelo tecido adiposo branco, e embora o aumento da sua síntese ocorra em resposta à ingestão de alimentos, causando inibição do apetite/indução da saciedade, sabe-se que esta molécula apresenta valores séricos aumentados em doentes obesos, que se devem a uma situação de resistência à ação da leptina. [11,26,53,54,56] Além disso, a hiperleptinemia correlaciona-se com a presença de fatores característicos da SM, tendo a hormona sido descrita como um marcador de SM. [11,53] Apesar disso, este estudo não demonstrou uma relação entre os níveis séricos de leptina e a presença ou não de SM (tabela 12). Contudo, é necessário ressaltar que existe uma grande diferença no número de indivíduos que

compõem cada um dos subgrupos, o que pode condicionar este resultado (N 245 para grupo sem SM; N 68 para o grupo com SM). Por outro lado, ao analisarmos esta relação de forma particular para cada grupo de diagnóstico, verificamos que no grupo 1, as mulheres com SM apresentam níveis mais elevados de leptina. Já nos grupos de doentes com AR e LES, muito embora estudos anteriores tenham demonstrado a existência de níveis séricos de leptina mais elevados em doentes com artrite e SM, e neste estudo os níveis de leptina pareçam ser concordantes com esses dados, esta diferença não foi estatisticamente significativa. [11]

No que se refere à análise de acordo com os estados de pré e pós-menopausa, o presente estudo demonstrou que doentes na pós-menopausa apresentam valores superiores de leptina e que esta diferença se mantém para os grupos de indivíduos saudáveis e doentes com LES, quando a análise foi realizada por grupo de diagnóstico. Para o grupo de doentes com AR, embora pareça existir a mesma tendência, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar destes resultados, estudos anteriores têm sido contraditórios quanto à influência da menopausa na produção e libertação de leptina. [36,57] Um estudo de 2008 que avaliou mulheres nos vários estádios de menopausa, obesas e não obesas, concluiu a existência de um aumento dos níveis de leptina da pré para a pós menopausa apenas em mulheres não obesas (sendo que mulheres obesas mantiveram sempre níveis elevados sem modificações consideráveis).

[41] Uma explicação possível para estas alterações e os resultados aqui obtidos é a influência da leptina na génese de hormonas sexuais femininas, nomeadamente um estímulo para a secreção de hormona luteinizante (LH) e hormona folículo-estimulante (FSH), através da modulação da secreção da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). Assim, na pós-menopausa, a leptina poderá estar aumentada em resposta à diminuição da produção de estrogénios e progesterona. [36,41] Apesar desta aparente justificação, vários outros estudos apresentam evidência da diminuição dos níveis de leptina da pré para a pós menopausa ou mesmo a ausências de modificações nos níveis de leptina estes dois estádios da vida da mulher. [36,57] Tal como referido anteriormente a propósito da adiponectina, também aqui poderão existir fatores de viés.

A suspeita da influência da leptina no desenvolvimento e/ou promoção de doenças inflamatórias reumáticas surgiu na sequência do conhecimento das funções da hormona no sistema imunitário, nomeadamente a estimulação da produção de células T (sobretudo resposta Th1) e mediadores inflamatórios. [12,16] Esta hipótese foi apoiada pelo facto da síntese de leptina ser modulada por hormonas esteróides, como referido

atrás, o que justificaria a maior prevalência dos fenómenos de autoimunidade em mulheres. Assim, múltiplos estudos anteriores tentaram avaliar esta relação, porém resultados pouco concordantes têm vindo a ser conhecidos. Concretamente na AR, a maioria dos estudos clínicos sugere a presença de níveis aumentados de leptina no soro dos doentes por comparação com amostras de indivíduos saudáveis, que em muitas ocasiões mostraram ter uma correlação positiva com a atividade e gravidade da doença. [12,14,15,16,28,46,58] Além disso, quando foi avaliada a concentração de leptina no líquido sinovial de doentes com AR, conclui-se que esta era inferior à sua concentração sérica, sugerindo assim um consumo a nível local de leptina, ou seja, um efeito protetor de lesão articular. [12,14,15,16,28,46,59] Por outro lado, os níveis de leptina no líquido sinovial apresentaram-se ainda mais diminuídos em doentes com artrite não erosiva, por comparação aos doentes com artrite erosiva, o que mais uma vez apoia esta hipótese. [59]

Todavia, o contrário foi também já apontado, ou seja, alguns estudos não demonstram a existência de diferenças significativas nos níveis séricos de leptina entre doentes com AR e grupos de controlo, ou demonstraram mesmo níveis mais reduzidos no grupo de doentes e ausência de correlação com atividade da doença. [12,14,15,16,28,46,58] No presente estudo, apesar de elevados, os níveis séricos de leptina não apresentaram uma relação com a duração ou atividade da doença, não sendo possível concluir acerca do seu papel na doença.

Tal como verificado aqui, a elevação dos níveis séricos de leptina no LES está também bem documentada em trabalhos anteriores, embora não pareça existir na maioria dos casos uma correlação com a duração ou atividade da doença. [12,14,28,30,31,58]

Na tabela 29 podemos observar que no presente estudo o score de atividade SLEDAI-2k apresenta uma relação inversa com os níveis de leptina. Apesar disso, o dado que o coeficiente de correlação verificado foi de -0,180, não é possível retirar uma conclusão válida quanto à distribuição da leptina de acordo com o score referido. Não se verificou, como em estudos anteriores, a presença de uma associação entre a leptina e a duração da doença. [14] A explicação da participação da leptina na patogénese do LES advém da sua função moduladora do sistema imunitário. Esta atividade foi já demonstrada em modelos animais de LES, estando a leptina associada ainda a uma promoção da sobrevivência de células T e libertação de citocinas inflamatórias. [58,60] Além disso, estudos que revelaram o aumento de leptina em doentes com LES demonstraram, em muitos casos, que este incremento foi independente de características como o IMC ou a

idade, o que revela a existência de uma ação da leptina na doença, para além da sua relação com a obesidade e SM. [12,28,30]

Em suma, este estudo conclui que existem diferenças na distribuição das ambas as adipocinas estudadas em doenças inflamatórias crónicas, o que suporta a hipótese de que estas poderão contribuir para o desenvolvimento/agravamento destas patologias, em doentes com elevada prevalência de excesso de peso/obesidade. Apesar disso, não se parecem relacionar com a duração e ou atividade da doença, ficando por responder se o aumento verificado nos níveis séricos se devem à intervenção das adipocinas no processo inflamatório ou se pelo contrário, será o processo inflamatório a induzir estas alterações.

Este estudo apresenta inúmeras limitações, que podem ter contribuído para os resultados obtidos, nomeadamente: 1) estudo retrospectivo, sem possibilidade de acesso a determinados fatores com relevância para a análise efetuada; 2) heterogeneidade da população em estudo; 3) subdivisão da população por grupos e subgrupos que limitaram o número de indivíduos em cada um destes, tornando a amostra mais pequena; 4) medição dos níveis séricos de adiponectina total em vez das isoformas de adiponectina; 5) aplicação de dois protocolos diferentes no processamento das amostras de adiponectina; 6) a medição única (em vez de múltiplas) dos níveis séricos de adiponectina e leptina; 7) e, por fim, o facto de as associações realizadas não serem ajustadas para potenciais factores confundidores dos níveis séricos de adiponectina e leptina (ex. idade, IMC, PA, VS, PCR, etc).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às orientadoras deste projeto, Professora Maria José Santos e Diana Carmona-Fernandes, pela sua enorme disponibilidade, amabilidade e apoio, durante a realização de todo o trabalho, que só assim tornaram possível a sua concretização. Agradeço ainda ao Fonseca, JE Lab – Unidade de Investigação em Reumatologia (Instituto de Medicina Molecular) nas pessoas do Professor Doutor João Eurico da Fonseca e Professora Doutora Helena Canhão, pela aceitação do projecto e integração na equipa.

Um agradecimento muito especial ao Rafael Moiteiro da Cruz pela orientação estatística, paciência, amizade e generosidade durante a realização do trabalho.

Gostaria ainda de agradecer ao Filipe Cortes Figueiredo, por me encorajar a iniciar este trabalho, pela motivação e amizade.

Agradeço também ao serviço de Reumatologia do Hospital Garcia de Orta e serviço de Cirurgia Vascular do Centro Hospitalar Lisboa Norte (Hospital de Santa Maria) pela inclusão na equipa e aprovação da recolha de informações clínicas e amostras, essenciais ao desenvolvimento do trabalho. Ainda, um agradecimento especial a todas as pessoas que contribuíram para a recolha de informações clínicas nestes serviços, nomeadamente a Professora Doutora Maria José Santos, Dr.^a Alice Castro, Dr.^a Sofia Barreira, Dr. Pedro Oliveira Santos, Dr.^a Carolina Amaro Gonçalves, Dr. Filipe Cortes Figueiredo, Dr. António Nicolau Fernandes e Rafael da Cruz.

Por último, mas não menos importante, um enorme agradecimento à minha família e amigos pelo seu apoio incondicional em todas as etapas do meu percurso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T(2014). Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 28 15-23.
- [2] Esfahani M, Movahedian A, Baranchi M, Goodarzi MT (2015). Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iran J Basic Med Sci*. 18: 430-442.
- [3] Turer AT, Scherer PE (2012). Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 55:2319-2326.
- [4] Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O (2007). Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. Vol 3, No12.
- [5] Liu M, Liu F. Regulation of adiponectin multimerization signaling and function (2014). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 28 25-31.
- [6] He Y, Lu L, Wei X, Jin D, Qian T, Yu A, Sun J, Cui J, Yang Z (2016). The multimerization and secretion of adiponectin are regulated by TNF-alpha. *Endocrine*. 51(3):456-68.
- [7] Blüher M, Mantzoros CS (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism Clinical and Experimental*. 64 131-145.
- [8] Santos MJ, Fonseca JE (2009). Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis - the role of adipokines in health and in systemic inflammatory rheumatic diseases. *Acta Reumatol Port*. 34(4):590-8.
- [9] Hulver MW, Saleh O, MacDonald KG, Pories WJ, Barakat HA (2004). Ethnic Differences in Adiponectin Levels. *Metabolism*. Vol 53, No 1, 1-3.
- [10] Arai Y, Takayama M, Abe Y, Hirose N (2011). Adipokines and Aging. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. Vol 18: 545-550.
- [11] Abella V, Scotece M, Conde J, López V, Lazzaro V, Pino J, Gómez-Reino J, Gualillo O (2014). Adipokines, Metabolic Syndrome and Rheumatic Diseases. *Journal of Immunology Research*.
- [12] Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B (2012). The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr*. 51:513-528.

- [13] Chen X, Lu J, Bao J, Guo J, Shi J, Wang Y (2013). Adiponectin: A biomarker for rheumatoid arthritis?. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 24, 83-89.
- [14] Barbosa V, Rêgo J, da Silva N (2012). Possible role of adipokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 52 (2); 271-287.
- [15] Scotece M, Conde J, López V, Lago F, Pino J, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2014). Adiponectin and leptin: New targets in inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 114, 97-102.
- [16] Stofkova A (2009). Leptin and Adiponectin: From energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocrine Regulations*. Vol. 43, 157-168.
- [17] Seven E, Husemoen L, Sehested T, Ibsen H, Wachtell K, Linneberg A, Jeppesen J (2015). Adipocytokines, C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease: A population-based prospective study. *PLoS ONE*. 10 (6): e0128987.
- [18] Sook Lee E, Park SS, Kim E, Sook Yoon Y, Ahn HY, Park CY, et al (2013). Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 42: 1029–1039.
- [19] Kanhai DA, Kranendonk ME, Uiterwaal CS, van der Graaf Y, Kappelle LJ, Visseren FL (2013). Adiponectin and incident coronary heart disease and stroke. A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev*. 14: 555–567.
- [20] Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y (2012). Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie*. 94, 2137-2142.
- [21] Chudek J, Wiecek A (2006). Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacological Reports*. 58, suppl., 81-88.
- [22] Yamauchi T, Kadowaki T (2013). Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metabolism*. 17.
- [23] Fantuzzi G (2007). Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol*. Vol. 121, N°2.
- [24] Nakamura K, Fuster J, Walsh K (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol*. 63 (4): 250-259.
- [25] Van der Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K (2013). Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism Clinical and Experimental* 62. 1513-1521.

- [26] Maury E, Brichard SM (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 314, 1-16.
- [27] Zhang H, Cui J, Zhang C (2010). Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. *World Journal of Cardiology*. 2 (11): 370-376.
- [28] Scotece M, Conde J, Gómez R, López V, Pino J, González A, Lago F, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2012). Role of Adipokines in Atherosclerosis: Interferences with cardiovascular complications in rheumatic diseases. *Mediators of Inflammation*. 125458.
- [29] Khan U, Wang D, Sowers M, Mancuso P, Everson-Rose S, Scherer P, Wildman R (2012). Race–ethnic differences in adipokine levels: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Metabolism Clinical and Experimental* 61. 1261-1269.
- [30] Chung C, Long A, Solus J, Rho YH, Oeser A, Raggi P, Stein M (2009). Adipocytokines in Systemic Lupus Erythematosus: Relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis. *Lupus*. 18(9): 799-806.
- [31] Vadacca M, Margiotta D, Rigon A, Cacciapaglia F, Coppolino G, Amoroso A, Afeltra A (2009). Adipokines and Systemic Lupus Erythematosus: Relationship with Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease risk factors. *The Journal of Rheumatology*. Vol 36, 295-297.
- [32] Matsui S, Yasui T, Tani A, Kato T, Kunimi K, Uemura H, Kuwahara A, Matsuzaki T, Irahara M (2013). Difference in the ratio of high-molecular weight (HMW) to total adiponectin and HMW adiponectin in late post-menopausal women. *J. Endocrinol. Invest.* 36: 982-985.
- [33] Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, et al (2003). Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 4823-31.
- [34] Kunnari A, Santaniemi M, Jokela M, Karjalainen A, Heikkinen J, Ukkola O, Kesäniemi Y (2008). Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. *Metabolism Clinical and Experimental* 57. 1509–1515.
- [35] Tamakoshi K, Yatsuya H, Wada K, Matsushita K, Otsuka R, Yang PO, Sugiura K, Hotta Y, Mitsuhashi H, Takefuji S, Kondo T, Toyoshima H (2007). The transition to

menopause reinforces adiponectin production and its contribution to improvement of insulin-resistant state. *Clin Endocrinol.* 66: 65-71.

[36] Ali SB, Jemaa R, Ftouhi B, Kallel A, Feki M, Slimene H, Kaabachi N (2011). Relationship of plasma leptin and adiponectin concentrations with menopausal status in Tunisian women. *Cytokine* 56. 338–342.

[37] Miazgowski T, Major- Gołuch A, Safranow K (2012). Selected adipokines and metabolic profiles in normal-weight women with abdominal obesity. *Pol Arch Med Wewn.* 122 (9): 406- 412.

[38] Gavrilu A, Chan J, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller L, Orlova C, Mantzoros C (2003). Serum Adiponectin Levels Are Inversely Associated with Overall and Central Fat Distribution but Are Not Directly Regulated by Acute Fasting or Leptin Administration in Humans: Cross-Sectional and Interventional Studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(10):4823–4831.

[39] Leung KC, Xu A, Craig ME, Martin A, Lam K, O'Sullivan A (2009). Adiponectin isoform distribution in women - relationship to female sex steroids and insulin sensitivity. *Metabolism.* 58: 239-45.

[40] Im JA, Lee JW, Lee HR, Lee DC (2006). Plasma adiponectin levels in postmenopausal women with or without long-term hormone therapy. *Maturitas* 54. 65–71.

[41] Sowers MF, Wildman R, Mancuso P, Eyvazzadeh A, Karvonen-Gutierrez C, Rillamas-Sun E, Jannausch M (2008). Change in adipocytokines and ghrelin with menopause. *Maturitas* 59. 149–157.

[42] Chedraui P, Pérez-López F, Escobar G, Palla G, Montt-Guevara M, Cecchi E, Genazzani A, Simoncini T (2014). Circulating leptin, resistin, adiponectin, visfatin, adipisin and ghrelin levels and insulin resistance in postmenopausal women with and without the metabolic syndrome. *Maturitas* 79. 86–90.

[43] Liu D, Luo S, Li Z (2015). Multifaceted roles of adiponectin in rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology.* 28, 1084-1090.

[44] Azrad M, Gower B, Hunter G, Nagy T (2013). Racial differences in adiponectin and leptin in healthy premenopausal women. *Endocrine.* 43(3): 586–592.

[45] Yoshino T, Kusunoki N, Tanaka N, Kaneko K, Kusunoki Y, Endo H, Hasunuma T, Kawai S (2011). Elevated Serum Levels of Resistin, Leptin, and Adiponectin are associated with C-reactive protein and also other clinical conditions in Rheumatoid Arthritis. *Internal Medicine* 50:269-275.

- [46] Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, Dieguez C, Gualillo O (2009). Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *Journal of Molecular Endocrinology*. 43, 11-18.
- [47] Alberti K, Eckel R, Grundy S et al (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*. Vol. 120, no. 16, pp. 1640–1645.
- [48] Loghman M, Haghighi A, Broumand B, Ataipour Y, Tohidi M, Marzbani C, Fakharran M (2014). Association between urinary adiponectin level and renal involvement in systemic lupus erythematosus. *International Journal of Rheumatic Diseases*.
- [49] Yee CS, Farewell V, Isenberg D, Griffith B, The LS, Bruce I, Ahmad Y, Rahman A, Prabu A, Akil M, McHugh N, Edwards C, d’Cruz D, Khamashta M, Gordon C (2011). The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology*. 50 (5): 982-988.
- [50] Romero-Diaz J, Isenberg D, Ramseygoldman R (2011). Measures of Adult Systemic Lupus Erythematosus: Updated Version of British Isles Lupus Assessment Group (BILAG 2004), European Consensus Lupus Activity Measurements (ECLAM), Systemic Lupus Activity Measure, Revised SLAM-R), Systemic Lupus Activity Questionnaire for Population Studies (SLAQ), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI). *Arthritis Care Res*. 63(0 11).
- [51] Anderson J, Caplan L, Yazdany J, Robbins M, Neogi T, Michaud K, Saag K, O’Dell J, Kazi S (2012). Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures: American College of Rheumatology Recommendations for Use in Clinical Practice. *Arthritis Care & Research*. Vol. 64, No. 5, 640–647.
- [52] Cohen S, Fowke J, Cai Q, Buchowski M, Signorello L, Hargreaves M, Zheng W, Blot W, Matthews C (2012). Differences in the Association between Serum Leptin Levels and Body Mass Index in Black and White Women: A Report from the Southern Community Cohort Study. *Ann Nutr Metab*. 60:90–97.

- [53] Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro J, Sodhi K (2016). Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int. J. Med. Sci.* 13(1): 25-38.
- [54] Kaur J (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice.*
- [55] Carbone F, La Rocca C, Matarese G (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie.* 94, 2082-2088.
- [56] Park HK, Ahima R (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism Clinical and Experimental.* 64, 24-34.
- [57] Douchi T, Iwamoto I, Yoshimitsu N, Kosha S, Nagata (2002). Leptin production in pre- and postmenopausal women. *Maturitas.* 42, 219–223.
- [58] Procaccini C, Pucino V, Mantzoros C, Matarese G (2015). Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism Clinical and Experimental.* 64, 92-104.
- [59] Toussiro E, Michel F, Binda D, Dumoulin G (2015). The role of leptin in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Life Sciences.* 140, 29–36.
- [60] Amarilyo G, Iikuni N, Shi FD, Liu A, Matarese G, La Cava A (2013). Leptin promotes lupus T-cell autoimmunity. *Clinical Immunology.* 149, 530-533.
- [61] Xu WD, Zhang M, Zhang YJ, Liu SS, Pan HF, Ye DQ (2014). Association between leptin and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 34: 559-563.
- [62] Persson J *et al* (2015). Sex-Specific Effects of Adiponectin on Carotid Intima-Media Thickness and Incident Cardiovascular Disease. *Journal of the American Heart Association.* 4:e001853.
- [63] Garaulet M, Hernández-Morante J, Pérez de Heredia F, Tébar F (2007). Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutrition.* 10(10A), 1145–1150.
- [64] Nigro E, Scudiero O, Monaco M, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A, Daniele A (2014). New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *BioMed Research International.* Volume 2014, Article ID 658913, 14 pages.

ANEXOS

PRODUCT INFORMATION AND MANUAL

*FlowCytomix
Human Adiponectin Simplex Kit*

BMS82032FF

For research use only.
Not for diagnostic or therapeutic
procedures. 96 Tests

**human Adiponectin
BMS82032FF Simplex Kit**



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
A-1030 Vienna, Austria, Europe

TABLE OF CONTENTS

1	Reagents Provided	3
2	Intended Use	3
3	Summary	3
4	Storage Instructions	5
5	Representative Standard Curve	5
6	Performance Characteristics	6
7	Bibliography	8
8	Ordering Information	11

This human Adiponectin Simplex Kit must be used in combination with FlowCytomix human Basic Kit BMS8420FF. For test procedure, measurement and calculation of results please refer to FlowCytomix human Basic Kit BMS8420FF manual.

1 REAGENTS PROVIDED

- 1 vial (175 μ l) **Fluorescent Beads** (20x) coated with monoclonal antibody to human Adiponectin, Bead Population **B7**
- 2 vials human Adiponectin **Standard** (lyophilized): 1000 ng/ml upon reconstitution
- 1 vial (350 μ l) **Biotin-Conjugate** (20x) anti-human Adiponectin monoclonal antibody

2 INTENDED USE

BMS82032FF is a bead based Analyte Detection System for quantitative detection of human Adiponectin by Flow Cytometry. **BMS82032FF is for research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.**

Attention: Samples must be **prediluted 1:250** in Assay Buffer (included in the Basic Kit BMS8420FF) before starting the test procedure.

In combination with other Simplex Kits it is recommended to evaluate both, an undiluted and a 1:250 prediluted sample.

3 SUMMARY

Adiponectin (also referred to as Acrp30, apM1) is a protein hormone that modulates a number of metabolic processes, including glucose regulation and fatty acid catabolism. Adiponectin is exclusively secreted from adipose tissue into the bloodstream and is very abundant in plasma relative to many hormones. Levels of the hormone are inversely correlated with body mass index (BMI). The hormone plays a role in the suppression of the metabolic derangements that may result in type 2

diabetes, obesity, atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Adiponectin was first characterised in mice as a transcript overexpressed in preadipocytes (precursors of fat cells) differentiating into adipocytes. The human homologue was identified as the most abundant transcript in adipose tissue. Contrary to expectations, despite being produced in adipose tissue, adiponectin was found to be decreased in obesity. This downregulation has not been fully explained. The gene was localised to chromosome 3p27, a region highlighted as affecting genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity. Adiponectin is a 244-amino-acid-long polypeptide. There are four distinct regions of adiponectin. The first is a short signal sequence that targets the hormone for secretion outside the cell; next is a short region that varies between species; the third is a 65-amino acid region with similarity to collagenous proteins; the last is a globular domain. Adiponectin is secreted into the bloodstream where it accounts for approximately 0.01% of all plasma protein. Plasma concentrations reveal a sexual dimorphism, with females having higher levels than males. Levels of adiponectin are reduced in diabetics compared to non-diabetics. Weight reduction significantly increases circulating levels. Adiponectin automatically self-associates into larger structures. Adiponectin binds to a number of receptors. So far, two receptors have been identified, with homology to G protein-coupled receptors. These have distinct tissue specificities within the body and have different affinities to the various forms of adiponectin. The receptors affect the downstream target AMP kinase, an important cellular metabolic rate control point. Expression of the receptors are correlated with insulin levels, as well as reduced in mouse models of diabetes, particularly in skeletal muscle and adipose tissue.

Adiponectin exerts some of its weight reduction effects via the brain. This is similar to the action of leptin, but the two hormones perform complementary actions, and can have additive effects.

Adiponectin affects glucose flux (gluconeogenesis, glucose uptake), lipid catabolism (β -oxidation, triglyceride clearance), endothelial dysfunction, insulin sensitivity and weight loss.

Administration of Adiponectin remains a promising area of research for clinical therapy in diseases such as obesity, type 2 diabetes and fatty liver disease.

4 STORAGE INSTRUCTIONS

Store kit and components at 2 to 8°C. The expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, the reagent is not contaminated by the first handling.

5 REPRESENTATIVE STANDARD CURVE

Table 1

Representative standard curve.

Do not use this curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of samples assayed.

Concentration (ng/ml)	Fluorescent Intensity (FI)
50,0	158,2
16,7	55,7
5,6	19,6
1,9	7,7
0,6	3,5
0,2	2,0
0,1	1,5
0	1,2

6 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

6.1 Sensitivity

The limit of detection of human Adiponectin defined as the concentration resulting in a fluorescent intensity significantly higher than that of the dilution medium (mean + 2 standard deviations) was determined to be 0,06 ng/ml.

The value shown depends on the type of flow cytometer used for analysis as well as on the respective instrument setup. The value shown is for guidance only. Optimum results for each machine can be achieved by following the instrument set up process.

6.2 Reproducibility

6.2.1 Intra-assay

Reproducibility within the assay was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 4 serum samples containing different concentrations of human Adiponectin (high, medium high, medium low and low concentration). 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean intra -assay coefficient of variation for human Adiponectin (see Table 2). It has been calculated to be 2,9%.

Individual user data may vary due to differences in protein content of serum/plasma pools or individual donor serum/plasma.

Table 2

The coefficient of variation of the human Adiponectin concentration calculated for each sample.

	CV Sample 1 high (%)	CV Sample 2 medium high (%)	CV Sample 3 medium low (%)	CV Sample 4 low (%)	Mean intra- assay CV (%)
h Adiponectin	4,7	3,0	1,2	2,7	2,9

6.2.2 Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 4 serum samples containing different concentrations of human Adiponectin (high, medium high, medium low and low concentration). 2 standard curves were run on each plate. Data below (see Table 3) show the mean inter-assay coefficient of variation for human Adiponectin, calculated on 12 determinations of each sample. It has been calculated to be 3,8 %.

Individual user data may vary due to differences in protein content of serum/plasma pools or individual donor serum/plasma.

Table 3

The coefficient of variation of the human Adiponectin concentration calculated for each sample.

	CV Sample 1 high (%)	CV Sample 2 medium high (%)	CV Sample 3 medium low (%)	CV Sample 4 low (%)	Mean inter- assay CV (%)
h Adiponectin	3,1	4,3	3,7	3,9	3,8

6.3 Specificity

There was no detectable crossreactivity observed for other combinable analytes of Simplex and Multiplex Assays from Bender MedSystems. (For detailed information refer to "Combination Table" on www.bendermedsystems.com.)

6.4 Hook effect

Samples with expected concentrations two fold higher than the concentration of highest standard should be diluted 10 fold in Assay Buffer (1x) before assay performance to prevent false negative results due to "hook effects".

7 BIBLIOGRAPHY

- 1: Nishida M, Funahashi T, Shimomura I. Pathophysiological significance of adiponectin. *Med Mol Morphol*. 2007 Jun;40(2):55-67. Epub 2007 Jun 18.
- 2: Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Jun;18(3):263-70.
- 3: Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2007 May;9(3):282-9.
- 4: Brooks NL, Moore KS, Clark RD, Perfetti MT, Trent CM, Combs TP. Do low levels of circulating adiponectin represent a biomarker or just another risk factor for the metabolic syndrome? *Diabetes Obes Metab*. 2007 May;9(3):246-58.
- 5: Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*. 2007 May 1;380(1-2):24-30. Epub 2007 Feb 2.
- 6: Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*. 2007 May;56(5):1198-209. Epub 2007 Feb 15.
- 7: Han SH, Quon MJ, Kim JA, Koh KK. Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Feb 6;49(5):531-8. Epub 2007 Jan 19
- 8: Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2007 Apr 1;74(1):11-8. Epub 2006 Oct 20.
- 9: Lafontan M, Viguerie N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Dec;6(6):580-5. Epub 2006 Sep 14.
- 10: Barb D, Pazaitou-Panayiotou K, Mantzoros CS. Adiponectin: a link between obesity and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006 Aug;15(8):917-31.

- 11: Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.
- 12: Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Zamora-Valdes D, Uribe M. Adiponectin, structure, function and pathophysiological implications in non-alcoholic fatty liver disease. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Jun;6(6):651-6.
- 13: Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006 Apr;12(2):163-8.
- 14: Vasseur F. Adiponectin and its receptors: partners contributing to the "vicious circle" leading to the metabolic syndrome? *Pharmacol Res*. 2006 Jun;53(6):478-81. Epub 2006 Mar 27.
- 15: Ahima RS. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Feb;14 Suppl 1:9S-15S.
- 16: Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2006 May;8(3):264-80.
- 17: Do D, Alvarez J, Chiquette E, Chilton R. The good fat hormone: adiponectin and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2006 Mar;8(2):94-9.
- 18: Schondorf T, Maiworm A, Emmison N, Forst T, Pfutzner A. Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk. *Clin Lab*. 2005;51(9-10):489-94.
- 19: Lam KS, Xu A. Adiponectin: protection of the endothelium. *Curr Diab Rep*. 2005 Aug;5(4):254-9. Review.
- 20: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):439-51.
- 21: Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans. *Curr Diab Rep*. 2005 Apr;5(2):136-40.
- 22: Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005 Feb;6(1):13-21.

BMS82032FF human Adiponectin Simplex Kit

23: Nedvidkova J, Smitka K, Kopsky V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res.* 2005;54(2):133-40.

24: Goldstein BJ, Scalia R.

Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2563-8.

25: Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I.

Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):29-33. Epub 2003 Oct 9

26: Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res.* 2002 Sep;34(9):469-74.

For literature update refer to **www.bendermedsystems.com**

8 ORDERING INFORMATION

For orders please contact:

Europe-Headquarters

Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2 A-
1030 Vienna, Austria, Europe
phone: +43 1 796 40 40 ext. 114
fax: +43 1 796 40 40 ext. 400
e-mail: order@bendermedsystems.com

USA

Bender MedSystems, Inc.
849 Hinckley Road
Burlingame, CA 94010, USA
toll-free phone: +1 (866) 952 2112
toll-free fax: +1 (877) 952 2112
phone: +1 (650) 952 2112
fax: +1 (650) 952 2252

For technical information please contact:

e-mail: techserv@bendermedsystems.com
www.bendermedsystems.com

Cat.No. BMS82032FF human Adiponectin Simplex Kit

RayBio[®] Human Acrp30 ELISA Kit

Catalog #: ELH-Adiponectin

User Manual

Last revised November 2, 2015

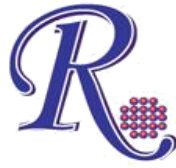
Caution:
Extraordinarily useful information enclosed



ISO 13485 Certified

3607 Parkway Lane, Suite 100 Norcross, GA 30092 Tel: 1-888-494-8555 (Toll Free) or 770-729-2992, Fax:770-206-2393

Web: www.RayBiotech.com, Email: info@raybiotech.com



RayBiotech, Inc.

RayBio[®] Human Acrp30 ELISA Kit Protocol

TABLE OF CONTENTS

I. Introduction	3
II. Reagents	4
III. Storage	4
IV. Additional Materials Required	4
V. Reagent Preparation	5
VI. Assay Procedure	6
VII. Assay Procedure Summary	7
VIII. Calculation of Results	8
A. Typical Data	8
B. Sensitivity	8
C. Recovery	9
D. Linearity	9
E. Reproducibility	10
IX. Specificity	10
X. Troubleshooting Guide	11

Please read the entire manual carefully before starting your experiment

I. INTRODUCTION

Human Adiponectin/Acrp30 is expressed and secreted exclusively by adipose tissue. Adiponectin is a hormone that plays a role in the regulation of glucose and lipid homeostasis. Adiponectin as a potent insulin enhancer can link adipose tissue and whole-body glucose metabolism. Levels of Adiponectin are decreased in obesity and it has been observed that Adiponectin levels are also reduced in patients with coronary artery disease.

The RayBio[®] Human Adiponectin ELISA kit is an in vitro enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative measurement of human Adiponectin in serum, plasma, and cell culture supernatants. This assay employs an antibody specific for human Adiponectin coated on a 96-well plate. Standards and samples are pipetted into the wells and Adiponectin present in a sample is bound to the wells by the immobilized antibody. The wells are washed and biotinylated anti-human Adiponectin antibody is added. After washing away unbound biotinylated antibody, HRP-conjugated streptavidin is pipetted to the wells. The wells are again washed, a TMB substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of Adiponectin bound. The Stop Solution changes the color from blue to yellow, and the intensity of the color is measured at 450 nm.

II. REAGENTS

Component	Size / Description	Storage / Stability After Preparation
Acrp30 Microplate (Item A)	96 wells (12 strips x 8 wells) coated with anti-Human Acrp30.	1 month at 4°C*
Wash Buffer Concentrate (20X) (Item B)	25 ml of 20X concentrated solution.	1 month at 4°C
Standard Protein (Item C)	2 vials of Human Acrp30. 1 vial is enough to run each standard in duplicate.	1 week at -80°C
Detection Antibody Acrp30 (Item F)	2 vials of biotinylated anti-Human Acrp30. Each vial is enough to assay half the microplate.	5 days at 4°C
HRP-Streptavidin Concentrate (Item G)	200 µl 80X concentrated HRP-conjugated streptavidin.	Do not store and reuse.
TMB One-Step Substrate Reagent (Item H)	12 ml of 3,3,5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in buffer solution.	N/A
Stop Solution (Item I)	8 ml of 0.2 M sulfuric acid.	N/A
Assay Diluent A (Item D)	2 bottles of 30 ml diluent buffer, 0.09% sodium azide as preservative.	1 month at 4°C
Assay Diluent C (Item L)	2 bottles of 15 ml diluent buffer.	1 month at 4°C
Assay Diluent B (Item E)	15 ml of 5X concentrated buffer.	1 month at 4°C

*Return unused wells to the pouch containing desiccant pack, reseal along entire edge.

III. STORAGE

The entire kit may be stored at -20°C for up to 1 year from the date of shipment. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The kit may be stored at 4°C for up to 6 months. For extended storage, it is recommended to store at -80°C.

IV. ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED

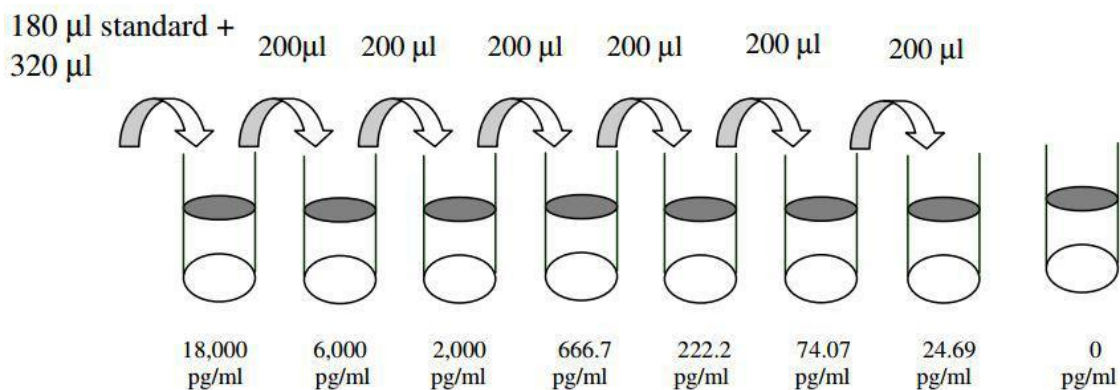
1. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
2. Precision pipettes to deliver 2 µl to 1 ml volumes.
3. Adjustable 1-25 ml pipettes for reagent preparation.
4. 100 ml and 1 liter graduated cylinders.
5. Absorbent paper.
6. Distilled or deionized water.
7. Log-log graph paper or computer and software for ELISA data analysis.
8. Tubes to prepare standard or sample dilutions.

V. REAGENT PREPARATION

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18 - 25°C) before use.
2. Assay Diluent B (Item E) should be diluted 5-fold with deionized or distilled water before use.
3. Sample dilution: Assay Diluent A (Item D) should be used for dilution of serum and plasma samples. Assay Diluent C (Item L) should be used for dilution of cell culture supernatant samples. The suggested dilution for normal serum/plasma is 30,000 fold. For example, add 2 μ l of serum/plasma into a tube with 398 μ l Assay Diluent A to prepare a 200-fold diluted sample. Mix thoroughly and then pipette 2 μ l of prepared 200-fold diluted sample into a tube with 298 μ l 1X Assay Diluent A to prepare a final 30,000 fold diluted sample.

Note: Levels of Acrp30 may vary between different samples. Optimal dilution factors for each sample must be determined by the investigator.

4. Preparation of standard: Briefly spin a vial of Item C. Add 800 μ l Assay Diluent A (for serum/plasma samples) or Assay Diluent C (for cell culture supernatants) into Item C vial to prepare a 50 ng/ml standard. Dissolve the powder thoroughly by a gentle mix. Add 180 μ l Adiponectin standard (50 ng/ml) from the vial of Item C, into a tube with 320 μ l Assay Diluent A or C to prepare an 18,000 pg/ml stock standard solution. Pipette 400 μ l Assay Diluent A or C into each tube. Use the stock standard solution to produce a dilution series (shown below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. Assay Diluent A or C serves as the zero standard (0 pg/ml). The 18,000 pg/ml standard in Assay Diluent A may be saturated, we recommend to start from 6,000 pg/ml for Assay Diluent A standard curve.



5. If the Wash Concentrate (20X) (Item B) contains visible crystals, warm to room temperature and mix gently until dissolved. Dilute 20 ml of Wash Buffer Concentrate into deionized or distilled water to yield 400 ml of 1X Wash Buffer.
6. Briefly spin the Detection Antibody vial (Item F) before use. Add 100 μ l of 1X Assay Diluent B (Item E) into the vial to prepare a detection antibody concentrate. Pipette up and down to mix gently (the concentrate can be stored at 4°C for 5 days). The detection antibody concentrate should be diluted 80-fold with 1X Assay Diluent B (Item E) and used in step 4 of Part VI Assay Procedure.
7. Briefly spin the HRP-Streptavidin concentrate vial (Item G) and pipette up and down to mix gently before use, as precipitates may form during storage. HRP-Streptavidin concentrate should be diluted 80-fold with 1X Assay Diluent B (Item E).

For example: Briefly spin the vial (Item G) and pipette up and down to mix gently. Add 100 μ l of HRP-Streptavidin concentrate into a tube with 8 ml 1X Assay Diluent B to prepare an 80 fold diluted HRP-Streptavidin solution (don't store the diluted solution for next day use). Mix well.

VI. ASSAY PROCEDURE

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18 - 25°C) before use. It is recommended that all standards and samples be run at least in duplicate.
2. Label removable 8-well strips as appropriate for your experiment.
3. Add 100 μ l of each standard (see Reagent Preparation step 3) and sample into appropriate wells. Cover well and incubate for 2.5 hours at room temperature or over night at 4°C with gentle shaking.
4. Discard the solution and wash 4 times with 1X Wash Solution. Wash by filling each well with Wash Buffer (300 μ l) using a multi-channel Pipette or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.

5. Add 100 μ l of 1X prepared biotinylated antibody (Reagent Preparation step 6) to each well. Incubate for 1 hour at room temperature with gentle shaking.
6. Discard the solution. Repeat the wash as in step 3.
7. Add 100 μ l of prepared Streptavidin solution (see Reagent Preparation step 7) to each well. Incubate for 45 minutes at room temperature with gentle shaking.
8. Discard the solution. Repeat the wash as in step 3.
9. Add 100 μ l of TMB One-Step Substrate Reagent (Item H) to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking.
10. Add 50 μ l of Stop Solution (Item I) to each well. Read at 450 nm immediately.

VII. ASSAY PROCEDURE SUMMARY

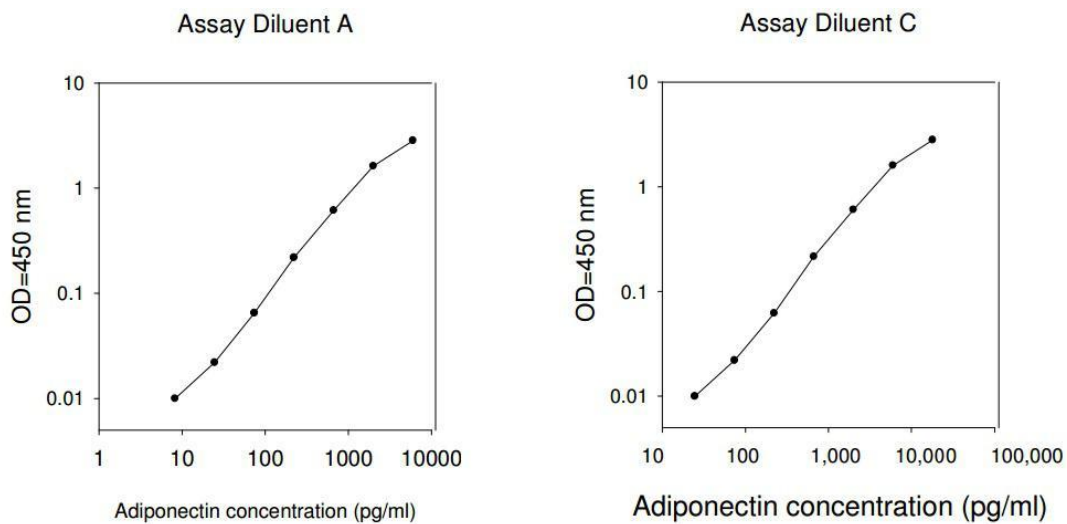
1. Prepare all reagents, samples and standards as instructed.
2. Add 100 μ l standard or sample to each well. Incubate 2.5 hours at room temperature or over night at 4°C.
3. Add 100 μ l prepared biotin antibody to each well. Incubate 1 hour at room temperature.
4. Add 100 μ l prepared Streptavidin solution. Incubate 45 minutes at room temperature.
5. Add 100 μ l TMB One-Step Substrate Reagent to each well. Incubate 30 minutes at room temperature.
6. Add 50 μ l Stop Solution to each well. Read at 450 nm immediately.

VIII. CALCULATION OF RESULTS

Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, controls and samples, and subtract the average zero standard optical density. Plot the standard curve on log-log graph paper or using Sigma plot software, with standard concentration on the x-axis and absorbance on the y-axis. Draw the best-fit straight line through the standard points.

A. TYPICAL DATA

These standard curves are for demonstration only. A standard curve must be run with each assay.



B. SENSITIVITY

The minimum detectable dose of Human Acrp30 was determined to be 25 pg/ml

Minimum detectable dose is defined as the analyte concentration resulting in an absorbance that is 2 standard deviations higher than that of the blank (diluent buffer).

C. SPIKING & RECOVERY

Recovery was determined by spiking various levels of Human Acrp30 into the sample types listed below. Mean recoveries are as follows:

Sample Type	Average % Recovery	Range (%)
Serum	93.57	83-104
Plasma	90.29	80-103
Cell culture media	96.59	83-107

D. LINEARITY

Sample Type	Serum	Plasma	Cell Culture Media
1:2 Average % of Expected Range (%)	95 83-104	94 84-103	92 82-103
1:4 Average % of Expected Range (%)	93 84-104	92 83-102	93 85-104

E. REPRODUCIBILITY

Intra-Assay CV%: <10%

Inter-Assay CV%: <12%

IX. SPECIFICITY

Cross Reactivity: This ELISA kit shows no cross-reactivity with any of the cytokines tested: Human Angiogenin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, I-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, Leptin (OB), MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, MIP-1 delta, PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF-beta, TIMP-1, TIMP-2, TNF-alpha, TNF-beta, TPO, VEGF.

X. TROUBLESHOOTING GUIDE

Problem	Cause	Solution
Poor standard curve	<ul style="list-style-type: none"> • Inaccurate pipetting • Improper standard dilution 	<ul style="list-style-type: none"> • Check pipettes • Briefly centrifuge Item C and dissolve the powder thoroughly by gently mixing
Low signal	<ul style="list-style-type: none"> • Improper preparation of standard and/or biotinylated antibody • Too brief incubation times • Inadequate reagent volumes or improper dilution 	<ul style="list-style-type: none"> • Briefly spin down vials before opening. Dissolve the powder thoroughly. • Ensure sufficient incubation time; assay procedure step 2 may be done overnight • Check pipettes and ensure correct preparation
Large CV	<ul style="list-style-type: none"> • Inaccurate pipetting • Air bubbles in wells 	<ul style="list-style-type: none"> • Check pipettes • Remove bubbles in wells
High background	<ul style="list-style-type: none"> • Plate is insufficiently washed • Contaminated wash buffer 	<ul style="list-style-type: none"> • Review the manual for proper wash. If using a plate washer, ensure that all ports are unobstructed. • Make fresh wash buffer
Low sensitivity	<ul style="list-style-type: none"> • Improper storage of the ELISA kit • Stop solution 	<ul style="list-style-type: none"> • Store your standard at $<-70^{\circ}\text{C}$ after reconstitution, others at 4°C. Keep substrate solution protected from light. • Add stop solution to each well before reading plate

RayBio[®] ELISA Kits

Over 2,000 ELISA kits available, visit www.RayBiotech.com/ELISA-Kits.html for details.

This product is for research use only.



©2015 RayBiotech, Inc

PRODUCT INFORMATION AND MANUAL

*FlowCytomix
Human Leptin Simplex Kit*

BMS82039FF

For research use only.

Not for diagnostic or therapeutic

procedures. 96 Tests

**human Leptin
BMS82039FF Simplex Kit**



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
A-1030 Vienna, Austria, Europe

TABLE OF CONTENTS

1	Reagents Provided	3
2	Intended Use	3
3	Summary	4
4	Storage Instructions	5
5	Representative Standard Curve	5
6	Performance Characteristics	6
7	Bibliography	8
8	Ordering Information	9

This human Leptin Simplex Kit must be used in combination with FlowCytomix human Basic Kit BMS8420FF. For test procedure, measurement and calculation of results please refer to FlowCytomix human Basic Kit BMS8420FF manual.

1 REAGENTS PROVIDED

- 1 vial (175 μ l) **Fluorescent Beads** (20x) coated with monoclonal antibody to human Leptin, Bead Population **B10**
- 2 vials human Leptin **Standard** (lyophilized): 50 μ g/ml upon reconstitution
- 1 vial (350 μ l) **Biotin-Conjugate** (20x) anti-human Leptin monoclonal antibody

2 INTENDED USE

BMS82039FF is a bead based Analyte Detection System for quantitative detection of human Leptin by Flow Cytometry.

BMS82039FF is for research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

3 SUMMARY

Leptin is a 16 kDa protein hormone that plays a key role in regulating energy intake and energy expenditure, including the regulation (decrease) of appetite and (increase) of metabolism. The Ob(Lep) gene (Ob for obese and Lep for leptin) is located on chromosome 7 in humans. Leptin binds to the Ventral Medial nucleus of the hypothalamus, known as the satiety center. Binding of leptin to this nucleus signals to the brain that the body has had enough to eat. Thus, circulating leptin levels give the brain a reading of energy storage for the purposes of regulating appetite and metabolism. Leptin works by inhibiting the activity of neurons that contain neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP), and by increasing the activity of neurons expressing α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). The NPY neurons are a key element in the regulation of appetite; small doses of NPY injected into the brains of experimental animals stimulates feeding, while selective destruction of the NPY neurons in mice causes them to become anorexic. Conversely, α -MSH is an important mediator of satiety, and differences in the gene for the receptor at which α -MSH acts in the brain are linked to obesity in humans.

4 STORAGE INSTRUCTIONS

Store kit and components at 2 to 8°C. The expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, the reagent is not contaminated by the first handling.

5 REPRESENTATIVE STANDARD CURVE

Table 1

Representative standard curve.

Do not use this curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of samples assayed.

Concentration (ng/ml)	Fluorescent Intensity (FI)
2500	87,5
833	52,0
278	16,0
93	3,0
31	0,6
10	0,3
3	0,2
0	0,2

6 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

6.1 Sensitivity

The limit of detection of human Leptin defined as the concentration resulting in a fluorescent intensity significantly higher than that of the dilution medium (mean + 2 standard deviations) was determined to be 1,4 ng/ml.

The value shown depends on the type of flow cytometer used for analysis as well as on the respective instrument setup. The value shown is for guidance only. Optimum results for each machine can be achieved by following the instrument set up process.

6.2 Reproducibility

6.2.1 Intra-assay

Reproducibility within the assay was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 4 serum samples containing different concentrations of human Leptin (high, medium high, medium low and low concentration). 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean intra-assay coefficient of variation for human Leptin (see Table 2). It has been calculated to be 3,8%.

Individual user data may vary due to differences in protein content of serum/plasma pools or individual donor serum/plasma.

Table 2

The coefficient of variation of the human Leptin concentration calculated for each sample.

	CV Sample 1 high (%)	CV Sample 2 medium high (%)	CV Sample 3 medium low (%)	CV Sample 4 low (%)	Mean intra- assay CV (%)
h Leptin	4,9	3,2	2,7	4,3	3,8

6.2.2 Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 4 serum samples containing different concentrations of human Leptin (high, medium high, medium low and low concentration). 2 standard curves were run on each plate. Data below (see Table 3) show the mean inter-assay coefficient of variation for human Leptin, calculated on 12 determinations of each sample. It has been calculated to be 4,1%. Individual user data may vary due to differences in protein content of serum/plasma pools or individual donor serum/plasma.

Table 3

The coefficient of variation of the human Leptin concentration calculated for each sample.

	CV Sample 1 high (%)	CV Sample 2 medium high (%)	CV Sample 3 medium low (%)	CV Sample 4 low (%)	Mean inter- assay CV (%)
h Leptin	2,8	5,0	3,9	4,9	4,1

6.3 Specificity

There was no detectable crossreactivity observed for other combinable analytes of Simplex and Multiplex Assays from Bender MedSystems. (For detailed information refer to “Combination Table“ on www.bendermedsystems.com.)

6.4 Hook effect

Samples with expected concentrations two fold higher than the concentration of highest standard should be diluted 10 fold in Assay Buffer (1x) before assay performance to prevent false negative results due to “hook effects”.

7 BIBLIOGRAPHY

- 1) Despres JP. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest.* 2006;29(3 Suppl):77-82. Review.
- 2) Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy.. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Jun;194(6):1537-45. Epub 2006 Apr 21. Review.
- 3) Kao PC, Shiesh SC, Wu TJ. Serum C-reactive protein as a marker for wellness assessment. *Ann Clin Lab Sci.* 2006 Spring;36(2):163-9. Review.
- 4) Ahima RS, Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Feb;14 Suppl 1:9S-15S. Review.
- 5) Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine.* 2006 Feb;29(1):109-17. Review.
- 6) McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS; American College of Physicians and the American Physiological Society. Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med.* 2006 Apr 4;144(7):517-24. Review.
- 7) Friedman AN. Adiposity in dialysis: good or bad? *Semin Dial.* 2006 Mar-Apr;19(2):136-40. Review.
- 8) Nagaya N, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med.* 2006 Mar;45(3):127-34. Epub 2006 Mar. Review.
- 9) Das SK. Body composition measurement in severe obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005 Nov;8(6):602. Review.

For literature update refer to www.bendermedsystems.com

8 ORDERING INFORMATION

For orders please contact:

Europe-Headquarters

Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2 A-
1030 Vienna, Austria, Europe
phone: +43 1 796 40 40 ext. 114
fax: +43 1 796 40 40 ext. 400
e-mail: order@bendermedsystems.com

USA

Bender MedSystems, Inc.
849 Hinckley Road
Burlingame, CA 94010, USA
toll-free phone: +1 (866) 952 2112
toll-free fax: +1 (877) 952 2112
phone: +1 (650) 952 2112
fax: +1 (650) 952 2252

For technical information please contact:

e-mail: techserv@bendermedsystems.com
www.bendermedsystems.com

Cat.No. BMS82039FF human Leptin Simplex Kit

BMS82039FF human Leptin Simplex Kit