



PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

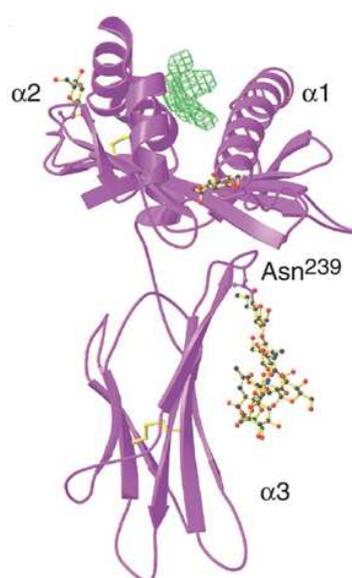
Dipòsit Legal: T 977-2015

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL



TESIS DOCTORAL

Silvia Daniela Naf Cortés



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departamento de Medicina y Cirugía

Tarragona, 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

**PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA
FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES
GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL**

TESIS DOCTORAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Director: Dr. Joan Josep Vendrell Ortega

Codirectora: Dra. Ana Megía Colet



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departamento de Medicina y Cirugía

Tarragona, 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015



Joan Josep Vendrell Ortega, Jefe de la Sección de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona y Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad Rovira i Virgili.

Ana Megía Colet, Médico Adjunto de la Sección de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona y Profesora Asociada del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad Rovira i Virgili.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral "Papel de nuevas adipoquinas en la fisiopatología de la Diabetes Gestacional y en el crecimiento fetal", presentada por Silvia Daniela Naf Cortés, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos en Tarragona a cinco de febrero de dos mil quince

Joan Josep Vendrell Ortega

Ana Megía Colet

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

A Luis, mi pareja

A Renato y Teresa, mis padres

A Robert, mi hermano

A Nelly, mi madrina

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Índice

Agradecimientos	11
Abreviaturas	15
1. Introducción	19
1.1 Adaptación metabólica materna durante la gestación.....	21
1.1.1 Modificaciones del metabolismo glucídico.....	21
1.2.2 Modificaciones del metabolismo lipídico.....	23
1.2.3 Modificaciones del metabolismo protéico.....	23
1.2 Diabetes Mellitus Gestacional (DMG).....	24
1.2.1 Definición.....	24
1.2.3 Consecuencias materno-fetales de la DMG.....	25
1.2.3 Diagnóstico de DMG.....	26
1.2.4 Fisiopatología.....	27
1.2.4.1 Mecanismos responsables de la resistencia a la insulina durante la gestación.....	30
1.2.4.1.1 Hormonas gestacionales.....	30
1.2.4.1.2 Adipoquinas.....	31
1.3 Crecimiento fetal.....	38
1.3.1 Factores implicados en el crecimiento fetal.....	38
1.3.1.1 Efectos de las adipoquinas sobre el crecimiento fetal...41	
1.3.2 Diferencias por sexos en el crecimiento fetal.....	43
1.3.3 Efectos a largo plazo del ambiente intrauterino.....	44
1.4 Nuevas adipoquinas.....	45
1.4.1 Glicoproteína Zinc- α -2 (ZAG).....	45
1.4.1.1 Definición.....	45
1.4.1.2 Funciones.....	45

1.4.1.3 Regulación de la expresión de ZAG en tejido adiposo.	48
1.4.1.4 ZAG en contexto de resistencia a la insulina.....	48
1.4.1.5 ZAG en gestación patológica.....	50
1.4.2 Sistema Activina A–Folistatina–Folistatina like 3.....	50
1.4.2.1 Activina A.....	50
1.4.2.1.1 Definición.....	50
1.4.2.1.2 Regulación.....	51
1.4.2.1.3 Funciones.....	51
1.4.2.2 Folistatina.....	54
1.4.2.2.1 Definición.....	54
1.4.2.2.2 Funciones.....	55
1.4.2.3 Folistatina like 3.....	56
1.4.2.3.1 Definición.....	56
1.4.2.3.2 Funciones.....	57
1.4.2.4 Sistema Activina A–Folistatina en contexto de resistencia a la insulina.....	57
1.4.2.5 Sistema Activina A–Folistatina–Folistatina like 3 en gestación normal y patológica.....	58
2. Hipótesis.....	61
3. Objetivos.....	65
4. Material y métodos.....	69
4.1 Sujetos de estudio.....	71
4.2 Métodos.....	72
4.2.1 Diseño de los estudios.....	72
4.2.2 Cálculo de la muestra.....	73
4.2.3 Datos clínicos.....	73

4.2.4 Determinaciones analíticas.....	74
4.2.5 Evaluación ecográfica.....	76
4.2.6 Evaluación antropométrica neonatal.....	76
4.2.7 Análisis estadístico.....	78
5. Resultados.....	79
5.1. Primer estudio.....	81
<i>Zinc-α2-Glycoprotein is unrelated to Gestational Diabetes: anthropometric and metabolic determinants in pregnant women and their offspring</i>	
<i>PLoS ONE. 2012; 7: e47601</i>	
5.2. Segundo estudio.....	89
<i>Serum Activin A and Follistatin levels in Gestational Diabetes and the association of the Activin A-Follistatin System with anthropometric parameters in offspring</i>	
<i>PLoS ONE. 2014; 9: e92175</i>	
6.3. Tercer estudio.....	97
Gender determines the actions of adiponectin multimers on fetal growth and adiposity	
American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2013; 208: 1.e1-1.e7	
7. Discusión.....	105
8. Conclusiones	121
9. Bibliografía.....	125

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Después de cuatro años ha llegado el momento de concluir este proyecto y quiero dar las gracias a toda la gente que ha estado a mi lado este tiempo.

Al Dr. Joan Vendrell, director de esta tesis, por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto y por su gran interés científico que transmite a toda la gente a su alrededor.

A la Dra. Ana Megía, mi amiga y codirectora de esta tesis, por tu apoyo incondicional en este proyecto y por hacer que trabajar contigo sea una maravillosa experiencia.

Al resto de miembros de la Sección de Endocrinología y Nutrición del Hospital Joan XXIII por su colaboración en esta tesis, especialmente a la Dra. Gemma Llauradó que ha formado parte del equipo hasta hace poco por su ayuda con temas prácticos de la tesis.

A la Dra. Mónica Ballesteros del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Joan XXIII por la realización de las mediciones ecográficas.

A todos los miembros del grupo de recerca del Hospital Joan XXIII por su ayuda en las determinaciones de laboratorio.

A los miembros del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clinic de Barcelona donde me formé como endocrinóloga y a las residentes que compartieron la formación conmigo, especialmente a la Dra. Silvia Pellitero por su ayuda en temas prácticos de la tesis.

A mis padres, mi hermano y mi madrina que aunque están lejos de mí geográficamente están muy cercanos en mi corazón, por apoyarme ahora y siempre.

A Luis, por haber vivido esta experiencia conmigo de principio a fin y por la calma y positividad que me ha transmitido todos estos años. Sin tí, esta tesis no hubiera sido posible.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

ABREVIATURAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

-
- ACC1: Acetil-CoA-carboxilasa-1
- ActRIA o ALK 2: Activin receptor type IA
- ActRIB o ALK 4: Activin receptor type IB
- ActRIIA/B: Activin receptor type IIA/B
- AEG: Adecuados para su edad gestacional
- AFABP: Adipocyte fatty acid binding protein
- AGL: Ácidos grasos libres
- ALK7: Activin receptor type IC
- CC: Carpenter y Coustan
- CIR: Crecimiento intrauterino retardado
- DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DMG: Diabetes Mellitus Gestacional
- ECV: Enfermedad cardiovascular
- FAS: Ácido graso sintasa
- FST: Folistatina
- FSTL3: Folistatin like 3
- FSH: Hormona foliculoestimulante
- FWE: Estimación de peso fetal
- FTVE: Estimación del volumen fraccional del muslo
- GED: Grandes para su edad gestacional
- GH: Hormona de crecimiento
- GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4
- HbA1c: Hemoglobina glicosilada
- HAPO: Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes
- HMW: Alto peso molecular

HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance

hPGH: Hormona de crecimiento placentaria

HSL: Lipasa sensible a hormona

IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

IKK: IκB quinasa

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

IRS-1: Sustrato del receptor de la insulina 1

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LH: hormona luteinizante

LMW: Bajo peso molecular

MMW: Peso molecular medio

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

NDDG: National Diabetes Data Group

NF-κB: Nuclear factor kappa B

NIH: National Institut of Health

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PEG: Pequeños para su edad gestacional

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PKA: Proteinkinasa A

PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RBP-4: Retinol binding protein-4

SOP: Síndrome del ovario poliquístico

TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α

TNG: Tolerancia normal a la glucosa

1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

1.1 ADAPTACIÓN METABÓLICA DURANTE LA GESTACIÓN

La gestación humana se caracteriza por una serie de modificaciones en el metabolismo que facilitan el acúmulo de reservas nutricionales durante la primera mitad de la gestación, que serán necesarias para hacer frente a las demandas maternas y fetales crecientes en la segunda mitad de la misma.

Uno de los cambios más prominentes que ocurren es la modificación de la sensibilidad a la insulina conforme progresa la gestación, jugando un papel relevante en los cambios en el metabolismo glucídico y lipídico que sobrevienen durante el embarazo.

1.1.1 Modificaciones del metabolismo glucídico

Sensibilidad a la insulina

En la fase inicial de la gestación la sensibilidad a la insulina es muy variable, habiéndose descrito que puede aumentar, disminuir o incluso no modificarse (1,2).

Sin embargo, en la segunda mitad de la gestación la disminución progresiva de la sensibilidad a la insulina suele ser una constante. En estudios en los que se ha medido la sensibilidad a la insulina por la técnica del clamp euglucémico-hiperinsulinémico (1-4), o utilizando la técnica del modelo mínimo (5), se ha objetivado un descenso que oscila entre un 45-70% en el tercer trimestre. Esta disminución en la sensibilidad a la insulina es equiparable a la que se observa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Esta resistencia a la insulina se localiza principalmente a nivel muscular, pero también a nivel adipocitario y hepático (6,7). Estudios longitudinales demuestran un incremento progresivo en la producción hepática de glucosa

basal a pesar del hiperinsulinismo existente, lo que apoya la presencia de resistencia a la insulina a dicho nivel (1,2)

Hiperinsulinemia

Diversos estudios longitudinales que valoran la respuesta de la insulina a la glucosa han evidenciado un aumento progresivo de la primera y la segunda fase de secreción insulínica junto a un incremento progresivo de la insulinemia basal a lo largo de la gestación (1,2,4). El progresivo incremento en la respuesta de la célula β resulta especular a la progresiva disminución en la sensibilidad a la insulina durante la gestación con la cual mantiene una relación hiperbólica (8).

Los mecanismos responsables de ésta hipersecreción de insulina no son totalmente conocidos. Un factor que influye es la hiperplasia de las células β que lleva a un incremento del 10-15% de la masa de célula β (9), en la que podría intervenir un efecto citotrópico de la progesterona y el lactógeno placentario (10). Otro factor influyente son los estrógenos que estimulan la secreción insulínica (11). También se ha descrito un aumento de la respuesta de la célula β a distintos nutrientes (12).

Disminución de glucemia basal

Durante la gestación se ha descrito una disminución progresiva de la glucemia basal. El mecanismo responsable es complejo, pero se han objetivado diversos aspectos que pueden influir y que incluyen entre otros, la expansión del volumen plasmático en la fase inicial de la gestación, el incremento de consumo de glucosa feto-placentario en la fase tardía de la gestación, la restricción de la producción hepática basal de glucosa asociada a la reducción del aporte de alanina como sustrato de la gluconeogénesis y el aumento de función de las células β (13).

1.1.2 Modificaciones del metabolismo lipídico

Los cambios en el metabolismo lipídico son fundamentales para la adaptación de la homeostasis energética materna a los requerimientos crecientes durante la gestación.

En la primera mitad de la gestación predomina una situación de anabolismo propiciada por una respuesta aumentada a la insulina que favorece la lipogénesis lo que conlleva un incremento de los depósitos de grasa maternos (14).

En cambio en la segunda mitad de la gestación se produce una situación de catabolismo gracias a la lipólisis facilitada por la marcada resistencia a la insulina que aparece en este periodo. La lipólisis produce un incremento de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol en la circulación cuyo principal destino es el hígado, donde pueden ser de nuevo reesterificados para la producción de triglicéridos. Además, el glicerol puede ser utilizado para la neoglucogénesis y los AGL para la cetogénesis. Estas dos vías metabólicas sobretodo se utilizan durante la fase de ayuno (15).

1.1.3 Modificaciones del metabolismo proteico

Existe una acumulación de proteínas en el compartimento materno y fetal durante el curso de la gestación. Algunos estudios en los que se han utilizado aminoácidos marcados han estimado que el ratio de síntesis proteica durante el primer trimestre es similar al de las no gestantes, produciéndose un aumento de esta del 15% y del 25% durante el segundo y tercer trimestre respectivamente (16). Además, durante la gestación se ha observado una reducción de aminoácidos circulantes que es relativamente precoz y cuyos mecanismos causales no están claramente establecidos, aunque se ha

postulado que puede deberse a una inhibición de la liberación de aminoácidos procedentes del músculo esquelético por parte de las hormonas placentarias (13). Los mecanismos implicados en la hipoaminoacidemia posprandial incluyen: una acelerada captación muscular de aminoácidos en respuesta a la hiperinsulinemia posprandial, alteraciones en el volumen de distribución de aminoácidos como resultado de la expansión de volumen intravascular e intersticial durante la gestación y un incremento en la utilización de aminoácidos por el feto en la gestación tardía (13).

Todos estos cambios requieren un funcionamiento adecuado de las células β , y cuando estas no son capaces de responder adecuadamente a las demandas a las que son sometidas durante el periodo gestacional aparece la DMG (13).

1.2. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

1.2.1 Definición

La DMG se define como una intolerancia a la glucosa de severidad variable que empieza o se diagnostica por primera vez durante la gestación, y que suele normalizarse tras la finalización de ésta (17). Constituye la patología metabólica más frecuente durante la gestación. Su prevalencia es variable dependiendo de la población estudiada y de los criterios diagnósticos utilizados (18).

1.2.2 Consecuencias materno-fetales de la DMG

La DMG puede afectar a la salud materna y a la de su descendencia, tanto durante el curso de esta como a largo plazo.

Durante la gestación, se asocia con un aumento significativo del riesgo de desarrollo de patología hipertensiva, así como de parto pretérmino y de cesárea (19). Tras la gestación, conlleva un aumento del riesgo de desarrollo de DM2 en la madre que es hasta siete veces superior en comparación a las mujeres con tolerancia normal a la glucosa (TNG) durante la gestación (20). Se ha observado que la incidencia acumulada de DM2 se incrementa marcadamente en los cinco años posteriores al parto, mientras que el aumento es más lento a partir de los diez años postparto (21). La DMG también es un factor de riesgo materno de síndrome metabólico y de enfermedad cardiovascular (ECV) a largo plazo (22).

En cuanto a la descendencia, los hijos de madres con DMG presentan una mayor morbilidad perinatal, entre la que destaca el aumento de riesgo de macrosomía con los consiguientes problemas asociados durante el parto como son la distocia de hombro y la afectación del plexo braquial. Otro hallazgo característico es el polihidramnios que puede contribuir a la prematuridad. Durante el periodo neonatal son más frecuentes las complicaciones metabólicas, como la hipoglucemia y la hiperbilirrubinemia y también el síndrome del distrés respiratorio por inmadurez pulmonar. A largo plazo, se ha observado que los niños de madres con DMG presentan un mayor riesgo de desarrollar obesidad infantil y síndrome metabólico (23), así como de desarrollo de DM2 (24).

La relación entre la glucosa materna y la aparición de complicaciones perinatales y maternas parece no tener un umbral. Recientemente el estudio

observacional HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes) ha demostrado la relación continua, sin objetivarse ningún umbral de riesgo, entre los niveles de glucosa materna y parámetros de morbilidad perinatal, como son el peso neonatal, niveles de péptido C de cordón superiores al percentil 90 e hipoglucemia neonatal, y de morbilidad materna, como es el parto por cesárea (25).

1.2.3 Diagnóstico de DMG

A pesar de que la necesidad de un diagnóstico fiable de DMG ha quedado evidenciada al objetivar que su tratamiento disminuye la morbilidad materna y perinatal (26), no existe consenso sobre los criterios a utilizar para su diagnóstico. En la actualidad, existen múltiples criterios diagnósticos. Entre los más utilizados están los establecidos por el National Diabetes Data Group (NDDG) en 1979 (27) y los de Carpenter y Coustan (CC), que en 1982 realizaron una nueva modificación de los criterios (28) que fue adoptada por la 4th International Workshop Conference en 1998 (29). Posteriormente, en 2010, la International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG), basándose en los resultados del estudio HAPO (25), propuso establecer como criterios diagnósticos aquellos valores de glucemia que se asocian con un aumento de la morbilidad perinatal de 1.75 veces la de la media de la población (30). Dado el vigoroso debate abierto sobre la validez de dichos criterios, el National Institut of Health (NIH) en 2013 realizó una reunión de consenso que realzó la ausencia de ensayos clínicos que evidenciasen los beneficios de los nuevos criterios y recomendó mantener los criterios de la NDDG o los de CC (31). A su vez, la American Diabetes

Association en el 2014 da por validas en sus recomendaciones cualquiera de las tres estrategias diagnósticas: IADPSG o CC o NDDG (32).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1980 hasta el 2013, año en que adopta los criterios de la IADPSG, recomendaba utilizar para el diagnóstico de la diabetes gestacional los mismo criterios que los utilizados para el diagnóstico de diabetes o intolerancia a la glucosa fuera de la gestación (33).

En nuestro medio, el grupo español de diabetes y embarazo recomienda la utilización de los criterios del NDDG (34), ya que se realizó un estudio multicéntrico español que mostró que la utilización de los criterios de CC comportaba un aumento de la prevalencia de DMG del 2.8% con un aumento de la morbilidad perinatal escaso por lo que no compensaba su adopción en nuestro medio (35). Ante la aparición de los criterios de la IADPSG, el grupo español de diabetes y embarazo ha mantenido esta recomendación hasta que se dispongan de evidencias que justifiquen la adopción de los nuevos criterios (36).

Criterios	Glucemia mg/dl 0h	1h	2h	3h
NDDG*	105	190	165	145
CC*	95	180	155	140
IADPSG**	92	180	153	
OMS**	126		140	

Tabla 1: Criterios diagnósticos de DMG (Puntos de corte del TTOG de 100 g y 3 horas* o de 75 g y 2 horas**)

1.2.4 Fisiopatología de la DMG

La gestación es un estado diabetogénico. La progresiva resistencia a la insulina que comienza hacia la mitad de la gestación y que progresa a lo largo del tercer trimestre pone a prueba a las células β pancreáticas y la DMG resulta de la incapacidad de las células β para hacerle frente.

Durante el tercer trimestre, la sensibilidad a la insulina se reduce alrededor de dos tercios con respecto a los valores fuera de la gestación, tanto en mujeres con TNG como en mujeres con DMG (12). La mayor resistencia a la insulina observada durante el segundo y tercer trimestre de la gestación en las mujeres con DMG, bien sean obesas o delgadas, refleja la existencia de una mayor resistencia a la insulina previa a la gestación (1,2). Tras el parto se produce una mejoría de la sensibilidad a la insulina que es mayor en mujeres con TNG que en las que han presentado DMG (37,38). A pesar de que las mujeres con DMG son capaces de incrementar considerablemente la secreción de insulina, el incremento de la secreción para cualquier grado de resistencia a la insulina es aproximadamente un 50% menor que el que presentan las mujeres con TNG, tanto durante la gestación como tras esta (39,40). Esto se debe a un desplazamiento de la curva hiperbólica que relaciona la sensibilidad y la secreción de insulina (fig 1). Así pues, la DMG resulta de una secreción de insulina que es insuficiente para hacer frente a los altos requerimientos insulínicos derivados del aumento de resistencia a la insulina (41).

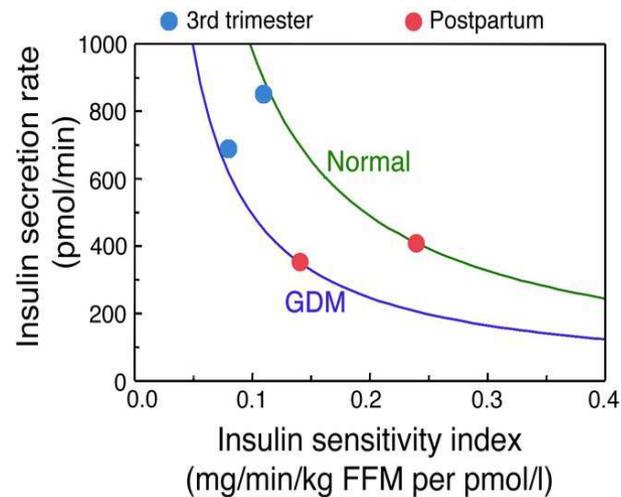


Figura 1: Relación entre sensibilidad y secreción de insulina en mujeres con DMG y normales durante el tercer trimestre y postparto. Buchanan T et al. Gestational diabetes mellitus. J Clin Invest. 2005;115:485-491

La mayor parte de las mujeres con DMG parecen tener una resistencia a la insulina crónica que provoca a largo plazo una disfunción de la célula β , lo que favorece el desarrollo de una insuficiencia insulínica relativa y explicaría el mayor riesgo de aparición de DM2 a lo largo de los años (41). Mucho menos frecuente es la disfunción de la célula β de etiología autoinmune. Menos de un 10% de mujeres con DMG presentan anticuerpos contra los islotes pancreáticos o contra antígenos de la célula β (42,43). Todavía más rara es la disfunción de la célula β de etiología monogénica. Mutaciones que causan diferentes tipos de diabetes MODY (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young) han sido descritas en mujeres con DMG (44,45). Mutaciones de genes mitocondriales también se han descrito en un pequeño número de mujeres con DMG (46).

1.2.4.1 Mecanismos responsables de la resistencia a la insulina durante la gestación

1.2.4.1.1 Hormonas gestacionales

Clásicamente la resistencia a la insulina durante la gestación se ha atribuido fundamentalmente a las hormonas gestacionales. Los niveles de hormonas como el lactógeno placentario, progesterona, prolactina y cortisol se correlacionan con el desarrollo de resistencia a la insulina en la segunda mitad de la gestación en modelos murinos (47). Sin embargo, los mecanismos celulares por los que se produce no están claros.

En la gestación humana, el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento placentaria han sido las dos hormonas más implicadas.

Los niveles de lactógeno placentario aumentan 30 veces durante la gestación. Esta hormona, por un lado, es capaz de estimular la secreción pancreática de insulina (48), y, por otro, aumenta la lipólisis materna, que conduce al aumento de ácidos grasos libres (AGL) responsables en parte del aumento de la resistencia a la insulina. Fuera de la gestación se ha visto que aumenta la resistencia a la insulina periférica (49), pero durante esta no se objetivado una relación directa con resistencia a la insulina (50).

La hormona de crecimiento placentaria (hPGH) aumenta de 6 a 8 veces durante la gestación. La sobreexpresión de hPGH en ratas transgénicas, similar a los niveles observados en el tercer trimestre de gestación, causa resistencia a la insulina periférica (51). Al igual que la hormona de crecimiento (GH) hipofisaria, hPGH es un potente antagonista de la insulina que estimula la lipólisis materna (51) y la neoglucogénesis hepática (52).

También altera la acción de la insulina en el músculo esquelético al incrementar la expresión de la subunidad p85α del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que inhibe de forma competitiva la actividad PI3K, lo que conlleva una reducción de la captación muscular de glucosa estimulada por la insulina (53). Sin embargo, durante la gestación, sólo se objetiva una relación negativa débil y sin llegar a ser significativa con la sensibilidad a la insulina (54).

Dado que no hay una clara correlación entre los niveles de hormonas placentarias y la resistencia a la insulina, hay que suponer que la sinergia con otros factores asociados a la gestación puede explicar mejor el desarrollo de la resistencia a la insulina (53).

1.2.4.1.2 Adipoquinas

El tejido adiposo ha dejado de ser simplemente un almacén energético para considerarse un órgano endocrino que secreta numerosas proteínas, denominadas colectivamente adipoquinas o adipocitoquinas que intervienen en una amplia variedad de procesos metabólicos entre los cuales se incluyen la sensibilidad a la insulina, la secreción de insulina, el control del apetito, la distribución de grasa corporal, el metabolismo lipídico, el gasto energético, la regulación de la adipogénesis y la inflamación (55). En los últimos años, diversas adipoquinas han sido implicadas en el desarrollo de resistencia a la insulina.

La obesidad se caracteriza por un aumento en la acumulación de lípidos, una expansión del tejido adiposo con la subsecuente hipoxia, y una acumulación de lípidos en tejidos en los cuales normalmente no deberían hacerlo, produciendo un efecto tóxico sobre el organismo. Los adipocitos

hipertróficos e hipóxicos producen adipoquinas proinflamatorias que además de actuar de forma endocrina, también actúan de forma paracrina sobre las células endoteliales, induciendo la producción de moléculas de adhesión y un aumento de la permeabilidad vascular, y sobre los macrófagos circulantes aumentando su reclutamiento, los cuales a su vez también secretan adipoquinas proinflamatorias amplificando el proceso inflamatorio (56).

El tejido adiposo visceral se diferencia del subcutáneo en que presenta adipocitos de mayor tamaño (57), es metabólicamente más activo y se relaciona más con la resistencia a la insulina y la DM2 (58).

En base a estas circunstancias, la obesidad y la DM2 se pueden considerar estados de baja inflamación crónica. Así, evidencias experimentales, epidemiológicas y clínicas han asociado la inflamación con el desarrollo de resistencia a la insulina (59).

A nivel molecular se han descrito diversas vías intracelulares que actúan como mediadores entre la respuesta inflamatoria asociada a la obesidad y la aparición de resistencia a la insulina. La vía del "nuclear factor kappa B" (NF- κ B), que a su vez es activado por I κ B quinasa (IKK), y la vía "c-Jun N-terminal kinase" (JNK) son activadas por múltiples factores alterados en situación de obesidad como adipoquinas inflamatorias, AGL, especies reactivas al oxígeno (ROS), etc. La vía de JNK actúa preferentemente a nivel de la fosforilación serínica de diversos residuos del sustrato 1 del receptor de insulina (ISR-1), lo que impide la activación del receptor por la insulina promoviendo resistencia a la insulina. A su vez NF- κ B promueve la expresión nuclear de numerosos genes cuyos productos inducen resistencia a la insulina (60) (fig 2)

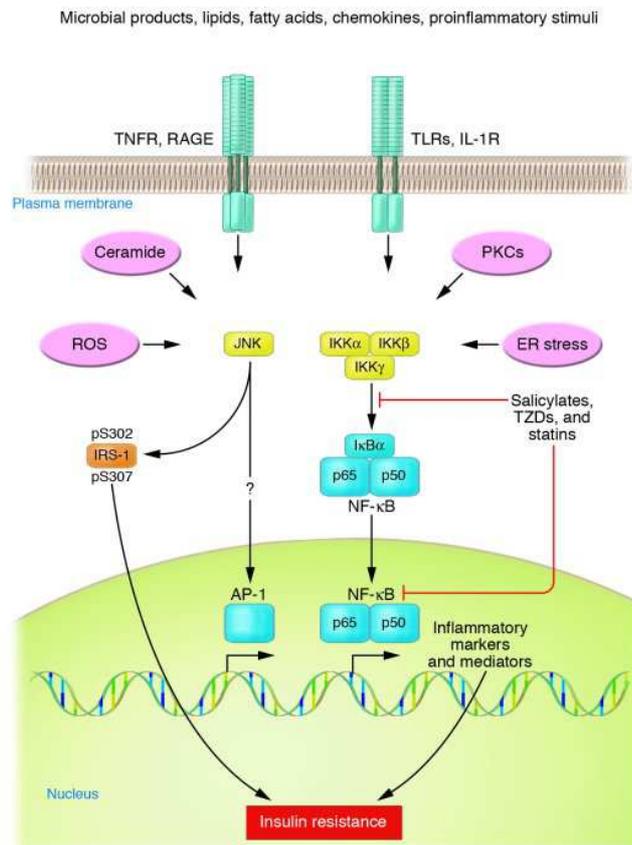


Figura 2: Potenciales mecanismos celulares de activación de la vía inflamatoria en adipocitos. Shoelson SE et al. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-1801

La obesidad es un importante factor de riesgo de desarrollo de DMG. Las mujeres con obesidad y obesidad mórbida presentan un riesgo de 4 a 8 veces mayor respectivamente de desarrollar DMG (61).

La gestación, por sí misma, también se caracteriza por ser una situación de inflamación de bajo grado y tanto la placenta como el tejido adiposo parecen ser en parte responsables de dicha situación (62).

La gestación se asocia con un aumento de la adiposidad materna, y la expansión del tejido adiposo se correlaciona con la secreción de adipocinas proinflamatorias (63). Desde fases iniciales de la gestación, pueden objetivarse en el tejido adiposo signos de inflamación a nivel molecular. La activación de la respuesta inmune del tejido adiposo precede a la aparición

de cambios fenotípicos maternos de composición corporal y a la aparición de resistencia a la insulina. Así pues, la inflamación fisiológica del tejido adiposo podría suponer un primer estímulo hacia el desarrollo de la resistencia a la insulina fisiológica que aparece más tarde durante la gestación (64).

La placenta también es un órgano endocrino que además de las hormonas placentarias es capaz de secretar adipoquinas. Existen marcadas homologías entre la expresión y regulación de adipoquinas y genes inflamatorios en la placenta a término y en el tejido adiposo. Estudios del perfil transcripcional han objetivado que la placenta expresa adipoquinas y genes inflamatorios que aparecen sobreexpresados en un ambiente hiperglucémico (65).

La secreción de adipoquinas por el tejido adiposo y por la placenta contribuye a la activación de vías inflamatorias específicas que pueden ser necesarias para la inducción de la resistencia a la insulina requerida para la progresión de la gestación normal (66).

Evidencias recientes sugieren que la inflamación contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y al desarrollo de intolerancia glucídica durante la gestación (67). En el primer trimestre se objetiva una desregulación de la respuesta inflamatoria en gestantes que luego desarrollarán DMG en forma de incremento de leucocitos, independiente del índice de masa corporal (IMC) (68). En este contexto, la concentración sérica de adipoquinas se ha asociado con el riesgo de desarrollo de DMG independientemente del IMC (69,70). A su vez, durante la gestación las mujeres con historia previa de DMG y aquellas que la desarrollarán, presentan niveles de marcadores inflamatorios más elevados independientes del IMC (71,72). En un subgrupo del estudio HAPO en el que participan gestantes con niveles de glucosa que no llegan al diagnóstico de DMG, también se objetiva que las adipoquinas inflamatorias se

relacionan positivamente con los niveles de glucosa independientemente del IMC y del nivel del péptido-C (73).

En los últimos años numerosos estudios prospectivos han hecho hincapié en el papel de las adipoquinas en la generación de la resistencia a la insulina durante la gestación.

Principales adipoquinas estudiadas:

Pro-inflamatorias:

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α): Es una citoquina proinflamatoria que además de regular numerosas funciones inmunológicas e inflamatorias, también está implicada en la resistencia a la insulina en músculo esquelético y tejido adiposo ya que altera la señalización de la insulina al incrementar la fosforilación serínica del IRS-1, lo que inhibe su unión al receptor de insulina (74). Durante la gestación se sintetiza por la placenta y es secretado a la circulación materna (50). Los niveles de TNF- α suelen estar elevados en DMG (55) y se han asociado de forma negativa con la sensibilidad insulina durante la gestación (50,75).

Leptina: Es una proteína producida casi exclusivamente por los adipocitos y secretada a la circulación por el tejido adiposo en proporción a las reservas lipídicas (76). Actúa a nivel de receptores hipotalámicos disminuyendo la ingesta energética y favoreciendo a nivel periférico la movilización energética (76). Los pacientes obesos presentan niveles circulantes elevados de leptina debido a una resistencia a su acción (77). La leptina es también una citoquina con actividad proinflamatoria capaz de estimular la producción de factores inflamatorios en diversos tipos celulares (78). Los niveles de leptina se incrementan al principio de la gestación y vuelven a la normalidad tras el parto, lo que se ha vinculado con una producción placentaria de esta

hormona (79). De hecho, diversos trabajos han demostrado que en la DMG existe una mayor expresión placentaria de leptina (80) asociada a una mayor expresión placentaria de otras citoquinas inflamatorias (interleucina-6 (IL-6), TNF- α) (81). A nivel clínico, diversos grupos han objetivado una relación positiva entre los niveles circulantes de leptina y la resistencia a la insulina durante la gestación (50,54,82). La DMG se asocia con una mayor expresión placentaria de leptina (83) relacionada con una mayor expresión placentaria de otras citoquinas inflamatorias (81).

Resistina: Es un proteína expresada fundamentalmente en monocitos y macrófagos y en menor grado en adipocitos (84), que en modelos animales induce resistencia a la insulina; pero su efecto en humanos es más controvertido (84,85).

Se expresa en placenta (86) y aumenta sus niveles en el tercer trimestre de gestación. En DMG se han objetivado resultados discordantes. Se han descrito niveles elevados (87-89), disminuidos (90) y sin variaciones (91,92), sin que se haya objetivado una relación con resistencia a la insulina (93,94).

Visfatina: Es una proteína que se expresa fundamentalmente en tejido adiposo visceral, que promueve la adipogénesis y tiene funciones insulinomiméticas (95). En la gestación, también es expresada por la placenta. Los trabajos que describen los niveles de visfatina en gestación son poco concluyentes, y si bien algunos autores los han encontrado aumentados (96,97) otros no han objetivado diferencias (98). En un estudio en gestantes con TNG se objetivó que los niveles en el primer trimestre se relacionaron de forma positiva con la sensibilidad a la insulina en el segundo trimestre. Los resultados con respecto a los niveles de visfatina en DMG también son

discordantes, habiéndose descrito niveles disminuidos (97,99,100) o aumentados (101,102).

Retinol binding protein-4 (RBP-4): Es una adipoquina relacionada con resistencia a la insulina y con inflamación (103,104) que también se expresa en placenta. Los datos sobre esta adipoquina en la gestación normal o en DMG tampoco son concluyentes. En la gestación normal, se han descrito niveles progresivamente elevados en paralelo con la disminución de la sensibilidad a la insulina (105) pero otros han hallado niveles progresivamente disminuidos a partir del segundo trimestre (106). En DMG se han objetivado niveles elevados (107,108), similares (109) o disminuidos (110,111) con respecto a la gestación normal.

Adipocyte fatty acid binding protein (AFABP): Es secretada por adipocitos, macrófagos y células endoteliales y sus niveles elevados circulantes se han propuesto como predictores de desarrollo de DM2 y de ECV (112). Se expresa en placenta y en la DMG se han objetivado niveles elevados (108,113).

Anti-inflamatorias:

Adiponectina: Es la adiponectina más abundante y se sintetiza exclusivamente en los adipocitos. Tiene propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas y de sensibilización a la insulina (114). Los adipocitos secretan la adiponectina en forma de multímeros: trímeros de bajo peso molecular (LMW), hexámeros de medio peso molecular (MMW) y oligómeros de alto peso molecular (HMW) que tienen diferentes funciones, pero las funciones de sensibilización a la insulina se han atribuido a HMW (115). En la gestación normal los niveles séricos de adiponectina disminuyen progresivamente (116,117) coincidiendo con un incremento del 25% de la

masa grasa desde el estado pregrávido hasta el final de la gestación (116). Dado que los niveles de adiponectina se correlacionan negativamente con el grado de adiposidad, se ha sugerido que la expansión del tejido adiposo es capaz de producir señales que disminuyen la secreción de adiponectina incluso en ausencia de obesidad, y el descenso de los niveles de adiponectina se ha relacionado con la disminución de la sensibilidad a la insulina (116). Otros estudios sin embargo no han sido capaces de objetivar dicha disminución (87,118). Al igual que ocurre fuera de la gestación, las mujeres embarazadas con sobrepeso presentan niveles disminuidos con respecto a mujeres con normopeso (119).

La diabetes gestacional se caracteriza por presentar niveles disminuidos de adiponectina (81,120) especialmente de HMW (115,121), y concentraciones bajas de adiponectina en el primer o inicios del segundo trimestre predicen la aparición de DMG independientemente del IMC (70,91). Además, se ha observado que los niveles de adiponectina están disminuidos postparto en mujeres con antecedentes de DMG (120).

A pesar de que los receptores de adiponectina se expresan de forma abundante en placenta, la expresión de adiponectina en la placenta todavía esta debatida. Si bien Chen et al (122) objetivaron que adiponectina se expresaba en placenta, estudios posteriores no la han detectado (123,124).

1.3. CRECIMIENTO FETAL

1.3.1 Factores implicados en el crecimiento fetal

El crecimiento fetal es un proceso complejo que está determinado por diversos componentes, entre los que hay que incluir factores genéticos,

endocrinos y el gradiente útero-placentario. Este último a su vez, está relacionado con el metabolismo y estado nutricional materno, el flujo sanguíneo útero-placentario y el gradiente de transferencia placentaria de nutrientes (125).

Cuando se realizan estimaciones de la composición corporal fetal se objetiva que el aumento de masa magra es relativamente constante a lo largo de la gestación. Por el contrario, el incremento de masa grasa ocurre sobretodo en el tercer trimestre y explica una parte importante de la variabilidad del peso neonatal. Es decir, aunque la masa grasa neonatal implica sólo de un 12 a un 14% del peso neonatal es responsable de un 46% de las diferencias en el peso neonatal (126).

Sparks, utilizando datos de autopsias y análisis bioquímicos de 169 fetos, describió un aumento comparable en la masa magra en fetos pequeños para su edad gestacional (PEG), adecuados para su edad gestacional (AEG) y grandes para su edad gestacional (GED) pero una variación considerable en el depósito de masa grasa, lo que le hizo suponer que el acúmulo de masa magra se ve regulado principalmente por factores genéticos, sugiriendo que el depósito de masa grasa puede ser más dependiente del ambiente metabólico intrauterino (127).

Se sabe que la DMG da lugar a alteraciones del ambiente metabólico fetoplacentario lo que puede afectar al crecimiento fetal, aumentando el riesgo de macrosomía (peso neonatal >4000 g) y de niños GED (peso >90th). En 1952, Pedersen hipotetizó que la hiperglucemia materna da lugar a un incremento del transporte de glucosa transplacentario lo que conlleva un aumento de producción de insulina fetal lo que provocaría un incremento del depósito de masa grasa aumentando el riesgo de macrosomía (128).

Apoyando esta teoría, disponemos de datos del estudio HAPO en donde se describe una asociación independiente de los niveles de glucosa materna con la hiperinsulinemia fetal, el peso y la adiposidad neonatal (25,129).

Posteriormente Freinkel propuso una modificación de la hipótesis de Pedersen al señalar que la DMG debe verse como una alteración de todo el metabolismo energético y que la secreción disminuida de insulina materna debería afectar a todos los combustibles insulino-dependientes dando lugar a un incremento del paso transplacentario no sólo de glucosa sino también de lípidos y aminoácidos, provocando un crecimiento de los tejidos sensibles a la insulina como el tejido adiposo. Así pues, aunque la glucosa es un componente importante del crecimiento fetal, el exceso de crecimiento fetal probablemente es consecuencia de múltiples factores nutricionales (130).

Diferentes estudios han sugerido la contribución de los lípidos maternos al crecimiento fetal. Así, los triglicéridos circulantes se correlacionan con el peso neonatal independientemente de los niveles de glucemia y de la obesidad materna (131). Los AGL maternos son incorporados a los lípidos fetales de forma excesiva en las gestantes con DMG (132) y se han relacionado con la masa grasa neonatal (133,134).

La obesidad materna comparte con la DMG una marcada resistencia a la insulina, y también es un factor relevante en el riesgo de macrosomía. La obesidad pregestacional por sí misma es un factor de riesgo significativo de obesidad fetal, aunque la coexistencia con DMG tiene efectos aditivos (135). En el estudio HAPO se puso de manifiesto que un IMC elevado se asocia de forma independiente con hiperinsulinemia fetal, peso y adiposidad neonatal (136,137). Black et al. observaron que entre los niños con GED, el 21.6% se atribuyen al sobrepeso-obesidad en gestantes sin DMG, el 23.6% a gestantes

con sobrepeso-obesidad y que además desarrollan DMG y por último sólo un 2.9% son atribuidos a gestantes con DMG en normopeso (138). En un estudio observacional realizado en nuestro medio, Ricart et al. evidenciaron que las gestantes con sobrepeso y obesidad tienen un mayor odds ratio (OR) de presentar un GED que las mujeres con normopeso, y que un 16.4% de macrosomas y un 13.4% de GED corresponden a mujeres con exceso de peso y TNG, mientras que sólo un 2.1% de macrosomas y menos del 1% de GED son atribuibles a mujeres con DMG y normopeso (139).

El incremento de peso durante la gestación se asocia positivamente con el peso neonatal en mujeres con TNG. Esta correlación se hace más potente cuanto menor es el peso materno pregestacional, y se pierde en mujeres con obesidad y DMG (140). Esto puede ser debido a que la obesidad pregestacional y la DMG son factores relacionados con una mayor resistencia a la insulina y ésta tiene una mayor relevancia en el crecimiento fetal y el peso neonatal.

1.3.1.1 Efectos de las adipoquinas sobre el crecimiento fetal

La insulina es uno de los reguladores del crecimiento fetal mejor conocidos, y dado que las adipoquinas tienen un efecto modulador sobre la acción de la insulina, estas han emergido como posible nexo de unión entre el metabolismo materno, resistencia a la insulina y crecimiento fetal (141). La presencia de niveles elevados de numerosas adipoquinas en sangre de cordón umbilical, en placenta y en tejidos fetales sugieren un posible rol en el crecimiento fetal (141).

En los últimos años se ha estudiado el papel de las principales adipoquinas en el crecimiento fetal. Sin embargo, los datos de los que se dispone no dejan de ser meramente asociativos, lo cual como ya es conocido, no implica

causalidad de forma concluyente. De forma breve vamos a comentar los datos más relevantes de la literatura:

Leptina: Los niveles de leptina en el cordón umbilical son significativamente inferiores que en sangre materna y, a diferencia de lo que ocurre con los niveles de leptina maternos en el momento del parto, se relacionan con el peso (142) y con la masa grasa neonatal tanto en la gestación normal como en la DMG (143). Esto sugiere que en el feto, al igual que en el niño y en el adulto, la masa grasa es el principal factor determinante de los niveles de leptina (144). Dado que la expresión de leptina en el tejido adiposo se regula por la insulina, alteraciones en el metabolismo intrauterino que conllevan modificaciones de la insulina circulante podrían afectar a la producción de leptina y mediar la influencia de insulina sobre el crecimiento fetal (145).

Adiponectina: Los niveles de adiponectina en cordón umbilical son 2 a 3 veces mayores que los niveles de la vida adulta y se correlacionan con el peso neonatal (146–149), por lo que se ha postulado un efecto regulatorio de adiponectina en el crecimiento fetal y en el metabolismo energético (87). Se han descrito niveles similares de adiponectina umbilical en los niños de madres con DMG y con NGT (150,151) y también se han objetivado niveles disminuidos en los niños de madres con DMG (87,152).

Resistina: La presencia de resistina en el cordón umbilical sugiere un rol potencial de esta adipoquina en el control de la homeostasis energética fetal que podría afectar al depósito intrauterino de tejido adiposo mediante una regulación negativa, evitando una excesiva proliferación del tejido adiposo (87). Los niveles se encuentran disminuidos en el cordón umbilical de niños GED de madres diabéticas (153).

Visfatina: Está presente en cordón umbilical en niveles elevados, probablemente de origen placentario (154,155). Se ha visto una relación positiva entre los niveles de visfatina umbilical y el peso neonatal (154,155).

RBP4: Los niveles en sangre de cordón umbilical se han asociado positivamente con el peso neonatal (156,157) y son más elevados en recién nacidos de madres con DMG (108).

AFABP: Los niveles umbilicales son inferiores en recién nacidos de madres con DMG con respecto a los hijos de madres con TNG (108).

1.3.2 Diferencias por sexos en el crecimiento fetal

El sexo es un factor que determina diferencias en la composición corporal ya en el momento del nacimiento. Las niñas recién nacidas presentan un mayor porcentaje de grasa corporal y un menor porcentaje de masa magra y de peso que los niños (158). También se han observado diferencias en los niveles de insulina en la sangre de cordón umbilical según el sexo. Las niñas presentan niveles más elevados de insulina que los niños a pesar de tener niveles similares de glucemia umbilical y un menor peso. Estos niveles superiores de insulina podrían ser debidos a una mayor adiposidad, y el hecho de tener niveles más elevados de insulina a pesar de un menor crecimiento sugiere que son más resistentes a la insulina (159).

Los factores determinantes de la composición corporal del recién nacido parece que inciden de forma distinta según el sexo. Así, en un estudio de 84 niños nacidos de madres con DMG se objetivó que el principal factor determinante del porcentaje de grasa corporal neonatal en los niños es la glucemia basal media materna del tercer trimestre, en cambio en las niñas el principal predictor fue el IMC pregestacional materno (160). En otro estudio

que incluyó 9270 recién nacidos se objetivó que el IMC pregestacional se asocia positivamente con el riesgo de macrosomía tanto en niños como en niñas. En cambio el hecho de presentar la madre DMG es predictor de macrosomía sólo en los niños (161). Este hecho puede ir asociado a una mayor vulnerabilidad de los niños a la influencia de factores externos (162).

1.3.3 Efectos a largo plazo del ambiente intrauterino

El ambiente metabólico intrauterino también tiene efectos a largo plazo en el feto en desarrollo. Según la hipótesis de la programación metabólica fetal, el desarrollo fetal intrauterino es un periodo vulnerable en el cual los cambios en el metabolismo intrauterino pueden afectar a la función metabólica del recién nacido a largo plazo mediante mecanismos fisiológicos y epigenéticos (163). Tanto los niños PEG como los GED presentan un mayor riesgo de desarrollo de síndrome metabólico obesidad y DM2 (164) en la edad adulta. Por lo tanto la asociación entre el peso al nacimiento y el desarrollo de diabetes y obesidad tiene forma de U (165).

Tanto la diabetes gestacional como la obesidad conllevan una alteración del ambiente metabólico intrauterino. La exposición prenatal a un ambiente materno diabético se asocia con un mayor riesgo de obesidad y diabetes (166–168). También se objetiva una relación inversa entre los niveles de glucosa materna durante la gestación y la sensibilidad a la insulina en los niños independientemente de la adiposidad materna (169). La obesidad materna pregestacional también se asocia con un incremento del riesgo de obesidad y con alteraciones del metabolismo glucídico y de la función de la célula β (170). Catalano et al. en un grupo de niños de madres con NGT y DMG, objetivaron que la obesidad pregestacional es el principal predictor de

obesidad infantil y que existe una correlación significativa entre porcentaje de masa grasa neonatal y durante el seguimiento (171).

Así pues, los niños expuestos a diabetes y obesidad materna durante la gestación tienen un riesgo incrementado de desarrollo de obesidad y de DM2 en edades precoces. A su vez las niñas expuestas presentan un alto riesgo de obesidad o de intolerancia a la glucosa o diabetes en la edad fértil, perpetuando el ciclo (172).

1.4. NUEVAS ADIPOQUINAS

1.4.1 Glicoproteína Zinc- α -2 (ZAG)

1.4.1.1 Definición

ZAG es una proteína soluble de 41 kD que forma parte de la familia de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (173). Se aisló inicialmente en plasma (174) y posteriormente se ha identificado en diferentes tejidos como hígado, próstata, glándula mamaria, riñón y pulmón (175). Se sobreexpresa en tumores como el de mama (176), próstata (177) y pulmón (178), por lo que se ha propuesto como un marcador tumoral. Recientemente se ha evidenciado la expresión génica de ZAG en tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratones y humanos (179,180), así como la expresión y secreción en adipocitos humanos (181,182), por lo que se la considera una adipoquina.

1.4.1.2 Funciones de ZAG

Dado que ZAG se expresa en múltiples tejidos se le han atribuido múltiples funciones entre las que incluyen: un papel en la respuesta inmune y

en la inhibición de la proliferación tumoral (183–185), inhibición de la proliferación de las células epiteliales renales asociada a la edad (186) e inhibición de producción de melanina por melanocitos normales y melanomas (187). También parece que está implicado en la movilidad del espermatozoide (188).

Papel de ZAG en el metabolismo lipídico y glucídico

La función más estudiada de ZAG es su papel en el metabolismo lipídico. ZAG fue inicialmente identificado como el factor movilizador de lípidos asociado con la pérdida de tejido adiposo en pacientes con caquexia asociada a cáncer (189,190). Las personas con caquexia presentan una expresión aumentada de ZAG en tejido adiposo y niveles séricos y urinarios elevados de ZAG que se correlacionan con la pérdida de peso (191).

El tratamiento con ZAG recombinante produce un aumento de lipólisis tanto en adipocitos de ratones (192,193) como humanos (191). En ratones se ha objetivado que ZAG aumenta la lipólisis en adipocitos a través de la activación de la adenil ciclasa para producir AMP cíclico (189). Esta elevación de AMP cíclico conlleva la activación de la proteinquinasa A (PKA) y posterior activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en un proceso similar al inducido por las hormonas lipolíticas (189). Este efecto lipolítico parece estar mediado a través del receptor adrenérgico β_3 , ya que se ve atenuado en presencia de un antagonista de este receptor (194). ZAG también es capaz de promover la utilización lipídica a través del incremento de la expresión de la proteína desacoplante-1 en el tejido adiposo marrón (195) y del aumento de la oxidación de ácidos grasos en ratones (196). Todo ello sugiere que ZAG incrementa tanto la movilización lipídica como la utilización de los lípidos.

La inactivación de ZAG en ratones provoca un aumento ponderal con ingesta de una dieta estándar y más marcado con una dieta alta en grasa, debido a una disminución significativa de la lipólisis en los adipocitos (197). En cambio, la sobreexpresión de ZAG en ratones obesos conlleva una reducción del peso y de la grasa epididimal sin cambios en la ingesta de comida, que coincide con un aumento en la expresión en tejido adiposo de la enzima lipolítica HSL y una disminución de la expresión de enzimas lipogénicas: ácido graso sintasa (FAS), acetil-CoA-carboxilasa-1 (ACC1) y diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (198). A su vez, la administración de ZAG induce una pérdida selectiva de grasa corporal tanto en ratones obesos como en ratones normales (189,192,195). Así pues, ZAG se ha sugerido como un posible gen candidato de la obesidad (199).

Además del efecto lipolítico también se ha evidenciado un efecto hipoglucemiante en ratones, ya que estimula la utilización de glucosa e incrementa la oxidación lipídica en varios tejidos murinos (196). El tratamiento con ZAG recombinante en ratones ob/ob diabéticos produce una disminución de los niveles de insulina y una mejoría en la respuesta al test de tolerancia a la glucosa gracias a un incremento del uso de glucosa. In vitro, tras unirse a receptores β_3 , produce un aumento de la captación de glucosa a nivel muscular, mediante un efecto similar a la insulina y de forma sinérgica a ésta (196). Al silenciar ZAG en adipocitos humanos se produce una marcada disminución en la expresión de IRS-1 y del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), lo que sugiere un efecto directo en la sensibilidad a la insulina en el adipocito (200). Además la expresión de ZAG en tejido adiposo visceral se correlaciona positivamente con la expresión de IRS-1 e IRS-2, lo

que refuerza la implicación de ZAG en mecanismos que regulan la resistencia a la insulina (201).

1.4.1.3 Regulación de la expresión de ZAG en el tejido adiposo

Aunque no está claramente establecida la regulación de la producción de ZAG en tejido adiposo, sí que se ha objetivado que diferentes factores son capaces de modular su expresión. Los glucocorticoides parece que la estimulan al objetivarse que la dexametasona incrementa la expresión de ZAG en adipocitos murinos 3T3-L1 y humanos (179,181), lo que sugiere que el efecto lipolítico de los corticoides puede estar en parte mediado por ZAG (202). El tratamiento con un agonista selectivo del receptor β_3 (BRL 3744) incrementa la expresión de ZAG en adipocitos murinos 3T3-L1 y humanos SGBS (179,181), mientras que el tratamiento con el antagonista del receptor β_3 (SR59230A) la inhibe, lo que sugiere que el sistema nervioso simpático está implicado en la regulación de su expresión. A su vez, el tratamiento con ZAG purificado también aumenta la expresión de ZAG en adipocitos 3T3-L1. El tratamiento con un sensibilizador a la insulina, como la rosiglitazona, y la administración de ZAG purificado son capaces de aumentar la expresión de ZAG en adipocitos, mientras que el tratamiento con TNF- α la disminuye de forma similar al efecto que tiene sobre la expresión de adiponectina (181).

1.4.1.4 ZAG en contexto de obesidad y resistencia a la insulina

En humanos, la expresión de ZAG se halla disminuida en tejido adiposo de obesos (200,203–206) y se relaciona de forma negativa con el IMC (182,200,205), y positiva con la expresión de genes lipolíticos: HSL en tejido adiposo visceral (206) y ATGL en tejido adiposo subcutáneo (201). Estas

observaciones sugieren un rol de ZAG en la modulación de la grasa corporal (202). En la mayoría de trabajos, la expresión de ZAG en tejido adiposo se relaciona de forma negativa con resistencia a la insulina medida mediante el índice de insulinoresistencia "Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance" (HOMA-IR) en varios estudios (182,198,201,206), si bien no todos coinciden con estos hallazgos (205). Recientemente otro estudio ha relacionado la expresión de ZAG positivamente con sensibilidad a la insulina independientemente del IMC (200). La reducción de expresión de ZAG conforme aumenta la resistencia a la insulina sugiere un efecto protector de ZAG en el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina (182), si bien no se puede descartar que se trate de una consecuencia asociada a la resistencia a la insulina, más que de un efecto causal en sí mismo.

ZAG podría ser un modulador de la acción de adiponectina, ya que existe una correlación positiva entre la expresión de ambas adipoquinas (182,201,206) así como entre la expresión de ZAG y los niveles circulantes de adiponectina (200,201). Además, la sobreexpresión de ZAG en adipocitos 3T3-L1 y la administración de ZAG recombinante a adipocitos humanos diferenciados produce un incremento de la expresión de adiponectina (182,199). En cambio, al silenciar ZAG en adipocitos humanos se objetiva una reducción de la expresión de adiponectina (200). Estos hallazgos sugieren que ZAG puede actuar de una forma paracrina estimulando la secreción de adiponectina por los adipocitos y de esta forma promover el efecto sensibilizador a la insulina de adiponectina (202), si bien no se disponen de estudios mecanísticos que puedan corroborar estas observaciones.

1.4.1.5 ZAG en contexto de gestación patológica

Sólo hay un estudio que ha valorado los niveles de ZAG en preeclampsia y objetiva niveles más elevados y no relacionados con parámetros del síndrome metabólico. Únicamente los niveles de creatinina son determinantes de los niveles de ZAG (207).

1.4.2 Sistema Activina A-Folistatina-Folistatin like 3

1.4.2.1 Activina A

1.4.2.1.1 Definición

Activina A es un miembro de la superfamilia de los "transforming growth factors β " (208) que se sintetiza en la mayoría de tejidos y tipos celulares y actúa como un factor de crecimiento y diferenciación celular (209,210).

Activina A se caracteriza como un dímero de subunidades βA unidas mediante puentes disulfuro con un peso molecular de 25 kDA. Activina A se une a un receptor tipo II con actividad serina/treonina quinasa ("Activin receptor type IIA" (ActRIIA) y "Activin receptor type IIB" (ActRIIB)). Este receptor a su vez fosforila a un receptor tipo I ("Activin receptor type IA", (ActRIA o ALK 2), "Activin receptor type IB" (ActRIB o ALK4) o "Activin receptor type IC (ALK7)) tras la unión del ligando. El receptor tipo I fosforila a los segundos mensajeros (Smad 2 y 3), que una vez activados forman un complejo con Smad 4 que se transloca al núcleo donde activa la transcripción génica (211,212) (fig 3). Sus receptores se identifican en los mismos tejidos en los que se secreta activina A lo que es más consistente con un mecanismo de acción autocrino/paracrino.

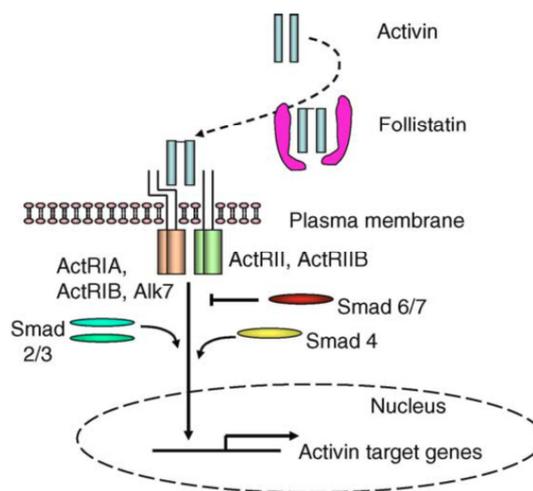


Figura 3: Representación esquemática de la vía de señalización del receptor de activina A. Cytokine Growth Factor Rev 2006;17:157-171

1.4.2.1.2 Regulación

A nivel intracelular se produce una regulación negativa a través de Smad inhibitorios 6 y 7 que bloquean la fosforilación de Smad 2 y 3 (211).

A nivel extracelular se produce la regulación mediante su unión a antagonistas solubles como folistatina y FSTL3 y modificadores de la unión a la membrana que inhiben la señalización de activina (213).

1.4.2.1.3 Funciones

Interviene en una gran variedad de eventos celulares incluyendo la regulación de apoptosis, diferenciación y proliferación de diferentes tipos celulares (214).

Papel en la reproducción

Su función más estudiada recae en este apartado. Así, activina A tiene un papel en la determinación de sexo gonadal, en la foliculogénesis, en la luteolisis y durante el desarrollo testicular parece determinar el tamaño y la función testicular en el adulto. Por último, estimula la síntesis de la hormona

folículoestimulante (FSH) a nivel hipofisario y también modula la la síntesis hipofisaria de la hormona luteinizante (LH) (213).

Papel en inflamación e inmunidad

Numerosos estudios han establecido que activina A aumenta en el suero y en varios tejidos en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (215). En pacientes con septicemia e hipertensión pulmonar los niveles elevados de activina A se relacionan con la severidad de la inflamación y pueden ser predictivos de la evolución clínica (216). Además, la expresión de activina A está elevada en fibrosis y durante la reparación de heridas traumáticas, o en caso de una inflamación inducida en piel, hígado, riñón y pulmones (217).

Los efectos de activina A en la respuesta inflamatoria parecen ser complejos. Diferentes estudios usando diferentes líneas celulares de monocitos/macrófagos indican que activina A tiene tanto una actividad proinflamatoria como reguladora de la inflamación. Estimula la respuesta inflamatoria y la secreción de mediadores inflamatorios en células no activadas, pero inhibe la respuesta inflamatoria una vez las células han sido activadas (215).

Papel en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico

Activina A se ha identificado en islotes pancreáticos murinos y humanos junto con sus receptores y su proteína reguladora FST (218,219), lo que sugiere que puede tener un importante papel en la función de los islotes en el adulto además del que tiene en el desarrollo embrionario del tejido pancreático (220).

In vitro aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos (221). Además, estimula la expresión de genes característicos de la célula β madura, lo que sugiere que puede jugar un papel en la diferenciación

a célula β (222). También induce la diferenciación de células pancreáticas exocrinas (AR 42J) en células secretoras de insulina (223) y potencia la diferenciación de células fetales del epitelio pancreático en células β (224).

A nivel hepático activina A inhibe la proliferación de hepatocitos (225) y estimula la glucogenolisis en hepatocitos de ratas de forma dosis dependiente (226). También regula la neoglucogénesis al estimular la expresión de glucosa-6-fosfato, que es una enzima fundamental en dicho proceso (227). Por último, a nivel de músculo esquelético, la sobreexpresión de activina A en el músculo tibial anterior provoca una atrofia muscular en ratas (228). Así pues, activina A parece ser un regulador autocrino negativo de la miogénesis (229). Al disminuir la masa hepática y muscular puede intervenir en la reducción de la sensibilidad a la insulina (230).

Activina A se expresa en preadipocitos humanos y sus niveles se incrementan por factores secretados por los macrófagos del tejido adiposo. El tratamiento con activina A promueve la proliferación e inhibe la diferenciación de progenitores de adipocitos humanos (231). También inhibe la diferenciación de preadipocitos murinos 3T3-L1 y reduce la expresión de "peroxisome proliferator-activated receptor gamma" (PPAR γ), regulador de la adipogénesis (232). El tejido adiposo en individuos obesos se caracteriza por la infiltración por macrófagos proinflamatorios y esta inflamación, como ya hemos visto, se relaciona con resistencia a la insulina. Activina A se ha identificado como un mediador de la respuesta inflamatoria y es capaz de estimular la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos (233). También estimula la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y de IL-6 por progenitores de adipocitos humanos (231). Así pues, el

incremento de actividad de activina A puede favorecer un estado inflamatorio y facilitar el desarrollo de resistencia a la insulina (234).

1.4.2.2 Folistatina (FST)

1.4.2.2.1 Definición

Folistatina es una glicoproteína extracelular de 35 kDA que se une a activina A con una elevada afinidad y de forma casi irreversible, y neutraliza la mayoría de sus acciones biológicas (235). Dos moléculas de FST se unen a cada dímero de activina A obstruyendo su unión al receptor tipo II (236).

Folistatina fue originalmente identificada como una proteína gonadal que era capaz de inhibir la secreción de la hormona foliculoestimulante (FSH) (237). Posteriormente se demostró que ello era debido a su unión con activina lo que conlleva la neutralización de su bioactividad (238). Folistatina se produce en la mayoría de tejidos donde se produce activina A, y parece que actúa de forma autocrina/paracrina en ellos para regular la acción de activina A y de otros miembros de la familia de TGF- β (239).

Existen 3 isómeros de folistatina. El isómero más pequeño FST288 tiene una elevada afinidad por los proteoglicanos heparin-sulfato localizados en la superficie celular, lo que permite a FST288 localizarse en la parte externa de la membrana plasmática y prevenir la acción autocrina de activina A, así como, la acción paracrina o endocrina de activina A procedente de otras células o tejidos. En cambio el isómero de mayor tamaño, FST315, tiene una capacidad muy escasa para unirse a la superficie celular. La isoforma intermedia, FST303, procede de la fragmentación proteolítica de FST315 y tiene una capacidad intermedia para unirse a la superficie celular. Esta diferente capacidad de las isoformas de folistatina para unirse a la superficie

celular sugiere que cada una de las isoformas tiene una actividad biológica distinta y una diferente localización corporal. De hecho, la isoforma FST315 es la predominante a nivel sérico. Casi toda la folistatina circulante está unida a activina A, mientras que la isoforma FST303 se localiza principalmente en los extractos y fluidos foliculares (239).

1.4.2.2.2 Funciones

A través de su acción de bloqueo de la actividad de activina A y de la de otros miembros de la superfamilia de TGF β , folistatina interviene en múltiples sistemas.

Los ratones FST-ko son viables pero mueren a pocas horas del nacimiento, situación que indica la importancia de folistatina durante el desarrollo embrionario. En cambio los ratones con sobreexpresión de folistatina sobreviven pero presentan alteraciones gonadales: testículos pequeños con degeneración de túbulos seminíferos y en los fetos femeninos subdesarrollo de ovarios y útero (240).

Papel en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico

La administración de folistatina en un modelo animal de regeneración pancreática inhibe la diferenciación de las células pancreáticas ductales en células β (241).

Se sintetiza y secreta por tejido adiposo humano. El tratamiento con folistatina recombinante promueve la diferenciación de progenitores de adipocitos (242).

A nivel muscular estimula la miogénesis (229).

Papel en inflamación

Folistatina se incrementa por el estrés quirúrgico y parece ser un componente de la reacción de fase aguda (243). Está elevada a nivel sérico en pacientes con septicemia (244) y se incrementa en la circulación varias horas después de la aparición de activina A en ratones y ovejas tratadas con LPS (243). Parece que la elevación de folistatina es en parte responsable del aclaramiento de activina A de la circulación.

Reduciendo la actividad de activina A, a través de la administración de folistatina o mediante el aumento de su expresión, se disminuye la severidad de la respuesta inflamatoria y fibrótica (215).

1.4.2.3 Folistatin like 3 (FSTL3)

1.4.2.3.1 Definición

FSTL3, también conocida como gen relacionado con FST (del inglés: FST-related gene), comparte una sustancial homología estructural y funcional con folistatina. Se clonó de una célula B de una línea de leucemia y se evidenció que, al igual que folistatina, era una glicoproteína que se unía con una elevada afinidad a activina A neutralizando sus acciones (245). FSTL3 no se une a los proteoglicanos de la superficie celular en condiciones normales por lo que es un débil antagonista de la actividad autocrina de activina A, mientras que es sólo un poco menos potente que folistatina en neutralizar su actividad endocrina/paracrina (239). Aunque folistatina y FSTL3 se localizan en una gran variedad de tejidos humanos adultos y fetales, los sitios donde se expresan en mayor medida son distintos. FSTL3 se expresa sobretudo en placenta, testículos y tejido cardiovascular mientras que folistatina se expresa principalmente en ovario y en hipófisis (245).

1.4.2.3.2 Funciones

Para investigar las acciones fisiológicas de FSTL3 se crearon ratones FSTL3-KO y se observó que presentaban islotes pancreáticos aumentados, efecto de la hiperplasia de la masa de células β , que eran más tolerantes a la glucosa, más sensibles a la insulina y discretamente más hiperinsulinémicos que los ratones salvajes. También presentaban un aumento de la neoglucogénesis hepática y de la esteatosis hepática e hipertensión y menores niveles de grasa visceral (227).

1.4.2.4 Sistema Activina A-Folistatina en contexto de resistencia a la insulina

Recientemente se ha implicado a este sistema en la homeostasis de la glucosa. Así, se han objetivado niveles séricos de activina A sin modificaciones en pacientes con DM2 (246,247), pero que se asocian positivamente con resistencia a la insulina medida por HOMA-IR (246) y se relacionan de forma inversa con el metabolismo glucídico cardiaco (247). En cambio, otros estudios han objetivado niveles elevados de activina A en pacientes con DM2 y con alteración glucídica, que es más marcada en aquellos los que coexiste cardiopatía isquémica (248,249). Activina A podría tener un efecto beneficioso en la aterogénesis, en base a su acción antiinflamatoria en células mononucleares previamente activadas en pacientes con enfermedad coronaria (250). En este sentido, se ha descrito que activina A inhibe la conversión de macrófagos en células espumosas en la placa arterioesclerótica mientras que folistatina la favorece y potencia la acumulación de ésteres de colesterol en la misma (251).

En pacientes con DM2 los niveles séricos de folistatina se han encontrado normales (246), disminuidos (248) o elevados y relacionados con los niveles de glucosa y de HbA1c (252). A nivel de tejido adiposo, la expresión de folistatina se encuentra disminuida en mujeres obesas asociada a resistencia a la insulina (242).

Paradójicamente, los niveles de folistatina se encuentran elevados en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) (253–256) independientemente del IMC (256) y se relacionan positivamente con niveles de proteína C reactiva ultrasensible (255) y con secreción de insulina (256). En cambio, se han descrito niveles de activina A sin modificaciones (253,256), o disminuidos (254)

Por último, en esteatosis hepática se han objetivado niveles elevados de activina A y de folistatina. En los estudios in vitro se ha observado que la activina A participa en el metabolismo de ácidos grasos y puede tener un papel en el desarrollo de fibrosis hepática (257).

En resumen, los estudios realizados hasta ahora, no han sido capaces de vincular los niveles circulantes de ambas hormonas con la DM2 o su patología asociada como la resistencia a la insulina o la esteatosis hepática.

1.4.2.5 Sistema Activina A-Folistatina-FSTL3 en gestación normal y patológica

Durante la gestación, los niveles de activina A y folistatina se incrementan de forma paralela y marcada lo que sugiere que tienen un papel fisiológico en ella (258). La precipitada caída de los niveles de activina A y de folistatina en el suero materno tras el parto hace pensar que la principal fuente de los niveles elevados de ambas durante la gestación es feto-placentaria(259). La

placenta y las membranas fetales producen cantidades considerables de activina A, de folistatina y FSTL3 (260–262).

En diferentes patologías de la gestación se ha observado una modificación de los niveles séricos (259). En preeclampsia y en crecimiento intrauterino retardado (CIR) los niveles de activina A, folistatina y FSTL3 se han visto incrementados (259,263,264). En DMG los resultados publicados son escasos y discordantes. Los niveles séricos de FSTL3 al final del primer trimestre en mujeres que desarrollan posteriormente DMG se han encontrado disminuidos (265) o sin modificaciones (266). Un solo estudio ha valorado en la gestación a término los niveles séricos de FSTL3 y su expresión placentaria mostrando niveles disminuidos en gestantes con DMG (267). Por el contrario, los niveles de activina A se han visto elevados en DMG (268,269) lo que podría sugerir un posible efecto compensatorio de activina A promoviendo un aumento de secreción de insulina en contexto de hiperglucemia (265). Sin embargo, debido a la interrelación entre la función de activina A y sus inhibidores folistatina y FSTL3, el estudio aislado de estas adipoquinas tiene un valor limitado. Para poder conocer mejor la función del eje activina-A-folistatina-FSTL3 en la DMG sería recomendable valorar de forma simultánea las tres adipoquinas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

2. HIPÓTESIS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Dado que:

1. Existen datos que relacionan a las proteínas ZAG y el sistema activina A-folistatina-FSTL3 con parámetros relacionados con resistencia a la insulina.
2. La mayoría de estos estudios se han realizado fuera de la gestación, en pacientes con obesidad, DM2, ECV o SOP, sin que existan datos en mujeres gestantes con alteración del metabolismo glucídico.
3. La gestación es un periodo de incremento fisiológico de la resistencia a la insulina.
4. Tanto ZAG como el sistema activina A-folistatina-FSTL3 pueden tener un papel sobre el metabolismo lipídico y la regulación de la adipogénesis, elementos esenciales tanto en la evolución de la gestación como sobre el desarrollo fetal.
5. Adiponectina tiene un papel insulinosensibilizador y los niveles de adiponectina en cordón umbilical se incrementan progresivamente desde la mitad hasta el final de la gestación, lo que sugiere que juega un rol en el crecimiento fetal.

En base a esto, pensamos que:

Estas adipoquinas pueden jugar un rol importante en la homeostasis de la glucosa durante el embarazo. Su potencial papel sobre la resistencia a la insulina y el metabolismo lipídico podría afectar al desarrollo antropométrico fetal, especialmente en mujeres afectas de DMG.

3. OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Objetivos principales:

Evaluar el papel de las proteínas circulantes ZAG, activina A, folistatina y FSTL3 en el contexto de la gestación sana y en pacientes con DMG, sobre la resistencia a la insulina y la antropometría fetal.

Evaluar el rol de los multímeros de adiponectina en el cordón umbilical en el contexto de gestación sana, sobre el crecimiento fetal.

Para responder a estas preguntas, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar si los niveles séricos de ZAG en gestantes con DMG están alterados con respecto a gestantes con TNG y su relación con parámetros metabólicos maternos y con concentraciones séricas de adiponectina.
2. Evaluar los niveles de ZAG en la sangre del cordón, su relación con los niveles maternos y su posible papel en el peso y la composición corporal neonatal.
3. Analizar las concentraciones séricas de activina A, folistatina y FSTL3 en gestantes con DMG y con TNG y estudiar su relación con parámetros metabólicos maternos.

4. Evaluar la asociación de las concentraciones séricas maternas de activina A, folistatina y FSTL3 con parámetros ecográficos de crecimiento fetal y estimaciones de adiposidad neonatal.

5. Analizar la relación de los niveles umbilicales de los multímeros de adiponectina con estimaciones de velocidad de crecimiento fetal y de adiposidad neonatal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

4.1 SUJETOS DE ESTUDIO

En los tres trabajos que se presentan, se han incluido tres cohortes de pacientes que incluyen las siguientes características: mujeres gestantes entre las 27 y las 30 semanas de gestación, reclutadas el día de realización del test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) de 100 g y de 3 horas de duración llevado a cabo en el Hospital Universitari Joan XXIII, para cribado de DMG. El TTOG se interpretó de acuerdo a los criterios de la NDDG (27), por lo que las gestantes con 2 valores o más superiores a los criterios diagnósticos establecidos fueron diagnosticadas de DMG, las gestantes con todos los valores inferiores a los criterios diagnósticos marcados obtuvieron la clasificación de TNG y las gestantes con 1 solo valor por encima fueron diagnosticadas de intolerancia a la glucosa.

En el primer estudio se incluyeron 207 gestantes, 130 con TNG y 77 con DMG; en el segundo, 207 gestantes, 129 con TNG y 78 con DMG y en el tercero 96 gestantes con TNG. Todas ellas cumplían los siguientes criterios de inclusión: 1) raza blanca, 2) gestación única, 3) edad igual o superior a los 18 años, 4) datación adecuada de la gestación confirmada ecográficamente antes de las 20 semanas de gestación, 5) ausencia de otra afección materna concomitante que pudiera afectar al crecimiento fetal, 6) ausencia de anomalía fetal identificada en el momento del nacimiento, 7) al menos dos exploraciones ecográficas, una primera el momento del reclutamiento y otra entre las semanas 34 a 36 (197 mujeres del 2º estudio y todas las del 3º estudio), 8) diagnóstico de TNG o DMG antes de la semana 30 de gestación. 9) sangre de cordón recogida en el momento del parto (todas las mujeres del 1º y 3º estudio), 10) antropometría neonatal evaluada en las 48 horas siguientes al parto. Los criterios de exclusión fueron: 1) presencia de

enfermedad grave crónica o aguda o complicaciones obstétricas sobreañadidas, 2) tratamientos farmacológicos concomitantes que pudieran alterar la sensibilidad a la insulina o influir en la capacidad de secreción de la célula β pancreática, 3) anomalías cromosómicas o estructurales fetales graves, 4) las gestantes con un solo punto alterado en la TTOG fueron excluidas.

A todas las pacientes se les recogió el correspondiente consentimiento informado para participar en una colección de gestantes del biobanco del Hospital Universitari Joan XXIII, con la correspondiente aprobación por parte del Comité Ético de Investigación de nuestro centro.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Diseño de los estudios

En los dos primeros trabajos se diseñó un estudio prospectivo observacional de casos y controles (DMG y TNG) y en el tercer trabajo se diseñó un estudio prospectivo analítico observacional de los neonatos de madres con TNG divididos según el sexo. Los tres estudios fueron llevados a cabo en el Hospital Universitari Joan XXIII. Todas las mujeres incluidas fueron monitorizadas desde el momento de la inclusión hasta el parto. El día de la realización del TTOG y antes de la administración de glucosa se les extrajo 20 mililitros de sangre de la vena antecubital que fueron procesadas en la unidad de biobank de nuestro centro y se guardaron alícuotas de suero, plasma y ADN a -80° C.

El control metabólico de las gestantes con DMG se ajustó al protocolo de seguimiento del centro, de acuerdo con las recomendaciones de la guía asistencial española para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus

y gestación (34). Siguieron una dieta individualizada con un 40% de hidratos de carbono y se les instruyó para el autocontrol de los niveles de glucosa 6 veces al día (en ayunas y 1 hora posprandial) diariamente. Se recomendó la insulinización en caso de presentar valores de glucosa en ayunas repetidamente ≥ 95 mg/dl y/o valores de glucosa posprandiales ≥ 140 mg/dl. De acuerdo con estos criterios un 38% de las pacientes con DMG precisaron tratamiento con insulina.

4.2.2 Cálculo de la muestra

El cálculo de la muestra de los dos primeros estudios se hizo en base a los niveles de ZAG y de activina A, aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β de 0,2 y se objetivó que para detectar una diferencia de ≥ 4 y $\geq 1,5$ unidades respectivamente se precisan entre 128-131 pacientes con NGT y 77-78 pacientes con DMG.

Para el tercer estudio el cálculo de la muestra se hizo en base a la asociación entre niveles de adiponectina en sangre de cordón y la suma de pliegues cutáneos, como medida del grado de adiposidad del neonato. Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral se estimó que se precisaban 95 neonatos teniendo en cuenta un coeficiente de relación de 0.3 y asumiendo una tasa de pérdidas del seguimiento del 10%.

4.2.3 Datos clínicos

A todas las pacientes incluidas se les recogieron los datos clínicos y demográficos mediante un cuestionario prediseñado focalizado en la historia

clínica médica y obstétrica, referente a gestaciones previas y a la gestación actual, con especial atención a factores de riesgo de DMG.

En todas las gestantes se determinó la talla y el peso, mediante una báscula de 0,1 kg de precisión (SECA ALPHA modelo 770) y un tallímetro de precisión 0,1 cm (ANA SAYOL), y la tensión arterial sistólica (TAS) y diastólica (PAD) en mmHg, el día de la inclusión en el estudio y en las visitas realizadas hasta el final de la gestación. Tras el parto se recogieron los datos referentes a la ganancia de peso durante la gestación, la edad gestacional al parto y los valores de la medición antropométrica neonatal.

El IMC pregestacional se calculó mediante la fórmula: peso pregestacional en kg/talla en m², el incremento de IMC fue calculado por la fórmula: IMC final – IMC pregestacional.

4.2.4 Determinaciones analíticas

El TTOG de 100 g se realizó por la mañana tras un ayuno de 12 horas. Se obtuvieron muestras de sangre venosa en el momento basal y a los 60, 120 y 180 minutos tras la administración de 100 g de una solución oral de glucosa. En la muestra venosa basal además de los niveles de glucosa, se determinaron los niveles de colesterol total, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) y de triglicéridos mediante un autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens AG, Munich, Alemania) usando los métodos enzimáticos estándar. La insulina y el péptido C en ayunas fueron determinados mediante inmunoensayo en un Sistema Centaur ADVIA (Siemens AG, Munich, Alemania). Este aparato muestra una reactividad cruzada inferior al 0,1% para proinsulina intacta humana y la forma de la primera división circulante (Des 31,32). El índice HOMA-IR fue calculado mediante la fórmula: glucosa

plasmática en ayunas (mmol/L) x insulina plasmática en ayunas ($\mu\text{U/ml}$)/22,5 (270).

Las concentraciones de ZAG en suero materno y en sangre de cordón fueron medidas utilizando un ELISA (Bio-Vendor Laboratory Medicine Inc., Palackeho, República Checa). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron inferiores a 5% y 6,6% respectivamente y la sensibilidad del ensayo fue de 0,673 ng/ml.

Las concentraciones de activina A en suero materno se determinaron mediante ELISA (R&d Systems Europe Ltd. Abingdon, Reino Unido) con una sensibilidad de 3,67 pg/ml y con coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 4,2% y 5,8% respectivamente. Los niveles séricos de folistatina fueron medidos mediante ELISA (R&d Systems Europe Ltd. Abingdon, Reino Unido) con una sensibilidad de 29 pg/ml y con coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 2,3% y 8% respectivamente. Las concentraciones séricas de FSTL3 fueron determinadas mediante ELISA (R&d Systems Europe Ltd. Abingdon, Reino Unido) con una sensibilidad de 3,68 pg/ml y con coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 2,4% y 5,3% respectivamente.

Los niveles de adiponectina y de los multímeros de adiponectina de alto peso molecular (HMW), medio peso molecular (MMW) y bajo peso molecular (LMW) en suero materno y en sangre de cordón fueron medidos mediante ELISA (Multimeric Adiponectin ELISA Kit, Bühlmann, Schönenbuch, Suiza) con una sensibilidad de 0,08 ng/ml y con coeficientes de variación intra e inter-ensayo <15%. Se calculó la relación HMW/adiponectina total (S_A) en suero materno y en sangre de cordón.

4.2.5 Evaluación ecográfica

Se realizó un seguimiento ecográfico de los fetos mediante dos estudios biométricos seriados. Una obstetra experimentada realizó todas las mediciones ecográficas mediante un ecógrafo Voluson 730 Expert (General Electrics Medical System, Austria) con una sonda abdominal mecánica híbrida y de matriz curvada (RAB 4-8L). La estimación del peso fetal (FWE) se calculó aproximadamente en la semana 28 (rango de 27-30) (FWE_{28}) y en la semana 35 (rango de 34-36) (FWE_{35}), a través de las mediciones del diámetro biparietal, circunferencia cefálica, circunferencia abdominal y longitud femoral fetal, aplicando la fórmula de Hadlock et al. (271). La estimación del volumen fraccional del muslo (FTVE) también se calculó aproximadamente en la semana 28 (rango de 27-30) ($FTVE_{28}$) y en la semana 35 (rango de 34-36) ($FTVE_{35}$) mediante la metodología de Lee et al. (272). FWE y FTVE se transformaron en scores de desviación estándar (SDS) utilizando referencias del crecimiento fetal en la población española específicas para cada sexo (273) y tablas publicadas por Lee et al. (272) respectivamente. Además, se calculó la velocidad de crecimiento fetal en el periodo temprano del tercer trimestre (FGV_E) mediante regresión lineal entre las dos mediciones de FWE (274) y la velocidad de crecimiento en la parte final del tercer trimestre (FGV_L) mediante regresión lineal entre FWE_{35} y el peso neonatal al nacimiento. Las dos medidas de velocidad de crecimiento se expresaron como incremento de SDS (ΔSDS) por semana.

4.2.6 Evaluación antropométrica neonatal

Los neonatos fueron evaluados en las primeras 48 horas de vida. Todos ellos fueron tallados mediante un estadiómetro de precisión 0,1 cm (SECA

232) y pesados mediante una báscula electrónica de 0,01 Kg de precisión. A un subgrupo de 165 niños de del 1^{er} y 2^o estudio y a todos los del 3^{er} estudio se les realizó una evaluación antropométrica más completa para estimar la composición corporal neonatal, que incluye, además de la talla y el peso, la determinación de: la longitud cráneo-rabadilla, la longitud talón rodilla mediante un estadiómetro de Holtain modificado (50 cm de largo, precisión de 1 mm, por encargo a Chasmors Ltd©. London, Reino Unido), el perímetro cefálico, torácico, abdominal, de la pierna, de la pantorrilla y del brazo mediante una cinta métrica inextensible reutilizable con una precisión de 0,1 cm (Lasso-O, Harlow printing Ltd, Reino Unido) y los pliegues cutáneos tricípital, bicipital, subescapular y suprailíaco mediante un plicómetro de Holtain (Holtain Ltd, Crymych, Reino Unido).

El porcentaje de masa grasa (PFM) fue calculado mediante la fórmula validada por Catalano (275) en la que $\text{masa grasa neonatal} = 0,39055 \times (\text{peso al nacimiento}) + 0,0453 \times (\text{pliegue suprailíaco}) - 0,03237 \times (\text{talla}) + 0,54657$. La cantidad de masa grasa fue calculada por la fórmula de Dauncey (276). Esta fórmula utiliza las medidas de los pliegues cutáneos, las circunferencias corporales y la longitud de las extremidades para calcular el contenido corporal de total de grasa. La masa libre de grasa se obtiene de sustraer la masa grasa del peso neonatal. También se calculó la suma de los cuatro pliegues cutáneos (subescapular, tricípital, bicipital y suprailíaco) que es una estimación del tejido graso subcutáneo y que ha demostrado tener buena correlación con la cantidad de masa grasa en neonatos (277).

4.2.7 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 13.0 (SPSS, Chicago, IL) para todos los cálculos estadísticos. Para verificar la distribución normal de las variables cuantitativas se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que presentaban una distribución normal se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). Las que no la presentaban se expresaron como medianas (rango intercuartil 25-75). Las variables categóricas se expresaron de forma numérica y en forma de porcentajes. Para realizar las comparaciones entre grupos del valor medio de variables continuas con distribución normal se utilizó el test t de Student. En caso de variables que no seguían una distribución normal se utilizó el test U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se compararon con el test de la χ^2 . Las correlaciones bivariadas entre las variables cuantitativas se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson en caso de variables con distribución normal y mediante el coeficiente de correlación de Spearman en caso de variables con distribución no normal. Para evaluar la independencia de las asociaciones de ZAG materno y de cordón umbilical, de activina A, folistatina, de FSTL3 y de los multímeros de adiponectina en suero materno y en cordón umbilical con variables clínicas, analíticas y/o ecográficas e identificar los mejores determinantes del peso neonatal, el porcentaje de grasa neonatal, la suma de pliegues cutáneos, la estimación del peso fetal, el volumen fraccional del muslo y la velocidad de crecimiento fetal se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Objetivos 1 y 2:

5.1 Primer estudio

Zinc- α 2-Glycoprotein is unrelated to Gestational Diabetes: anthropometric and metabolic determinants in pregnant women and their offspring

Silvia Naf, Xavier Escote, Rosa Elena Yañez, Mónica Ballesteros, Inmaculada Simón, Pilar Gil, Ana Megia, Joan Vendrell

PLoS ONE. 2012; 7: e47601

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Zinc- α 2-Glycoprotein Is Unrelated to Gestational Diabetes: Anthropometric and Metabolic Determinants in Pregnant Women and Their Offspring

Silvia Náf^{1,2*}, Xavier Escote^{1,2}, Rosa Elena Yañez^{1,2}, Mónica Ballesteros³, Inmaculada Simón^{1,2}, Pilar Gil^{1,2}, Ana Megia^{1,2}, Joan Vendrell^{1,2}

1 Endocrinology and Diabetes Unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Obstetrics and Gynecology Service, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Abstract

Context: Zinc- α 2-Glycoprotein (ZAG) is an adipokine with lipolytic action and is positively associated with adiponectin in adipose tissue. We hypothesize that ZAG may be related with hydrocarbonate metabolism disturbances observed in gestational diabetes mellitus (GDM).

Objective: The aim of this study was to analyze serum ZAG concentration and its relationship with carbohydrate metabolism in pregnant women and its influence on fetal growth.

Design: 207 pregnant women (130 with normal glucose tolerance (NGT) and 77 with GDM) recruited in the early third trimester and their offspring were studied. Cord blood was obtained at delivery and neonatal anthropometry was assessed in the first 48 hours. ZAG was determined in maternal serum and cord blood.

Results: ZAG concentration was lower in cord blood than in maternal serum, but similar concentration was observed in NGT and GDM pregnant women. Also similar levels were found between offspring of NGT and GDM women. In the bivariate analysis, maternal ZAG (mZAG) was positively correlated with adiponectin and HDL cholesterol, and negatively correlated with insulin and triglyceride concentrations, and HOMA index. On the other hand, cord blood ZAG (cbZAG) was positively correlated with fat-free mass, birth weight and gestational age at delivery. After adjusting for confounding variables, gestational age at delivery and HDL cholesterol emerged as the sole determinants of cord blood ZAG and maternal ZAG concentrations, respectively.

Conclusion: mZAG was not associated with glucose metabolism during pregnancy. ZAG concentration was lower in cord blood compared with maternal serum. cbZAG was independently correlated with gestational age at delivery, suggesting a role during the accelerated fetal growth during latter pregnancy.

Citation: Náf S, Escote X, Yañez RE, Ballesteros M, Simón I, et al. (2012) Zinc- α 2-Glycoprotein Is Unrelated to Gestational Diabetes: Anthropometric and Metabolic Determinants in Pregnant Women and Their Offspring. PLoS ONE 7(12): e47601. doi:10.1371/journal.pone.0047601

Editor: Suresh Yenugu, University of Hyderabad, India

Received: April 10, 2012; **Accepted:** September 17, 2012; **Published:** December 18, 2012

Copyright: © 2012 Náf et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: REY is supported by a fellowship Ajut predoctoral per a la contractació de personal investigador novell (Exp.2010 FIB01004) from Universitat Rovira i Virgili. AM is grateful to the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) for the 2010 grant: "Programa d'ajuts per el desenvolupament de la recerca". CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (CB07708/0012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: snafco@hotmail.com

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Late pregnancy is characterized by an insulin resistance state which involves changes in lipid and glucose metabolism [1] to meet the increased metabolic demands of the fetus. The decrease in insulin sensitivity is offset by an increase of pancreatic insulin secretion, but when this mechanism is insufficient, gestational diabetes mellitus (GDM) develops.

Adipose tissue has a recognized capacity to secrete several hormones called adipokines, which modulate the action of insulin in different tissues, including adipocytes themselves [2]. In

addition, some of these proteins have been involved in the regulatory process of energy homeostasis and weight control. Nowadays, there is growing interest in the role of these adipokines as contributors to the metabolic abnormalities both in the mother and the fetus, observed in the GDM context. Thus, lower levels of total adiponectin [3–5] and its multimeric forms [4–6] have been reported in GDM. More recently, up-regulation of adipocyte fatty acid-binding protein and of retinol-binding protein 4 in mothers has been related with GDM insulin-resistant condition [7].

Zinc- α 2-Glycoprotein (ZAG) is a soluble protein of 41 kD identified in secretory epithelial cells from different organs such as

the liver, prostate, breast, kidney and lung [8]. Recently, ZAG gene and protein expression have also been detected in human visceral and subcutaneous adipose tissues [9]. In turn, mature adipocytes may synthesize and secrete this protein suggesting a possible role in adipose tissue metabolism in the context of obesity and insulin resistance [10]. In fact, one of the main functions of ZAG in adipose tissue is thought to be its lipolytic action. ZAG has been shown to stimulate lipolysis in murine epididymal adipocytes associated with the activation of adenylate cyclase in a GTP-dependent manner [11]. This lipolytic effect seems to be mediated through the stimulation of a β_3 receptor [12]. ZAG expression was down-regulated in subcutaneous adipose tissue (SAT) [13–14] and in visceral adipose tissue (VAT) from obese patients [14] suggesting that ZAG expression in human adipose tissue appears to be inversely linked to fat mass. Besides, ZAG expression maintains a close positive relationship with *adiponectin* in adipose tissue. Thus, a strong positive relationship between ZAG and adiponectin gene expression in both VAT and SAT depots has been described [15,16]. Administration of recombinant ZAG to human adipocytes can increase adiponectin release in mature cells [16]. In this line, a negative association has been described between ZAG expression in adipose tissue and insulin resistance measured by homeostasis model assessment (HOMA-IR) [15,16]. In a recent study, administration of recombinant ZAG to hyperglycemic (ob/ob) mice produced a significant decrease in basal plasma insulin due to an increase in glucose consumption. This “hypoglycaemiant” effect of ZAG also seems to be mediated through stimulation of a β_3 receptor [17].

In light of this supposed metabolic effect of ZAG and considering the close relationship observed with adiponectin we hypothesize that ZAG may be related with hydrocarbonate metabolism during pregnancy, mainly in GDM patients by influencing the insulin-resistance milieu. To test this hypothesis, we analyzed ZAG serum levels in a well-characterized cohort of pregnant women with GDM and normal glucose tolerance (NGT). Furthermore, we also analyzed the relationship between cord blood ZAG (cbZAG) levels and metabolic and anthropometric parameters of their offspring.

Materials and Methods

A prospective analytic case-control study was conducted at the Joan XXIII University Hospital. Three hundred and seventy-seven pregnant Caucasian women were recruited at the time of antepartum screening for GDM. All of the women who participated underwent a 3-h, 100-g oral glucose tolerance test (OGTT) and were monitored from the time of inclusion until delivery. Serum and plasma samples were kept in a GDM biobank collection. The Joan XXIII Hospital Ethics Committee approved the study and written informed consent was obtained from all participants. Following the Spanish GDM guidelines and according to the OGTT, women with 2 or more values above the threshold proposed by the National Diabetes Data Group [18,19] were considered GDM, and women who had all the values below the threshold were classified in the normal glucose tolerance (NGT) group. Women with only one value above the threshold after oral glucose tolerance were excluded from the study. In this study we included two hundred and seven pregnant women who fulfilled the following criteria at the end of pregnancy, 1) a singleton pregnancy, 2) accurate gestational age confirmed by an ultrasound examination before 20 weeks of gestation, 3) the absence of fetal abnormalities identified at birth, 4) cord blood sample was obtained at delivery, and 5) NGT or GDM diagnosed before 30 weeks of pregnancy. Women with only one value above

the threshold after OGTT were excluded from the study. One hundred and sixty five women also fulfilled an additional criterion 6) neonatal biometry within the 48 hours of delivery.

GDM women were given a personalized diet with 40% of carbohydrates and they were instructed to self-monitor blood glucose 6 times a day (fasting and 1 hour postprandial) daily. Insulin therapy was recommended when fasting glucose values were repeatedly ≥ 95 mg/dl and or 1 hour postprandial values were >140 mg/dl. According to these criteria, 48 women were treated only with diet and 29 women required the addition of insulin.

Clinical and demographic data: Upon inclusion, demographic and historical information was collected via an interviewer-administered questionnaire focused in personal medical and obstetrical history, information regarding the current pregnancy with special attention to risk factors for gestational diabetes. Also, maternal anthropometric data including height, pre-pregnancy weight, and weight at the end of pregnancy were collected. Pre-pregnancy BMI was calculated using the formula: pre-pregnancy weight (kg)/(height (m))². Increased BMI was calculated by the formula BMI gain = final BMI – pre-pregnancy BMI. Neonatal length and weight were determined in all participants using a measuring board to the nearest 0.1 cm and a calibrated scale to the nearest 10 g. In a subgroup of one hundred and sixty five offspring, more complete fetal anthropometry was also measured. Triceps, biceps, subscapular, and flank skinfold thickness were measured with Holtain skinfold callipers (Chasmors Ltd, London UK). The circumference of the head, chest, abdomen at the umbilicus, and upper and lower limbs was measured with a mid-upper arm tape (Re-usable Lasso-o, Harlow, UK). The length of the upper and lower limbs was measured with an anthropometer (Chasmors Ltd, London UK). Newborn body composition was estimated by the formula validated by Dauncey [20]. This method assumes that the trunk and the upper and lower limbs are cylinders covered with a layer of fat. The head is considered a sphere without a fat layer. The triceps skinfold is used to estimate the fat covering limbs whereas the subscapular skinfold estimates the fat thickness of the trunk. The volume of the subcutaneous layer of fat covering each cylinder is estimated by the formula: Length \times circumference \times the correspondence skinfold value. Total body fat is the sum of volumes that cover each cylinder (two upper limbs + two lower limbs + trunk) $\times 0.9$ (the density of human fat tissue). We first calculated fat mass (FM), and fat-free mass (FFM) was obtained by the formula = Birth weight - FM.

Laboratory measurements: The 100 g-OGTT was performed in the morning after overnight fasting. Venous blood samples were drawn at baseline and 60, 120 and 180 minutes following ingestion of standard 100-g glucose load. Venous blood from the umbilical cord was obtained immediately after delivery. Glucose levels were determined in an ADVIA 2400 (Siemens AG, Munich, Germany) autoanalyzer using the standard enzyme methods. Fasting plasma insulin and C-peptide were determined by immunoassay in an ADVIA Centaur System (Siemens AG, Munich, Germany). This assay shows a cross-reactivity of lower than 0.1% to intact human proinsulin and the primary circulating split form. HOMA-IR was determined according to the following equation: fasting plasma glucose (mmol/L) \times fasting plasma insulin (μ U/ml/22.5) [21].

Serum ZAG levels were measured by sandwich ELISA (Bio-Vendor Laboratory Medicine, Inc., Palackeho, Czech Republic). The intra and inter-assay CVs were lower than 5 and 6.6%, respectively and assay sensitivity was 0.673 ng/ml.

Serum adiponectin levels were determined using a human ELISA kit (multimeric Adiponectin ELISA Kit; Bühlmann,

Table 1. Clinical and metabolic characteristics of the population studied.

	NGT (130)	GDM (77)	P
Maternal characteristics			
Age (years)	31.35±4.90	31.83±5.26	0.512
Gestational age (weeks)	27 (26–28.50)	28 (27–29)	0.252
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	23.23 (21.23–27.63)	24.72 (22.34–28.36)	0.083
Gain in BMI (kg/m ²)	4.82±2.04	3.70±2.08	<0.001
SBP (mm Hg)	116.05±13.86	118.68±12.56	0.172
DBP (mm Hg)	68.09±9.73	68.0±8.77	0.993
Tobacco use n (%)	21 (16.15)	15 (19.48)	1.0
Insulin treated n (%)	-	29 (37.66)	-
Fasting glucose (mg/dl)	80.44±6.89	85.69±10.40	<0.0001
Fasting insulin (μIU/ml)	7.58 (5.82–13.0)	10.03 (7.11–15.27)	0.007
HOMA-IR	1.49 (1.11–2.53)	2.13 (1.43–3.58)	0.002
Cholesterol (mmol/liter)	6.68±1.10	6.59±1.09	0.567
HDL cholesterol (mmol/liter)	1.91±0.31	1.85±0.34	0.219
Triglycerides (mmol/liter)	1.88 (1.52–2.27)	1.99 (1.64–2.56)	0.80
mZAG (μg/ml)	46.88±9.36	47.25±11.74	0.818
mAdiponectin (μg/ml)	5.80±2.37	4.90±2.13	0.006
Neonatal characteristics			
Gestational age at delivery	39 (38–40)	39 (38–40)	0.560
Male sex n (%)	60 (46.1)	41 (53.2)	0.325
Birth weight (g)	3278.07±477.53	3244.22±464.47	0.617
cbInsulin (μIU/ml)	4.33 (2.46–6.89)	5.36 (2.98–9.91)	0.045
cbZAG (μg/ml)	20.67±7.15	20.32±6.31	0.713
cbAdiponectin (μg/ml)	17.62±6.34	17.04±6.72	0.548
FM (n) (g)	(97) 318.38±132.64	(68) 291.38±131.40	0.198
FFM (n) (g)	(97) 2794.60±369.63	(68) 2778.35±358.16	0.750

Value data are presented as mean ± SD or median (25–75th percentile) for nonnormally distributed variables. mAdiponectin: maternal adiponectin, cbAdiponectin: cord blood adiponectin, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure.
 doi:10.1371/journal.pone.0047601.t001

Schönenbuch, Switzerland). The intra and inter-assay CVs were lower than 15% and assay sensitivity was 0.08 ng/ml.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS statistical package (version 13; SPSS, Chicago, IL). The 1-sample Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify the normal distribution of the quantitative variables. For clinical and anthropometrical variables, normal distributed data are expressed as mean values (±SD), and for variables with a non Gaussian distribution, values are expressed as median (25–75th percentile). Categorical variables were reported by number (percentages). Comparisons of quantitative variables between groups were performed by either Student's t-test or the Mann-Whitney U test according to the data distribution. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson correlation analysis or Spearman correlation for non-normally distributed variables. The independence of the associations of maternal ZAG (mZAG) and cbZAG with clinical and analytical variables was evaluated by stepwise multiple linear regression analysis. Variables with a significant association in the bivariate analysis or those known to be related with the physiopathology of insulin-resistance were included as indepen-

dent ones in the model. All models were also adjusted for age. Statistical significance was accepted at the level of P<0.05.

Results

One hundred and thirty NGT and seventy-seven GDM pregnant women and their respective offspring were included in the study.

Maternal outcome

The main clinical and analytical variables of the study participants are summarized in table 1.

As expected GDM women had higher levels of fasting glucose, fasting insulin and HOMA-IR. By contrast NGT women showed a higher gain in BMI during pregnancy (4.82±2.04 vs. 3.70±2.08 kg/m² P<0.001). The remaining variables did not show any differences between the groups. Serum mZAG circulating levels were similar both in NGT and GDM women. Furthermore, mZAG concentrations were similar in insulin or in diet-treated GDM women (45.88±11.59 μg/ml vs. 48.01±11.98 μg/ml respectively).

We also analyzed the influence of pre-pregnancy weight in ZAG levels. No differences in mZAG levels were observed between lean

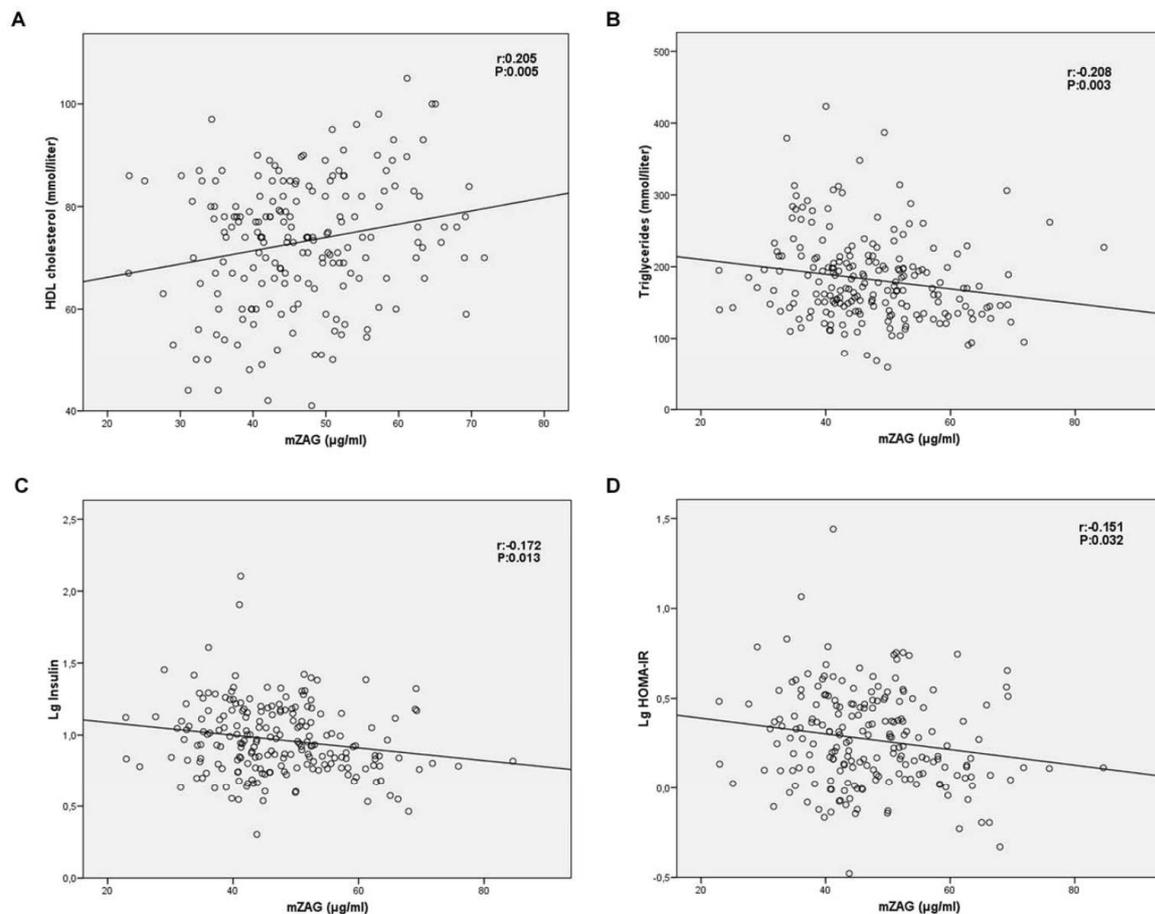


Figure 1. Correlation between serum mZAG levels and HDL cholesterol levels (A), triglyceride levels (B), Insulin logarithm (Lg Insulin) (C) and HOMA-IR logarithm (Lg HOMA-IR) (D).
doi:10.1371/journal.pone.0047601.g001

($BMI \leq 25$ Kg/m²) and overweight ($BMI > 25$ Kg/m²) women, either when we considered the whole group (47.91 ± 10.67 µg/ml vs. 45.76 ± 9.63 µg/ml respectively) or when NGT (47.63 ± 9.57 µg/ml vs. 46.15 ± 8.45 µg/ml) and GDM groups (48.46 ± 12.66 µg/ml vs. 45.24 ± 12.66 µg/ml) were analyzed separately.

Fetal outcome

The main clinical and analytical variables of the offspring are summarized in table 1.

Cord blood insulin levels were higher in offspring of GDM when compared with NGT pregnant women. Gender distribution, mean birth weight (BW) and gestational age at delivery were similar in both groups. There were no significant differences in cord blood ZAG (cbZAG) levels between GDM and NGT groups and no effect on cbZAG levels regarding GDM treatment (insulin or diet only) was observed (21.79 ± 6.74 µg/ml vs. 19.63 µg/ml ± 5.83 respectively).

When we analyzed the relationship between cbZAG and mZAG levels in the whole group we observed that cbZAG concentrations were more than twofold lower than mZAG levels

(20.54 ± 6.84 µg/ml vs. 47.02 ± 10.28 µg/ml respectively $P < 0.001$). Similar results were obtained when we studied the GDM (20.32 ± 6.31 µg/ml vs. 47.25 ± 11.74 µg/ml $P < 0.001$) and NGT groups (20.67 ± 7.15 µg/ml vs. 46.88 ± 9.37 µg/ml $P < 0.001$) separately.

Relationship between ZAG levels with clinical and analytical variables

In the bivariate correlation analysis, no association between mZAG and cbZAG levels was observed. Serum mZAG concentrations showed a positive correlation with HDL cholesterol levels and a negative correlation with triglyceride levels, insulin and HOMA-IR (figure 1). No correlation between mZAG concentrations and fetal variables were observed.

Serum cbZAG levels were positively associated with gestational age at delivery (figure 2), BW and FFM (figure 3). There were no correlations between cbZAG levels and maternal variables.

There was a positive correlation between mZAG and maternal adiponectin levels ($r = 0.205$; $P = 0.003$). Concerning cbZAG levels, no relationship with maternal or cord blood adiponectin levels was observed.

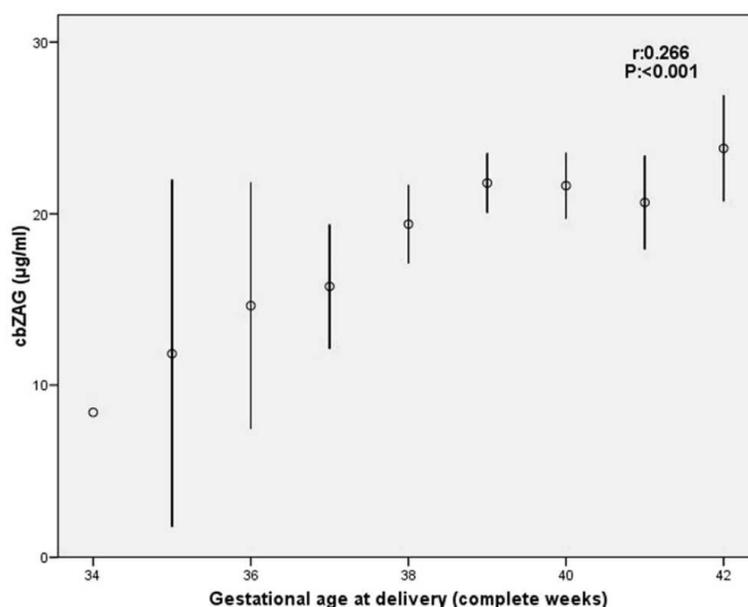


Figure 2. Relationship between serum cbZAG levels and gestational age at delivery.
doi:10.1371/journal.pone.0047601.g002

To strengthen the independence of these relationships, a series of stepwise multiple linear regression analysis models was constructed:

First model with mZAG as dependent variable; we include HDL-cholesterol, triglycerides, HOMA-IR, cbZAG, maternal adiponectin, GDM, maternal age and pregravid BMI as independent variables. HDL cholesterol emerged as the sole positive determinant of mZAG ($B = 0.150$; $P = 0.039$).

Second model with cbZAG as dependent variable; we include gestational age at delivery, BW, FFM, mZAG, cord blood adiponectin, GDM and neonatal sex as independent variables. The final regression model identified gestational age at delivery as the sole and potent positive predictor ($B = 0.292$; $P = <0.0001$).

Third model with maternal adiponectin as dependent variable; we include mZAG, HOMA-IR, pre-pregnancy BMI, maternal age and gain in BMI as independent variables. The result showed that maternal adiponectin was mainly predicted by mZAG ($B = 0.187$; $P = 0.007$) and HOMA-IR ($B = -0.181$; $P = 0.009$).

Discussion

Insulin resistance plays a pivotal role for the proper maintenance of metabolic homeostasis during pregnancy. The secretory function of adipose tissue has gained attention in the adequate functioning of glucose metabolism when insulin resistance becomes evident, as occurs in the last months of pregnancy. However, human data are very scarce regarding adipokines during pregnancy. In this study we have described for the first time that the serum ZAG levels during pregnancy are associated with a healthier metabolic profile, with independence of the glucose metabolism. Furthermore, the absence of relationship with pre-pregnancy BMI suggests that adipose tissue is not a major determinant of its circulating levels during pregnancy, although we cannot discard a local metabolic role of ZAG.

ZAG is a relatively new player in metabolic disturbances of insulin resistance-derived diseases, but the previous studies in non-pregnant subjects have yielded heterogeneous results. Thus, in obesity, low [14,22], unchanged [15] or increased [23,24] circulating levels have been reported. Furthermore, in metabolic syndrome and type 2 diabetes similar results have been observed, with increased or comparable levels to healthy counterparts [23–25]. Differences in the ethnic backgrounds and in patient characteristics might explain these inconsistent results.

Only one previous report exists analyzing ZAG levels in pregnancy in women with preeclampsia. In this report, high levels of serum ZAG were described in preeclampsia, but no clear association with traits of metabolic syndrome were detected [26]. By contrast, in our cohort, circulating maternal ZAG levels were associated with a better metabolic profile including a weak positive association with maternal adiponectin. These discrepancies may be due, in part, to the greater number of women included in our study. Nevertheless, HDL cholesterol remained the unique determinant of mZAG levels after controlling for confounding factors, toning down the usefulness of this protein in maternal serum during pregnancy as a biomarker for a worse metabolic profile. In this line, pregnant women with altered glucose metabolism showed similar mZAG circulating levels to NGT women, despite the inverse association with the insulin resistance parameters (insulin, HOMA-IR index and triglycerides) detected in the univariate analysis. Interestingly, when we analyze the variables influencing circulating adiponectin levels in our cohort, mZAG was revealed as one of the main predictors (positively associated) along with HOMA-IR (negatively associated). Thus, we cannot exclude an influence of ZAG on glucose metabolism, at least indirectly, by influencing other hormones with a more direct role in the generation of insulin-resistance such as adiponectin.

Another new finding reported herein is the low levels of ZAG in cord blood when compared with mZAG levels. We are aware of the limitations of the study design regarding no mechanistic

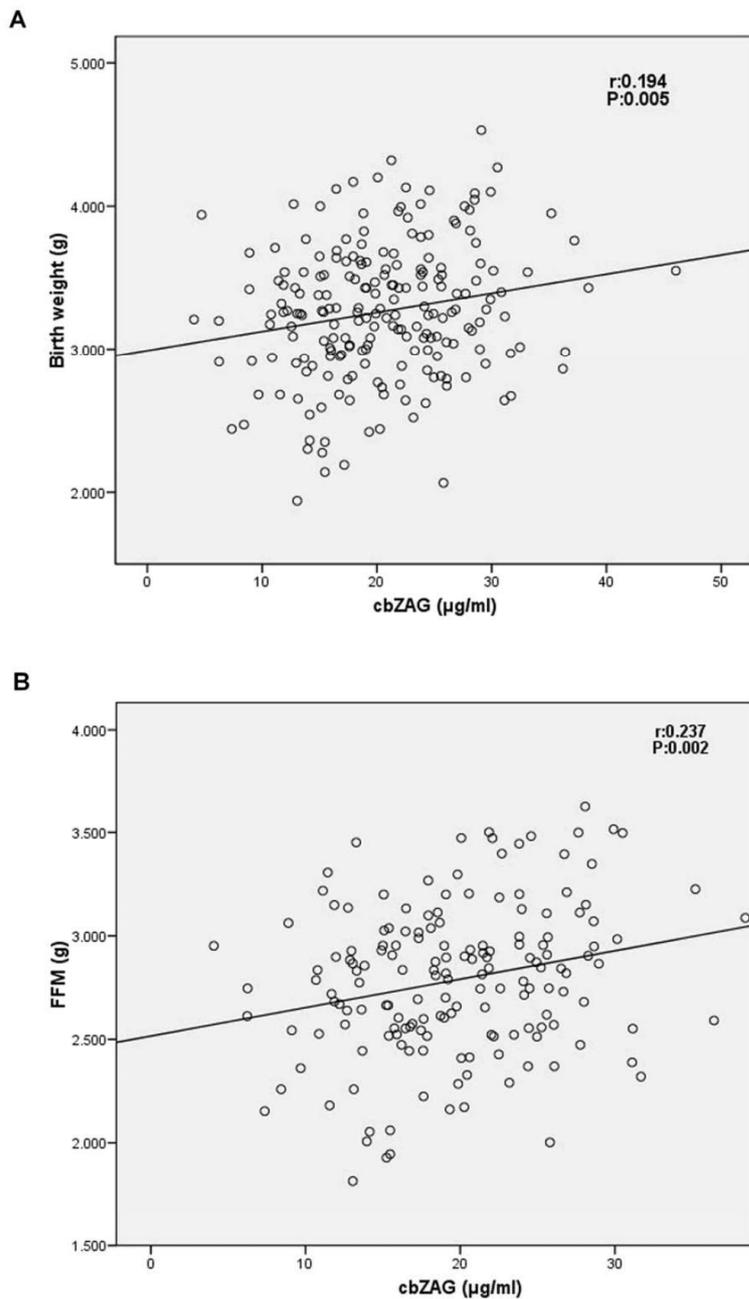


Figure 3. Correlation between serum cbZAG levels and anthropometric variables: birth weight (A) and fat-free mass (FFM) (B).
doi:10.1371/journal.pone.0047601.g003

interpretations. However, the positive associations observed between cbZAG and several anthropometric markers measured in the newborn lead us to speculate as to a different role of this cytokine in the fetal environment. On the other hand, the lower ZAG levels in offspring may protect the fetus from excessive lipolytic activity during the latter part of pregnancy when the fetal

anabolic functions dominate, unlike adiponectin, which stimulates adipogenesis in experimental models [27]. In fact, the main determinant of cbZAG levels was maternal gestational age at delivery; the higher the age, the higher the cbZAG levels, suggesting that umbilical ZAG is determined by the maturity of adipose tissue rather than the quantity of fat mass. We cannot rule out an

influence of circulating mZAG at the end of pregnancy on cbZAG levels at delivery. However, the high molecular weight of ZAG makes it difficult for this protein to be transferred across the placenta influencing cbZAG levels. In addition, ZAG is one of the 136 different proteins detected in the proteomic analysis of normal human amniotic fluid and it is secreted from the fetal liver indicating a physiological role in the wellbeing of the fetus during normal pregnancy [28] without discarding a placental implication in its metabolism.

In summary, we have observed higher ZAG concentrations in pregnant women than in the cord blood of their offspring, and cord blood ZAG concentrations were determined by the gestational age. Despite no differences being observed in ZAG concentrations between GDM and NGT women, maternal ZAG is associated with a better metabolic profile in pregnant women, as shown by the positive association with HDL cholesterol and adiponectin concentrations.

References

- Catalano PM, H L, Amini SB, Kalhan SC (1999) Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 180: 903–906.
- Frübeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 280: E827–E847.
- Ategho JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, et al. (2006) Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4137–4143.
- Mazaky-Tovi S, Romero R, Vaisbuch E, Erez O, Mittal P, et al. (2009) Maternal serum adiponectin multimers in gestational diabetes. *J Perinat Med* 37: 637–650.
- Ballesteros M, Simón I, Vendrell J, Ceperuelo-Mallafre V, Miralles R, et al. (2011) Maternal and cord blood adiponectin multimeric forms in gestational diabetes mellitus. A prospective analysis. *Diabetes Care* 34: 2418–2423.
- Retnakaran R, Hanley AJ, Connelly PW, Maguire G, Sermer M, et al. (2007) Decreased high-molecular-weight adiponectin in gestational diabetes: implications for the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabet Med* 24: 245–252.
- Ortega-Senovilla H, Schaefer-Graf U, Meitzner K, Abou-Dakn M, Graf K, et al. (2011) Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipocytokines in cord blood. *Diabetes Care* 34: 2061–2066.
- Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, et al. (1991) Immunohistochemical localization of Zinc- α 2-Glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 39: 1221–1226.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, et al. (2004) Zinc- α 2-Glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2500–2505.
- Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, et al. (2005) Zinc- α 2-Glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett* 579: 41–47.
- Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ (1998) Biological evaluation of a lipid mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* 58: 2359–2365.
- Russell ST, Hirai K, Tisdale MJ (2002) Role of beta 3-adrenergic receptors in the action of a tumor lipid mobilizing factor. *Br J Cancer* 86: 424–428.
- Marrades MP, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2008) ZAG, a lipid mobilizing adipokine is downregulated in human obesity. *J Physiol Biochem* 64: 61–66.
- Selva DM, Lecube A, Hernández C, Baena JA, Fort JM, et al. (2009) Lower zinc- α 2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients is unrelated to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4499–4507.
- Ceperuelo-Mallafre V, Naf S, Escoté X, Caubet E, Gómez JM, et al. (2009) Circulating and adipose tissue gene expression of zinc- α 2-glycoprotein in obesity: its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 5062–5069.
- Mracek T, Ding Q, Tzanavari T, Kos K, Pinkney J, et al. (2010) The adipokine zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) is downregulated with fat mass expansion in obesity. *Clinical Endocrinology* 72: 334–341.
- Russell ST, Tisdale MJ (2010) Antidiabetic properties of zinc- α 2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinology* 151: 948–957.
- Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE) (2006) Guía asistencial de diabetes mellitus y embarazo. *Av. Diabetol* 22(1): 73–87.
- National Diabetes Data Group (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039–1057.
- Dauncey MJ, Gandy G, Gairdner D (1977) Assessment of total body fat in infants from skinfold thickness measurements. *Arch Dis Child* 52: 223–227.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419.
- Gong F-Y, Zhang S-J, Deng J-Y, Zhu H-J, Pan H, et al. (2009) Zinc- α 2-glycoprotein is involved in regulation of body weight through inhibition of lipogenic enzymes in adipose tissue. *International Journal of Obesity* 33: 1023–1030.
- Yeung DCY, Lam KSL, Wang Y, Tso AWK, Xu A (2009) Serum zinc- α 2-glycoprotein correlates with adiposity, triglycerides, and the key components of the metabolic syndrome in chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 94(7): 2531–2536.
- Stejskal D, Karpisek M, Reutova H, Stejskal P, Kotolová H, et al. (2008) Determination of serum zinc- α 2-glycoprotein in patients with metabolic syndrome by a new ELISA 2008. *Clin Biochem* 41 (4–5): 313–316.
- Yilmaz Y, Yonal O, Eren F, Ramazan K, Celikel CA, et al. (2011) Serum zinc- α 2-glycoprotein concentrations in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chem Lab Med* 49(1): 93–97.
- Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, et al. (2011) Serum levels of the adipokine zinc- α 2-glycoprotein are increased in preeclampsia. *J Endocrinol Invest* Jul 27 DOI:10.3275/7877.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT (2005) Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46: 1369–1379.
- Tsangaris GT, Kolialexi A, Karamessini PM, Anagnostopoulos AK, Antsaklis A, et al. (2006) The normal human amniotic fluid supernatant proteome. *In vivo* 20(4): 479–490.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Silvia Naf, Endocrinology and Diabetes Unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C/Dr. Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: snafco@hotmail.com.

The authors are grateful to Miriam Campos and Lluis Gallart from the biobank at Joan XXIII Hospital and Victoria Ceperuelo-Mallafre from Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III, Spain, for their help in laboratory work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SN AM JV MB. Performed the experiments: XE PG. Analyzed the data: SN AM JV IS. Discussion of the data: SN XE REY MB IS PG AM JV.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Objetivos 3 y 4:

5.2 Segundo estudio

Serum Activin A and Follistatin levels in Gestational Diabets and the association of the Activin A-Follistatin System with anthropometric parameters in offspring

Silvia Näf, Xavier Escote, Mónica Ballesteros, Rosa Elena Yañez, Inmaculada Simón-Muela, Pilar Gil, Gerard Albaiges, Joan Vendrell, Ana Megia

PLoS ONE. 2014; 9: e92175

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Serum Activin A and Follistatin Levels in Gestational Diabetes and the Association of the Activin A-Follistatin System with Anthropometric Parameters in Offspring

Silvia Náf^{1,3,4,*}, Xavier Escote^{1,3,4}, Mónica Ballesteros², Rosa Elena Yañez^{1,3,4}, Inmaculada Simón-Muela^{1,3,4}, Pilar Gil^{1,3,4}, Gerard Albaiges², Joan Vendrell^{1,3,4}, Ana Megia^{1,3,4}

1 Endocrinology and Diabetes Unit, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, **2** Obstetrics and Gynecology Service, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, **3** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **4** Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Abstract

Context: The Activin A-Follistatin system has emerged as an important regulator of lipid and glucose metabolism with possible repercussions on fetal growth.

Objective: To analyze circulating activin A, follistatin and follistatin-like-3 (FSTL3) levels and their relationship with glucose metabolism in pregnant women and their influence on fetal growth and neonatal adiposity.

Design and methods: A prospective cohort was studied comprising 207 pregnant women, 129 with normal glucose tolerance (NGT) and 78 with gestational diabetes mellitus (GDM) and their offspring. Activin A, follistatin and FSTL3 levels were measured in maternal serum collected in the early third trimester of pregnancy. Serial fetal ultrasounds were performed during the third trimester to evaluate fetal growth. Neonatal anthropometry was measured to assess neonatal adiposity.

Results: Serum follistatin levels were significantly lower in GDM than in NGT pregnant women (8.21 ± 2.32 ng/mL vs 9.22 ± 3.41 , $P = 0.012$) whereas serum FSTL3 and activin A levels were comparable between the two groups. Serum follistatin concentrations were negatively correlated with HOMA-IR and positively with ultrasound growth parameters such as fractional thigh volume estimation in the middle of the third trimester and percent fat mass at birth. Also, in the stepwise multiple linear regression analysis serum follistatin levels were negatively associated with HOMA-IR ($\beta = -0.199$, $P = 0.008$) and the diagnosis of gestational diabetes ($\beta = -0.138$, $P = 0.049$). Likewise, fractional thigh volume estimation in the middle of third trimester and percent fat mass at birth were positively determined by serum follistatin levels ($\beta = 0.214$, $P = 0.005$ and $\beta = 0.231$, $P = 0.002$, respectively).

Conclusions: Circulating follistatin levels are reduced in GDM compared with NGT pregnant women and they are positively associated with fetal growth and neonatal adiposity. These data suggest a role of the Activin-Follistatin system in maternal and fetal metabolism during pregnancy.

Citation: Náf S, Escote X, Ballesteros M, Yañez RE, Simón-Muela I, et al. (2014) Serum Activin A and Follistatin Levels in Gestational Diabetes and the Association of the Activin A-Follistatin System with Anthropometric Parameters in Offspring. PLoS ONE 9(4): e92175. doi:10.1371/journal.pone.0092175

Editor: Sisira Siribaddana, Faculty of Medicine & Allied Sciences, Rajarata University of Sri Lanka, Sri Lanka

Received: October 7, 2013; **Accepted:** February 19, 2014; **Published:** April 24, 2014

Copyright: © 2014 Náf et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) P509/02152, and FIS P112/0717, Instituto de Salud Carlos III, and funds from Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) (CB07/08/0012). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. R.E.Y is supported by a fellowship Ajut predoctoral per a la contractació de personal investigador novell (Exp.2010 FIB01004) from Universitat Rovira i Virgili. A.M. is grateful to the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) for the 2010 grant: "Programa d'ajuts per al desenvolupament de projectes de recerca". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: snafco@hotmail.com

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is one of the most frequent metabolic disorders complicating pregnancy. Late pregnancy is a state of physiological insulin resistance in which nutritional, hormonal and inflammatory factors are involved. When pregnant women fail to overcome this insulin resistance, GDM develops [1]. This metabolic disturbance modifies the in utero environment

affecting fetal development and favoring fetal overgrowth and adipose tissue accretion. Current treatment of GDM is aimed at normalizing birth weight and reducing fat mass [2]. Obstetric ultrasound allows assessing fetal growth despite the poor correlation reported between estimated fetal weight and neonatal adiposity [3,4]. Recently it has been shown that the measurement of fractional limb volume, a soft tissue parameter of fetal body

composition, is more accurate to monitor fetal nutritional status and is closely related to neonatal adiposity [4].

The Activin A-Follistatin system has emerged as an important regulator of lipid and glucose metabolism with possible implications on fetal growth [5]. Activin A, a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, is a pleiotropic cytokine that regulates several cellular events including a role in glucose homeostasis. Enhanced glucose stimulated insulin secretion [6] and increased beta cell proliferation in cultured rat and human islets by activin A [7,8] have been reported. Furthermore, it plays a role in lipid homeostasis by promoting proliferation and inhibiting adipocyte differentiation from human preadipocytes [9].

Follistatin and follistatin-like-3 (FSTL3) are high-affinity activin binding proteins, which neutralize most of its biological actions [10]. Regarding adipose tissue, in contrast to activin A, follistatin promotes adipogenic differentiation of progenitor cells [11]. Interestingly, FSTL3 knockout mice develop metabolic alterations including enlarged islets, β -cell hyperplasia, decreased visceral fat mass, improved glucose tolerance and insulin sensitivity [12].

The fetoplacental unit is the main source of serum activin A levels during pregnancy [13,14] and follistatin and FSTL3 are also highly expressed by the placenta [15,16] and fetal membranes [16].

Data assessing serum activin A levels in pregnancies complicated by GDM are scarce. Higher concentrations of activin A in two small cohorts of pregnant women with GDM have been described [17,18]. Previous studies regarding FSTL3 circulating levels in GDM women yielded heterogeneous results. Thus, in the first trimester, low [19] or unchanged [20] circulating levels have been reported in women who developed GDM. Likewise in the third trimester, at term, low serum FSTL3 levels have been observed in GDM women [21]. To our knowledge there are no reports concerning follistatin levels in GDM.

Considering the implication of the Activin-Follistatin system in glucose and lipid metabolism, key elements in insulin resistance developed during pregnancy, we hypothesized that serum levels of activin A, follistatin and FSTL3 would be associated with pregnancies affected by GDM. To test this hypothesis, we analyzed circulating activin A, follistatin and FSTL3 levels in a well-characterized cohort of pregnant women with GDM and in their normal glucose tolerance (NGT) counterparts. Furthermore, we also analyzed their relationship with the ultrasound and anthropometric parameters of their offspring.

Materials and Methods

A prospective case-control study was conducted at the Joan XXIII University Hospital. The study protocol and laboratory methods have been fully described previously [22]. Briefly, pregnant Caucasian women included in this study were recruited at the time of antepartum screening for GDM (between 26–30 weeks). All of the women who participated underwent a 3 hour, 100 g oral glucose tolerance test (OGTT) and were monitored from the time of inclusion until delivery. Baseline serum and plasma samples obtained at the time of the OGTT were kept in a GDM biobank collection at our institution. The Joan XXIII University Hospital Ethics Committee approved the study, and written informed consent was obtained from all participants. Following the Spanish GDM guidelines and according to the OGTT, women with two or more values above the threshold proposed by the National Diabetes Data Group [23,24] were considered GDM, and women for whom all the values were below the threshold were classified in the normal glucose tolerance (NGT) group. Women with only one value above the threshold after oral glucose tolerance were excluded from the study. Two

hundred and seven pregnant women who fulfilled the following criteria at the end of pregnancy were recruited for this study: 1) a singleton pregnancy, 2) accurate gestational age confirmed by an ultrasound examination before 20 weeks of gestation, 3) the absence of fetal abnormalities identified at birth, 4) NGT or GDM diagnosed before 30 weeks of pregnancy. One hundred and ninety-seven women fulfilled an additional criterion: 5) at least two ultrasound explorations, one upon recruitment and another in the middle of the third trimester. GDM women were given a personalized diet with 40% of carbohydrates and they were instructed to self-monitor blood glucose daily 6 times a day (fasting and 1 hour postprandial). Insulin therapy was recommended when fasting glucose values were repeatedly ≥ 95 mg/dl and/or 1 hour postprandial values were > 140 mg/dl. According to these criteria, 49 women were treated only with diet and 29 women required the addition of insulin.

Clinical and demographic data

Upon inclusion, demographic and historical information was collected via an interviewer-administered questionnaire focused on personal medical and obstetrical history and information regarding the current pregnancy with special attention to risk factors for gestational diabetes. Also, maternal anthropometric data including height, pre-pregnancy weight, and weight at the end of pregnancy were collected. Pre-pregnancy BMI was calculated using the formula: pre-pregnancy weight (kg)/(height (m))². Increased BMI was calculated by the formula BMI gain = final BMI – pre-pregnancy BMI. Neonatal length and weight were determined in all participants using a measuring board to the nearest 0.1 cm and a calibrated scale to the nearest 10 g. Birth weight (BW) was transformed into standard deviation scores (SDS) to adjust for gestational age at delivery using gender-specific references of fetal growth [25]. In a subgroup of one hundred and sixty five offspring, more complete neonatal anthropometric measurements were taken. Triceps, biceps, subscapular, and flank skinfold thickness were measured with Holtain skinfold callipers (Chasmors Ltd, London UK). Percent fat mass (PFM) at birth was estimated by the formula validated by Catalano (fat mass (FM) = 0.39055 (birth weight) + 0.0453 (flank skinfold) – 0.03237 (length) + 0.54657/100 [26].

Fetal ultrasound

One examiner performed all ultrasound examinations using ultrasound color Doppler equipment (RAB 4-8L, Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Austria) using hybrid mechanical and curved array abdominal ultrasonic transducers. Fetal weight estimations (FWE) were calculated at approximately 28 (range, 27–30) (FWE₂₈) and 35 (range, 34–36) (FWE₃₅) weeks' gestation using Hadlock's equation [27]. Fractional thigh volume estimations (FTVE) were also calculated at approximately 28 (range, 27–30) (FTVE₂₈) and 35 (range, 34–36) (FTVE₃₅) weeks' gestation according to the method provided by Lee et al. [28]. FWE and FTVE were transformed into standard deviation scores (SDS). To adjust for gestational age, we used gender-specific references of fetal growth in the Spanish population for FWE [25] and charts published by Lee for FTVE [28].

Laboratory measurements

The 100 g-OGTT was performed in the morning after an overnight fasting. Venous blood samples were drawn at baseline and 60, 120 and 180 minutes after ingesting a standard 100-g glucose load. Serum glucose levels were determined in an ADVIA 2400 (Siemens AG, Munich, Germany) autoanalyzer using the standard enzyme methods. Fasting plasma insulin and C-peptide

Table 1. Clinical, metabolic and ultrasound characteristics of the population studied.

	NGT (129)	GDM (78)	P
Maternal characteristics			
Age (years)	31.36±4.92	31.81±5.23	.533
Gestational age (weeks)	27 (26–28.75)	28 (27–29)	.229
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	23.12 (21.23–27.67)	24.72 (22.34–28.36)	.075
Gain in BMI (kg/m ²)	4.83±2.05	3.70±2.06	<.001
SBP (mm Hg)	116.05±13.86	118.68±12.56	.172
DBP (mm Hg)	68.09±9.73	68.0±8.77	.993
Tobacco use n (%)	20 (15.50)	16 (20.51)	.736
Insulin treated n (%)	-	29 (37.66)	-
Fasting glucose (mg/dL)	80.34±6.89	85.78±10.37	<.001
Fasting insulin (μU/mL)	7.46 (5.82–12.85)	10.05 (7.11–15.19)	.005
HOMA-IR	1.49 (1.11–2.52)	2.17 (1.44–3.56)	.001
Cholesterol (mmol/L)	6.68±1.10	6.62±1.10	.699
HDL cholesterol (mmol/L)	1.92±0.32	1.85±0.33	.187
Triglycerides (mmol/L)	1.98±0.62	2.19±0.73	.029
Activin A (ng/mL)	1.75 (1.34–2.35)	1.78 (1.30–2.54)	.499
Follistatin (ng/mL)	9.22±3.41	8.21±2.32	.012
FSTL3 (ng/mL)	12.45±4.06	12.01±3.39	.418
Neonatal characteristics			
Gestational age at delivery	39 (38–40)	39 (38–40)	.560
Male sex n (%)	60 (46.5)	41 (52.6)	.400
Birth weight (g)	3276.90±479.21	3246.60±461.92	.655
Birth weight (SDS)	0.12±1.08	0.13±1.07	.926
Percent fat mass (n) (%)	(96) 9.84±1.67	(69) 9.57±1.54	.285
FWE ₂₈ SDS (n)	(120) 1.12±0.90	(77) 1.12±0.76	.999
FWE ₃₅ SDS (n)	(125) 0.88±0.90	(77) 0.77±0.89	.398
FTVE ₂₈ SDS (n)	(103) 0.12±3.14	(68) 0.35±4.27	.693
FTVE ₃₅ SDS (n)	(103) -1.22±6.82	(70) -1.30±7.45	.942

Value data are presented as mean ± SD or median (25th–75th percentile) for non-normally distributed variables. SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, FWE: fetal weight estimation, FTVE: fractional thigh volume estimation SDS: standard deviation score.
 doi:10.1371/journal.pone.0092175.t001

were determined by immunoassay in an ADVIA Centaur System (Siemens AG, Munich, Germany). This assay shows a cross-reactivity of lower than 0.1% to intact human proinsulin and the primary circulating split form. Homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) index was determined according to the following equation: fasting plasma glucose (mmol/L)×fasting plasma insulin (μU/ml/22.5) [29].

Also activin A, follistatin and FSTL3 were measured in the serum obtained at the time of the OGTT. Serum activin A levels were measured by sandwich ELISA (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). The intra- and inter-assay CVs were 4.2% and 5.8%, respectively and assay sensitivity was 3.67 pg/ml. Serum follistatin levels were determined using a human ELISA kit (R&D Systems Europe Ltd). The intra and inter-assay CVs were 2.3% and 8% respectively and assay sensitivity was 29 pg/ml. Serum FSTL3 levels were determined using a human ELISA kit (R&D Systems Europe Ltd). The intra and inter-assay CVs were 2.4% and 5.3%, respectively and assay sensitivity was 3.68 pg/ml.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS statistical package (version 13; SPSS, Chicago, IL). The 1-sample Kolmo-

gorov-Smirnov test was performed to verify the normal distribution of the quantitative variables. For clinical and anthropometrical variables, normal distributed data are expressed as mean values (±SD), and for variables with a non-Gaussian distribution, values are expressed as median (25th–75th percentile). Categorical variables were reported by frequencies (percentages). Comparisons of quantitative variables between groups were performed by either Student's t-test or the Mann-Whitney U test, according to data distribution. Associations between quantitative variables were evaluated by Pearson's correlation analysis. Activin A, pre-pregnancy BMI, insulin and HOMA-IR which a skewed distribution were log transformed.

The relationship of maternal activin A, follistatin and FSTL3 with clinical and analytical variables was evaluated by stepwise multiple linear regression analysis. Variables with a significant association in the bivariate analysis or those known to be related with the physiopathology of insulin resistance were included in the model as covariates. To avoid multicollinearity we assessed the variable inflation factor (VIF) for all the covariates in each regression model and no variable included had a VIF greater than 2. The main determinants of BW ZS, PFM at birth, FTVE₂₈ SDS, FTVE₃₅ SDS, FWE₂₈ SDS and FWE₃₅ SDS were evaluated by

stepwise multiple regression analysis. Statistical significance was accepted at the level $P < 0.05$.

The sample size for this study was calculated according to activin A values. In previous literature [17], it has been observed that activin levels in pregnancy were 1.5 units higher in women with GDM than in NGT women. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.2 in a two-sided test we calculated that 128 subjects were necessary in the first group and 76 in the second to recognize as statistically significant a difference greater than or equal to 1.5 units, when a common standard deviation was assumed to be 3.7.

Results

One hundred and twenty-nine NGT and seventy-eight GDM pregnant women and their respective offspring were included in the study.

Maternal outcome

The main clinical and analytical variables of the study participants are presented in table 1.

As expected, fasting glucose and insulin levels, HOMA-IR index and triglycerides levels were higher in GDM than in NGT women. By contrast NGT women showed a higher gain in BMI during pregnancy whereas pre-pregnancy BMI was similar in both groups. Serum follistatin levels were significantly lower in the GDM group compared with the NGT group (9.22 ± 3.41 vs. 8.21 ± 2.32 ng/ml, $P = 0.012$) (Figure 1), whereas serum activin A and FSTL3 concentrations were comparable between the two groups.

Fetal outcome

The main clinical and analytical variables of the offspring are summarized in table 1.

Gender distribution, mean BW SDS, PFM and gestational age at delivery were similar in both groups. There were no differences

in FTVE₂₈ SDS and FTVE₃₅ SDS between the two groups. Also, FWE₂₈ SDS and FWE₃₅ SDS were comparable in the two groups.

Bivariate correlation analysis

Relationship between activin A and clinical, analytical and ultrasound variables. Circulating activin A levels were weakly correlated with serum triglycerides ($r = 0.185$; $P = 0.008$) and maternal age ($r = 0.142$; $P = 0.042$). Also, a positive relationship was observed with FWE₂₈ SDS ($r = 0.183$, $P = 0.034$).

When the analysis was performed separately in the NGT group the association with triglycerides disappeared, but the correlation with maternal age remained significant ($r = 0.185$; $P = 0.036$).

In contrast, Activin A levels in the GDM group were unrelated with any of the clinical, analytical or ultrasound parameters.

Relationship between follistatin and clinical, analytical and ultrasound variables. In the whole group, serum follistatin levels were negatively correlated with maternal age ($r = -0.167$; $P = 0.016$). Regarding metabolic variables, a negative association was found with fasting glucose ($r = -0.176$; $P = 0.011$), fasting insulin ($r = -0.141$; $P = 0.042$) and HOMA-IR index ($r = -0.153$; $P = 0.030$). Likewise, a positive correlation was observed with ultrasound parameters, FTVE₃₅ SDS ($r = 0.212$; $P = 0.005$) and FWE₃₅ SDS ($r = 0.142$; $P = 0.014$), and with anthropometric neonatal parameters, BW SDS ($r = 0.152$; $P = 0.029$) and PFM ($r = 0.239$; $P = 0.002$).

When the analysis was performed in the GDM group, only maternal age was negatively associated with serum follistatin concentrations ($r = -0.275$; $P = 0.015$) and the positive correlations with ultrasound parameters were lost. On the other hand, in the NGT group, the correlations observed with BW SDS and PFM remained significant and stronger ($r = 0.215$; $P = 0.015$ and $r = 0.307$; $P = 0.002$, respectively). Also, FTVE₃₅ SDS and FTVE₂₈ SDS were positively associated with serum follistatin levels ($r = 0.249$; $P = 0.011$ and $r = 0.202$; $P = 0.042$, respectively).

Relationship between FSTL3 and clinical, analytical and ultrasound variables. Circulating FSTL3 levels were only positively correlated with activin A ($r = 0.308$, $P = 0.001$) in the

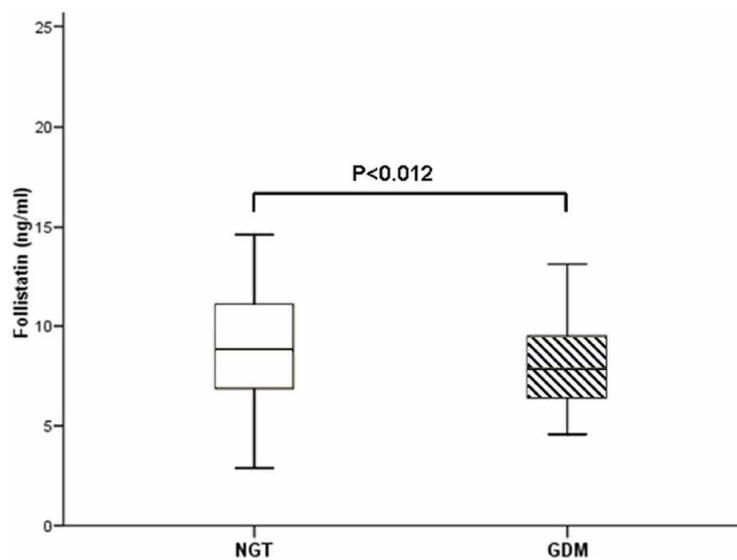


Figure 1. Serum follistatin levels in the NGT group compared with the GDM group.
doi:10.1371/journal.pone.0092175.g001

whole group. This correlation persists in the NGT group ($r = 0.265$, $P = 0.002$) and in the GDM group ($r = 0.403$, $P = 0.001$).

Multivariate regression analysis

To assess the main independent determinants of activin A, follistatin and FSTL3 levels different stepwise multiple linear regression analyses were constructed. In each model, activin A, follistatin and FSTL3 were introduced as dependent variables. Maternal age, diagnosis of GDM, pre-pregnancy BMI, BMI gain, HOMA-IR index and triglycerides levels were introduced as variables for selection.

Activin A levels were positively associated with triglycerides concentrations and maternal age and negatively with pre-pregnancy BMI. When we also introduced follistatin and FSTL3 for selection, FSTL3 and triglycerides remained the sole positive determinants of activin A concentrations, explaining 13% of its variability (table 2).

Regarding follistatin determinants, circulating levels were negatively associated with maternal age, HOMA-IR index and the diagnosis of gestational diabetes, and positively with triglycerides concentrations. The model explained approximately 10% of follistatin variability, and the inclusion of activin A or FSTL3 did not improve the percentage explained by the model ($r^2 = 0.099$) (table 2).

FSTL3 was unrelated with any of the clinical or metabolic variables. When we introduced activin A for selection, this variable was included in the model and explained approximately 10% of the variability of FSTL3 levels ($r^2 = 0.099$) (table 2).

We also analyzed which variables were associated with birth weight, percent fat mass, fetal weight and fractional thigh volume estimated by ultrasound examination. Each one of these measures was introduced as a dependent variable and the variables for selection were activin A, follistatin, FSTL3 and all the previous maternal clinical and analytical variables.

Follistatin levels in conjunction with BMI gain and maternal pre-pregnancy BMI were positive determinants of BW SDS, PFM and FWE₃₅ SDS, whereas FTVE₃₅ SDS was exclusively related with follistatin concentrations (table 3).

Discussion

In this study, we report for the first time that serum follistatin concentrations are lower in GDM than in NGT pregnant women, although the effect size measure was 2.5%. No differences in FSTL3 and activin A serum levels were observed between the two groups. Follistatin and FSTL3 share some structural and functional homologies including inhibition of activin A bioactivity *in vivo*. They also bind other members of the TGF-beta superfamily such as myostatin with important implications in muscle development and glucose homeostasis [30]. In this line, FSTL-3 has been recently explored in the setting of pregnancy as a potential predictive biomarker for GDM with divergent results [19,20]. When this protein has been explored at the end of pregnancy, low circulating levels in parallel with a low expression in placental tissue in GDM patients have been described in a Chinese population [21]. However, our data do not support a major role of FSTL3 either in the metabolic profile observed in GDM women or in neonate anthropometric outcomes. In fact, in our cohort follistatin was the only studied protein that was weakly negatively associated with the presence of GDM and with HOMA-IR index. These data are in accordance with a recent study that reports reduced levels of circulating follistatin levels in patients with type 2 diabetes [31]. We are aware that the observational design of our study does not permit to infer mechanistic conclusions. However after controlling for other confounding factors the diagnosis of gestational diabetes remains a negative determinant of serum follistatin concentrations, leading us to suggest a possible role of follistatin in the carbohydrate metabolism during pregnancy.

Despite both follistatin and FSTL3 proteins displaying activin A inhibitory activity, they also have functional biological differences, mainly attributed to cell-surface binding activity and ligand specificity [10]. In fact, a very recent report determines that the N-terminal domain of follistatin molecules is critical for fitting ligand antagonists [32]. Thus, we believe that both molecules should be considered together to better interpret circulating levels when studying a specific condition. This may be one of the reasons for the inconsistent results observed for FSTL3 serum levels in the context of GDM-complicated pregnancy.

There are few data regarding activin A levels in the context of GDM-complicated pregnancy. Increased levels of activin A in GDM patients has been reported in previous studies [17,18] with a decrease to normal range after starting insulin therapy for diabetes

Table 2. Stepwise multiple linear regression models of activin A, follistatin and FSTL3.

Dependent Variable	Covariates	Standardized Beta	P
LogActivinA ($r^2 = 0.078$; $P = .001$)*	Triglycerides	0.217	.002
	Maternal age	0.160	.021
	LogPre-pregnancy BMI	-0.142	.044
LogActivinA ($r^2 = 0.131$; $P < .001$)**	FSTL3	0.304	<.001
	Triglycerides	0.177	.008
Follistatin ($r^2 = 0.099$; $P < .001$)	Maternal age	-0.186	.007
	LogHOMA-IR	-0.199	.008
	Triglycerides	0.177	.016
	Diagnosis of GDM	-0.138	.049
FSTL3 ($r^2 = 0.099$; $P < .001$)	LogActivin A	0.315	<.001

* Model 1: Covariates considered for selection: maternal age, diagnosis of GDM, LogHOMA-IR, LogPre-pregnancy BMI, BMI gain, and triglycerides.

**Model 2: Covariates considered for selection: The same as in model 1, follistatin and FSTL3.

r^2 : corrected R^2 .

doi:10.1371/journal.pone.0092175.t002

Table 3. Stepwise multiple linear regression models of anthropometrical and ultrasound variables.

Dependent Variables	Covariates	Standardized Beta	P
BW SDS ($r^2=0.101$; $P<.001$)	BMI gain	0.237	.001
	LogPre-pregnancy BMI	0.250	.001
	Follistatin	0.148	.031
PFM ($r^2=0.159$; $P<.001$)	BMI gain	0.317	<.001
	Follistatin	0.231	.002
	LogPre-pregnancy BMI	0.245	.002
FTVE ₃₅ SDS ($r^2=0.046$; $P=.005$)	Follistatin	0.214	.005
FWE ₃₅ SDS ($r^2=0.073$; $P=0.002$)	LogPre-pregnancy BMI	0.224	.003
	BMI gain	0.161	.030
	Follistatin	0.149	.034

Covariates considered for selection: LogActivin A, follistatin, FSTL3, maternal age, diagnosis of GDM, LogHOMA-IR, LogPre-pregnancy BMI, BMI gain and triglycerides. BW: birth weight, SDS: standard deviation score, PFM: percent fat mass, FTVE₃₅: Fractional thigh volume estimation calculated at approximately 35 weeks' gestation, FWE₃₅: fetal weight estimation calculated at approximately 35 weeks' gestation, r^2 : corrected R². doi:10.1371/journal.pone.0092175.t003

treatment. Circulating activin A concentrations have also been shown to be increased in preeclampsia and fetal growth restriction [33], but not in small-for-gestational-age newborns [5]. We have found no differences in serum activin A levels regarding carbohydrate metabolism. In our cohort, FSLT-3 and triglyceride levels were the sole determinants of circulating activin A levels. These apparent discrepancies may account for several aspects, ranging from the type of method for analyzing activin A in serum samples to the number of pregnant women recruited for our study, which is quite large in the present cohort compared to previous studies. Activin A has also been proposed to have a pro-inflammatory effect, stimulating the secretion of TNF alpha and IL6 cytokines [34], both well-known important players in the pathogenesis of insulin resistance. Despite not addressing this point in our study, the absence of association with HOMA-IR index in our patients and the similar circulating levels of this glycoprotein in healthy and GDM groups makes it unlikely for the proposed inflammatory effect of this molecule to be relevant in insulin resistance during pregnancy and in the carbohydrate metabolic defect observed in GDM patients.

An important role of activin A and follistatin has recently been described in the control of adipogenesis. Several studies identify these molecules as new adipokines expressed in adipose tissue with potential effects on obesity [9,11]. Adipokines arise as important determinants of maternal metabolic homeostasis during pregnancy. Low expression levels of follistatin in adipose tissue from obese women have been linked with insulin resistance and hypertrophic obesity traits [11]. Interestingly, in our cohort maternal circulating follistatin levels were positively associated in the whole group and in the NGT group, with several markers of fetal and neonatal adiposity although these correlations are lost in the GDM group. Despite no clear explanation for the different behavior observed between the two groups, we think that therapeutic intervention introduced in the GDM group may play a role. It is well known, that offspring of GDM-treated women normalize neonatal weight, which entails a change in fetal growth velocity and adipose tissue accretion during the third trimester. As follistatin levels were obtained before introducing therapy, the expected relationship may be altered by this intervention. In the multivariate analysis circulating follistatin concentrations emerged as positive determinants of FWE₃₅ SDS, FTVE₃₅ SDS, BW SDS and PFM at birth, independent of such well-established markers such as BMI gain

and pre-pregnancy BMI. In our study corrected R² shows low values, therefore these models are not valid for predictive purposes, and only weak associations can be inferred between the variables. However, these results open a new perspective regarding the control of fetal adiposity and body weight besides glucose metabolism during pregnancy, highlighting the role of the TGF- β system.

The strengths of our study include prospective data collection in a large cohort of pregnant women, concurrent testing of activin A, follistatin and FSTL3 in the early third trimester and a correlation of maternal serum data with ultrasound estimations and neonatal anthropometry of their offspring. This study also has some limitations. As we remark above, it is not possible to establish causality with a cross-sectional study design. Moreover, we have only included Caucasian women and so we cannot extrapolate these data to other ethnic groups. In addition, fetal adiposity has been estimated by fractional limb volume which is considered a surrogate measure.

In conclusion, we report that circulating follistatin levels are reduced in GDM compared with NGT pregnant women suggesting a possible role in glucose homeostasis during pregnancy. We also describe that maternal follistatin levels are independent positive determinants of fetal growth and neonatal adiposity suggesting that follistatin may be involved in the regulation of energy metabolism during fetal life. Further studies are needed to discern the exact role of the Activin A-Follistatin system on fetal growth and glucose metabolism in pregnancy.

Acknowledgments

The authors are grateful to Miriam Campos and Lluís Gallart from the biobank at Joan XXIII Hospital for their help in laboratory work, and to Pilar Hernandez a statistical consultant from the IISPV for her help with statistics, and to Andrew Clarke for reviewing the English in this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SN MB JV AM. Performed the experiments: XE PG. Analyzed the data: SN AM JV ISM. Contributed reagents/materials/analysis tools: SN XE MB REY ISM PG GA JV AM. Wrote the manuscript: SN XE MB REY ISM PG GA JV AM.

References

- Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S (2011) Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic? *Am J Obstet Gynecol* 204:479–487
- Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, et al. (2009) A Multicenter, Randomized Trial of Treatment for Mild Gestational Diabetes. *N Eng J Med* 361:1339–1348
- Moyer-Mileur LJ, Slater H, Thomson JA, Mihalopoulos N, Byrne J, et al. (2009) Newborn adiposity measured by plethysography is not predicted by late gestation two-dimensional ultrasound measurements of fetal growth. *J Nutr* 139:1772–1778
- Lee W, Balasubramaniam M, Deter RL, Hassan SS, Gotsch F, et al. (2009) Fetal growth parameters and birth weight: their relationship to neonatal body composition. *Ultrasound Obstet Gynecol* 33:441–446
- Bobrow GS, Holmes RP, Muttukrishna S, Mohan A, Groome N, et al. (2002) Maternal serum activin A, inhibin A, and follistatin in pregnancies with appropriately grown and small-for-gestational-age fetuses classified by umbilical artery Doppler ultrasound. *Am J Obstet Gynecol* 186:283–287
- Florio P, Luisi S, Marchetti P, Lupi R, Cobellis L, et al. (2000) Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 23:231–234
- Brun T, Franklin I, St-Onge L, Bignon-Lauer A, Schoenle EJ, et al. (2004) The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β -cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol* 167:1123–1135
- Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I (2004) Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 53:608–615
- Zaragosi LE, Wdzickowski B, Villageois P, Keophiphat M, Maumus M, et al. (2010) Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59:2513–2521
- Sidis Y, Mukherjee A, Keutmann H, Delbaere A, Sadatsuki M, et al. (2006) Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin and bone morphogenetic proteins. *Endocrinology* 147:3586–3597
- Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, Dungner E, Wahlen K, et al. (2009) Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3003–3009
- Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, Raheer MJ, Xia Y, et al. (2007) *FSTL3* deletion reveals roles for TGF- β family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1348–1353
- Florio P, Luisi S, Ciarmela P, Severi FM, Bocchi C, et al. (2004) Inhibins and activins in pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 225:93–100
- Muttukrishna S, Tannetta D, Groome N, Sargent I (2004) Activin and follistatin in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 225:45–56
- Tortoriello DV, Sidis Y, Holtzman DA, Holmes WE, Schneyer AL (2001) Human follistatin-related protein: a structural homologue of follistatin with nuclear localization. *Endocrinology* 142:3426–3434
- Ciarmela P, Florio P, Toti P, Franchini A, Maguer-Satta V, et al. (2003) Human placenta and fetal membranes express follistatin-related gene mRNA and protein. *J Endocrinol Invest* 7:641–645
- Petragnia F, De Vita D, Gallinelli A, Aguzzoli L, Genazzani AR, et al. (1995) Abnormal concentration of maternal serum activin-A in gestational diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 80:558–561
- Gallinelli A, Gallo R, Genazzani AR, Matteo ML, Caruso A, et al. (1996) Episodic secretion of activin A in pregnant women. *Eur J Endocrinol* 135:340–344
- Thadani R, Powe CE, Tjoa ML, Khankin E, Ye J, et al. (2010) First-trimester follistatin-like-3 levels in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33:664–669
- Nanda S, Savvidou M, Syngelaki A, Akolekar R, Nicolaides KH (2011) Prediction of gestational diabetes mellitus by maternal factors and biomarkers at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 31:135–141
- Hu D, Tian T, Guo J, Wang H, Chen D, et al. (2012) Decreased maternal and placental concentrations of follistatin-like 3 in gestational diabetes. *Clin Chim Acta* 22;413:533–536
- Ballesteros M, Simón I, Vendrell J, Ceperuelo-Mallafre V, Miralles R, et al. (2011) Maternal and cord blood adiponectin multimeric forms in gestational diabetes mellitus. A prospective analysis. *Diabetes Care* 34:2418–2423
- Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE) (2006) Guía asistencial de diabetes mellitus y embarazo. *Av. Diabetol* 22:73–87
- National Diabetes Data Group (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039–1057
- Carrascosa A, Ferrandez A, Yeste D, García-Dihinx JRA, Copil A, et al. (2008) Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte I: valores de peso y longitud en recién nacidos de 26–42 semanas de edad gestacional. *An Pediatr (Barc)* 68:544–551
- Catalano PM, Thomas AJ, Avallone DA, Amini SB (1995) Anthropometric estimation of Neonatal body composition. *Am J Obstet Gynecol* 173:1176–1181
- Hadlock FP, Harris RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK (1985) Estimation of fetal weight with the use of head, body and femur measurements - a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 51:333–337
- Lee W, Balasubramaniam M, Deter RL, Hassan SS, Gotsch F, et al. (2009) Fractional limb volume - a soft tissue parameter of fetal body composition: validation, technical considerations and normal ranges during pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 33:427–440
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
- Elliott B, Renshaw D, Getting S, Mackenzie R (2012) The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol* 205:324–340
- Ueland T, Aukrust P, Aakhus S, Smith C, Endresen K, et al. (2012) Activin A and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 9(3):234–237
- Cash JN, Angerman EB, Keutmann HT, Thompson TB (2012) Characterization of Follistatin-Type Domains and Their Contribution to Myostatin and Activin A Antagonism. *Mol Endocrinol* 26:1167–1178
- Wallace EM, Schneider-Kolsky ME, Edwards A, Baker L, Jenkin G (2003) Maternal serum activin A levels in association with intrauterine fetal growth restriction. *BJOG* 110:306–310
- Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP (2009) Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:153–164

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

Objetivo 5:

5.3 Tercer estudio

Gender determines the actions of adiponectin multimers on fetal growth and adiposity

Inmaculada Simón-Muela, Silvia Näf, Mónica Ballesteros, Joan Vendrell,
Victoria Ceperuelo-Mallafre, Miriam de la Flor, Ana Megia

American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2013; 208: 1.e1-1.e7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

RESEARCH

www.AJOG.org

OBSTETRICS

Gender determines the actions of adiponectin multimers on fetal growth and adiposity

Inmaculada Simón-Muela, PhD; Silvia Náf, MD; Mónica Ballesteros, PhD; Joan Vendrell, PhD; Victoria Ceperuelo-Mallafre, PhD; Miriam de la Flor, PhD; Ana Megia, PhD

OBJECTIVE: We sought to analyze the role of cord blood adiponectin and its multimeric forms in neonatal adiposity and fetal growth velocity (FGV) during the third trimester of pregnancy according to fetal gender.

STUDY DESIGN: This was a prospective analytical observational study conducted at the Diabetes and Pregnancy Unit, University Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain. In all, 96 healthy pregnant women were included in the early third trimester and were followed up until delivery. Maternal blood was obtained upon recruitment, and cord blood was obtained at delivery. Serial fetal ultrasounds were performed during the third trimester to assess FGV. Skinfolds were measured after birth to assess neonatal adiposity. Adiponectin multimers were determined in maternal and cord blood.

RESULTS: In female neonates, adiposity and FGV in the late third trimester were correlated positively with cord blood insulin ($r = 0.343$, $P = .015$ and $r = 0.430$, $P = .002$, respectively) and maternal

pregravid body mass index ($r = 0.597$, $P < .001$ and $r = 0.428$, $P = .002$, respectively), and negatively with maternal high-molecular-weight (HMW)/total adiponectin ratio ($r = -0.269$, $P = .035$ and $r = -0.387$, $P = .005$, respectively), but in the stepwise multiple regression model, the main determinants were cord blood insulin, pregravid body mass index, and cord blood HMW adiponectin. Otherwise, in male neonates, adiposity and fetal growth were correlated with cord blood low-molecular-weight adiponectin ($r = 0.486$, $P = .003$ and $r = 0.394$, $P = .020$, respectively), and it was this multimeric form that emerged as an independent determinant in the stepwise regression model.

CONCLUSION: Adiponectin seems to determine fetal growth and adipose tissue accretion, and low molecular weight is more specifically implicated in males, whereas the HMW isoform may be more important in females.

Key words: adiponectin, fetal growth, neonatal adiposity

Cite this article as: Simón-Muela I, Náf S, Ballesteros M, et al. Gender determines the actions of adiponectin multimers on fetal growth and adiposity. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:481.e1-7.

Fetal growth is the result of integrated interplay among genetic, nutritional, and endocrine factors. Birthweight (BW) is considered a marker of fetal well-being and it has been

correlated with body composition in neonates. However, sometimes weight alone is not a sufficiently sensitive parameter to determine appropriate fat deposits. Fat mass (FM) has a huge

capacity for altering this body compartment as a result of intrauterine growth and is a more sensitive indicator of the fetal nutritional status than lean body mass, which has a greater genetic influence.^{1,2} Recently there has been growing interest in the study of factors that modify intrauterine growth and the effect it could have on the appearance of diseases later in life.³ Obstetric ultrasound is a good tool to assess prenatal nutritional status and fetal growth pattern,⁴ and the use of longitudinal data in the third trimester in relation to metabolic and clinical parameters can allow us to identify potential markers of fetal well-being and adipose tissue accretion.

Insulin is one of the best known key regulators of fetal growth, but recently some adipokines have also emerged as a link among maternal metabolism, insulin resistance, and fetal growth.⁵ In this context, adiponectin, a protein with insulin-sensitizing actions involved in

From the Division of Endocrinology, Department of Medicine (Drs Simón-Muela, Náf, Vendrell, and Megia), and the Department of Obstetrics and Gynecology (Drs Ballesteros and de la Flor), Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona; Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (Drs Simón-Muela, Náf, Vendrell, and Megia) and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (Dr Ceperuelo-Mallafre), Instituto de Salud Carlos III, Madrid; and Hospital Virgen de la Victoria, Málaga (Dr Ceperuelo-Mallafre), Spain.

Received Oct. 26, 2012; revised Jan. 7, 2013; accepted Feb. 25, 2013.

This study was supported by grant numbers FIS PS09/02152 and FIS P112/0717, cosponsored by Fondos de Desarrollo Regional and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem) (CB07/08/0012). M.B. received a Maternal and Fetal Medicine grant from the Fundació Santiago Dexeus Font. V.C-M. is supported by a fellowship from the Juan de la Cierva program and grant number JCI-2010-06395. A.M. received a grant in 2010 from Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili for Programa d'ajuts per el desenvolupament de la recerca. CIBERdem is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

The authors report no conflict of interest.

Reprints: Ana Megia, PhD, Endocrinology and Nutrition Section, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, c/o Dr Mallafre Guasch, 4, 43007, Tarragona, Spain. amegia.hj23.ics@gencat.cat.

0002-9378/\$36.00 © 2013 Mosby, Inc. All rights reserved. • <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.02.045>

energy homeostasis in adults, could be expected to have a significant effect on fetal growth and development.⁶ Adiponectin circulates in different-sized complexes: trimers (low molecular weight [LMW]), hexamers (medium molecular weight [MMW]), and multimers (high molecular weight [HMW]) containing ≥ 18 monomeric subunits. The distribution and the amount of the different multimeric forms seem to be essential for its biological effects.^{7,8} Adiponectin is present during fetal life and its levels increase gradually from midgestation until delivery⁹ and for this reason it has been suggested that it could play a role in fetal growth and adipose tissue deposition.⁵ However, data in the literature are scarce and sometimes contradictory.¹⁰⁻¹⁶ The information about the distribution of its multimeric forms in cord blood and its relationship with neonatal weight and adiposity are also greatly limited.¹⁷ Recently, we have described a close relationship with ponderal index, a surrogate marker of adiposity, suggesting a role of these multimeric forms in fetal adiposity.¹⁸ In this line, Basu et al¹⁷ reported a correlation between the HMW isoform and neonatal adiposity in female neonates, but not in their male counterparts.

Gender dimorphism in fetal growth and fetal mass accretion has been observed previously. Female fetuses increase their percentage body fat to a greater extent than their male counterparts in the third trimester of pregnancy¹⁹ and male infants seem to be more vulnerable to undernutrition, as evidenced by a greater risk of later cardiovascular disease in the offspring of women exposed to famine.²⁰

The aim of this work was to study in greater depth the relationship of umbilical adiponectin and its multimeric forms with fetal growth and neonatal body composition in a cohort of newborn infants of healthy pregnant women and to determine whether adipose tissue accretion in the third trimester of pregnancy could be related with these parameters. We hypothesized that the concentration of the multimeric forms and their distribution could be determinants of neonatal body

composition and fetal growth and that this relationship could be modified by gender.

MATERIALS AND METHODS

This is a prospective analytical observational study of neonates delivered to women who were invited to participate in this study conducted at the University Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain. It was approved by the center's research ethics board and all subjects provided their written informed consent. In all, 377 pregnant Caucasian women were recruited at the time of antepartum screening for gestational diabetes mellitus between weeks 26-30 of pregnancy. Women with an abnormal 1-hour 50-g glucose challenge test finding underwent a 3-hour 100-g oral glucose tolerance test. Maternal blood samples (10 mL in silicone and 10 mL in EDTA tube) were obtained at the time of recruitment. Cord blood samples (10 mL in silicone and 10 mL in EDTA tube) were collected at the time of delivery from the umbilical vein before placental separation. Blood samples were centrifuged at 5000 g for 15 minutes. Serum and plasma samples were frozen and kept at -70°C in a gestational diabetes mellitus biobank collection until assay. In this study, we included 96 women who recorded a 3-hour 100-g oral glucose tolerance test, according to National Diabetes Data Group criteria,²¹ and who fulfilled the following criteria at the end of pregnancy: (1) a singleton pregnancy; (2) accurate gestational age confirmed by ultrasound examination < 20 weeks of gestation; (3) absence of fetal anomalies identified at birth; (4) at least 2 ultrasound explorations, one at recruitment and another in the middle of the third trimester; (5) cord blood sample obtained at delivery; and (6) neonatal biometry within 48 hours of delivery.

Clinical and demographic data

Upon inclusion, demographic and historical information was collected by an interviewer administering a questionnaire that included patient demographics, personal medical information, and information regarding the current

and previous pregnancies. Height was also recorded, as was weight before and at the end of pregnancy. Body mass index (BMI) was calculated using the formula: $\text{BMI} = \text{weight (kg)}/\text{height (m)}^2$. Increase in BMI was calculated by the formula: $\text{BMI gain} = (\text{final BMI}) - (\text{pregravid BMI})$.

Newborn infants (neonates) were evaluated in the first 48 hours of life. Neonatal length and weight were determined using a measuring board to the nearest 0.1 cm and a calibrated scale to the nearest 10 g. Triceps, biceps, subscapular, and flank skinfold thickness were assessed with a Holtain skinfold caliper (Chasmors Ltd, London, United Kingdom). Each skinfold was measured at least 3 times until a consistent and stable reading was obtained. All skinfold measurements were taken from the left side by the same physician experienced in the technique (A.M.). The sum of the 4 skinfolds (SSF) was used to estimate neonatal adiposity. BW was transformed into SD score (SDS) using gender-specific references of fetal growth.²²

Fetal ultrasound

One examiner performed all ultrasound examinations using color Doppler ultrasound equipment (RAB 4-8L, Voluson 730 Expert; General Electric Medical Systems, Zipf, Austria) incorporating hybrid mechanical and curved-array abdominal ultrasonic transducers. Fetal weight estimations were calculated at approximately 28 (range, 27-30) and 35 (range, 34-36) weeks' gestation from femur length, biparietal diameter, and abdominal circumference using the equation of Hadlock et al.²³ The fetal weight estimates were transformed into SDS using gender-specific references of fetal growth.²² Fetal growth velocity (FGV) in the early third trimester (FGV_E) was determined by linear regression between the 2 ultrasound measurements.²⁴ FGV_L was calculated by linear regression between the last ultrasound and neonatal weight at delivery. Both measurements were expressed as ΔSDS per week. All ultrasound examinations were performed by the same experienced obstetrician (M.B.).

Laboratory measurements

Glucose levels were determined using an autoanalyzer (ADVIA 2400; Siemens AG, Munich, Germany) with the standard enzyme methods. Fasting plasma insulin and C-peptide were determined by immunoassay system (ADVIA Centaur, Siemens AG). This assay shows a cross-reactivity of <0.1% to intact human proinsulin and the primary circulating split form Des (31,32) proinsulin. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was determined according to the formula proposed by Matthews et al.²⁵

Serum adiponectin levels were determined using a human enzyme-linked immunosorbent assay kit (Multimeric Adiponectin ELISA Kit, Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland). The intra-assay and interassay coefficients of variation were <15%, and assay sensitivity was 0.08 ng/mL. We calculated the ratio of HMW/total adiponectin levels (SA) for maternal and cord blood adiponectin concentrations, mSA and cbSA, respectively.

Statistics

All statistical analyses were performed using software (SPSS 13.0; IBM Corp, Armonk, NY). We performed the 1-sample Kolmogorov-Smirnov test to verify the normal distribution of the quantitative variables. Normally distributed data were expressed as mean \pm SD, whereas variables with a skewed distribution were represented as median (interquartile range). Categorical variables were reported as numbers (percentages). Student *t* test analysis was used to compare the mean value of normally distributed continuous variables. For variables with skewed distributions, we used the Mann-Whitney *U* test. To analyze the differences in nominal variables between groups we performed the χ^2 test. Linear associations between variables were assumed after checking them by scatter plots (not shown). Pearson correlation coefficient was used to analyze the bivariate correlation between FGV and neonatal anthropometric parameters with clinical and metabolic parameters, including maternal and neonatal adiponectin concentrations.

TABLE 1

Maternal, fetal, and neonatal characteristics of population studied

Characteristic	Male (43)	Female (53)	<i>P</i> value
Maternal age, y	31.00 \pm 4.69	31.87 \pm 5.08	.391
Multiparous, n (%)	19 (44.19)	25 (47.17)	.838
Tobacco, n (%)	4 (9.30)	11 (20.75)	.162
Pregravid BMI, kg/m ²	25.57 \pm 5.90	24.41 \pm 4.92	.296
Gain in BMI, kg/m ²	4.35 \pm 2.03	5.41 \pm 2.03	.013
Maternal insulin, mU/L	9.13 (6.52–14.34)	7.05 (5.50–13.27)	.088
HOMA-IR units	1.94 (1.25–2.88)	1.46 (1.10–2.76)	.240
mAdiponectin, μ g/mL	5.88 \pm 2.32	5.87 \pm 2.18	.975
mHMW, μ g/mL	3.35 \pm 1.60	3.31 \pm 1.66	.905
mMMW, μ g/mL	1.25 \pm 0.57	1.20 \pm 0.47	.632
mLMW, μ g/mL	1.28 \pm 1.00	1.39 \pm 0.85	.580
mSA	0.55 \pm 0.13	0.55 \pm 0.12	.747
cbAdiponectin, μ g/mL	17.61 \pm 5.44	18.45 \pm 6.45	.495
cbHMW, μ g/mL	12.39 \pm 0.45	13.00 \pm 5.05	.534
cbMMW, μ g/mL	3.47 \pm 1.58	3.12 \pm 1.64	.288
cbLMW, μ g/mL	2.51 \pm 1.60	2.60 \pm 1.90	.832
cbSA	0.70 \pm 0.12	0.70 \pm 0.07	.891
Gestational age at delivery, wk	39.14 \pm 1.78	39.70 \pm 1.51	.100
BW, g	3255.58 \pm 535.25	3319.42 \pm 487.59	.543
SSF, mm	15.40 \pm 2.77	15.83 \pm 2.81	.469
BW SDS	−0.031 \pm 1.149	0.280 \pm 1.076	.175
cbInsulin, mU/L	4.27 (2.15–6.26)	4.34 (2.47–8.12)	.289
FGV _E Δ SDS/wk	0.62 \pm 1.07	0.90 \pm 2.03	.217
FGV _L Δ SDS/wk	−0.04 \pm 1.27	0.25 \pm 1.19	.259
Fetal weight estimate 28-30 wk, SD	0.94 \pm 0.76	1.10 \pm 0.73	.393
Fetal weight estimate 34-36 wk, SD	0.67 \pm 0.87	0.88 \pm 0.80	.229

Data are presented as mean \pm SD or median (interquartile range), unless otherwise indicated.

BMI, body mass index; BW, birthweight; cbAdiponectin, cord blood adiponectin; cbHMW, cord blood high molecular weight; cbInsulin, cord blood insulin; cbLMW, cord blood low molecular weight; cbMMW, cord blood medium molecular weight; FGV_E, fetal growth velocity in early third trimester; FGV_L, fetal growth velocity in late third trimester; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; mAdiponectin, maternal adiponectin; mHMW, maternal high molecular weight; mLMW, maternal low molecular weight; mMMW, maternal medium molecular weight; SDS, SD score; Δ SDS, change in SD; SSF, sum of 4 skinfolds.

Simón-Muela. Adiponectin multimers and neonatal fat mass. *Am J Obstet Gynecol* 2013.

Finally, to identify the parameters that best predicted FGV, BW SDS, and SSF, we performed a multiple regression analysis using the stepwise option of the SPSS software including these variables as dependent variables. The significance to drop (probability OUT) was 0.1 and to add (probability IN) was 0.5. Cord blood insulin (cbInsulin), maternal insulin, and HOMA-IR were

log transformed before bivariate and multivariate analysis. A *P* value < .05 was considered significant.

RESULTS

Maternal and newborn infant characteristics by gender are shown in Table 1. In all, 43 male and 53 female neonates were included in the study. The clinical and metabolic characteristics of both

TABLE 2

Significant Pearson correlation coefficients observed between BW SDS, and/or SSF with some maternal and fetal parameters

Variable	Whole group (96)				Males (43)				Females (53)			
	BW SDS	P value	SSF	P value	BW SDS	P value	SSF	P value	BW SDS	P value	SSF	P value
Pregravid BMI ^a	0.209	.041	0.349	.001	0.043		0.110		0.403	.003	0.597	< .001
Glucose	0.157		0.204	.049	0.045		0.060		0.228		0.319	.023
mSA	-0.299	.003	-0.251	.015	-0.178		-0.196		-0.407	.002	-0.269	.035
HOMA-IR ^a	0.073		0.156		-0.084		0.006		0.245		0.309	.029
cbAdiponectin	0.148		0.230	.026	-0.045		0.290		0.227		0.185	
cbLMW	0.194		0.233	.035	0.400	.017	0.486	.003	0.060		0.078	
cbInsulin ^a	0.395	< .001	0.284	.006	0.325	.038	0.190		0.431	.001	0.343	.015

BMI, body mass index; BW, birthweight; cbAdiponectin, cord blood adiponectin; cbInsulin, cord blood insulin; cbLMW, cord blood low molecular weight; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; SDS, SD score; SSF, sum of 4 skinfolds.

^a Log transformed before analysis. For pregravid BMI, only in whole group analysis.

Simón-Muela. Adiponectin multimers and neonatal fat mass. *Am J Obstet Gynecol* 2013.

groups were similar except for BMI gain, which was higher in the mothers of female neonates ($P = .013$) compared to mothers of male neonates.

Univariate analysis of BW and neonatal body composition with clinical and metabolic parameters

Whole group

The SSF and BW SDS were positively related with pregravid BMI ($r = 0.349$, $P = .001$ and $r = 0.209$, $P = .041$, respectively) and cbInsulin ($r = 0.284$, $P = .006$ and $r = 0.395$, $P < .001$, respectively), and negatively correlated with mSA ($r = -0.251$, $P = .015$ and $r = -0.299$, $P = .003$, respectively). In addition, the SSF was positively related with cord blood adiponectin ($r = 0.230$, $P = .026$), cord blood LMW (cbLMW) ($r = 0.233$, $P = .035$), and fasting maternal glucose levels ($r = 0.204$, $P = .049$). SSF and BW SDS were unrelated with gestational age at delivery, cord blood HMW, cord blood MMW, or any of the other clinical or metabolic maternal parameters considered.

Female neonates

Both BW SDS and the SSF were positively associated with cbInsulin ($r = 0.431$, $P = .001$ and $r = 0.343$, $P = .015$, respectively) and pregravid BMI ($r = 0.403$, $P = .003$ and $r = 0.597$, $P < .001$,

respectively), and negatively related to mSA ($r = -0.407$, $P = .002$ and $r = -0.269$, $P = .035$, respectively). The strength of these associations increased compared to the whole group. The SSF was also positively correlated with maternal glucose ($r = 0.319$, $P = .023$) and HOMA-IR ($r = 0.309$, $P = .029$) (Table 2). No correlation was observed between cord blood adiponectin and BW SDS or neonatal adiposity.

Male neonates

cbLMW was positively correlated with BW SDS ($r = 0.400$, $P = .017$) and SSF ($r = 0.486$, $P = .003$). cbInsulin was also positively correlated with BW SDS ($r = 0.325$, $P = .038$) but unrelated with SSF. No other relationship was observed (Table 2).

Univariate analysis of FGV with clinical and metabolic parameters

Whole group

FGV_E and FGV_L were positively correlated with cbInsulin ($r = 0.230$, $P = .029$ and $r = 0.386$, $P < .001$, respectively) and inversely associated with mSA ($r = -0.263$, $P = .011$ and $r = -0.277$, $P = .007$, respectively). We also observed that FGV_E was positively correlated with maternal LMW concentrations ($r = 0.258$, $P = .013$), but this association was not found in the late third trimester. In contrast, cbLMW was positively

associated with FGV_L ($r = 0.219$, $P = .048$) (Table 3).

Female neonates

Pregravid BMI was positively related with FGV_E and FGV_L ($r = 0.393$ and $r = 0.428$, respectively; $P < .01$ for both). Also, FGV_L was positively and strongly related with cbInsulin levels ($r = 0.430$, $P = .002$) and negatively related with mSA ($r = -0.387$, $P = .005$).

BW SDS and the SSF were strongly and positively related with both FGV_E ($r = 0.588$ and $r = 0.629$, respectively; $P < .001$ for both) and FGV_L ($r = 0.883$ and $r = 0.997$, respectively; $P < .01$ for both). Correlation coefficients are shown in Table 3.

Male neonates

FGV_E was positively correlated with maternal adiponectin ($r = 0.356$, $P = .046$), maternal LMW ($r = 0.356$, $P = .021$), and cbLMW ($r = 0.348$, $P = .040$) whereas FGV_L was positively related with cbInsulin ($r = 0.318$, $P = .043$) and cbLMW ($r = 0.392$, $P = .020$). No relationship with pregravid BMI or BMI gain was observed.

BW and the SSF were also strongly and positively related with both FGV_E ($r = 0.606$ and $r = 0.638$, respectively; $P < .001$ for both) and FGV_L ($r = 0.831$ and $r = 0.997$, respectively; $P < .01$ for both). Data are presented in Table 3.

TABLE 3
Significant Pearson correlation coefficients observed between FGV in early and late third trimester and some maternal and fetal parameters

Variable	Whole group		Female				Male					
	FGV _E	P value	FGV _L	P value	FGV _E	P value	FGV _L	P value	FGV _E	P value	FGV _L	P value
Pregravid BMI ^a	0.111		0.033		0.393	.004	0.428	.002	0.119		0.080	
mAdiponectin	0.106		-0.002		-0.070		-0.063		0.356	.021	0.062	
mLMW	0.258	.013	0.120		0.148		0.181		0.356	.021	0.049	
mSA	-0.263	.011	-0.277	.007	-0.272		-0.387	.005	-0.245		-0.163	
cbLMW	0.051		0.219	.048	0.148		0.181		0.348	.040	0.392	.020
Cb insulin ^a	0.230	.029	0.386	< .001	0.177		0.430		0.284		0.318	.043
BW	0.598	< .001	0.855	< .001	0.588	< .001	0.883	< .001	0.606	< .001	0.831	.001
BW SDS	0.639	< .001	0.997	< .001	0.629	< .001	0.997	< .001	0.638	< .001	0.997	< .001
SSF	0.441	< .001	0.606	< .001	0.389	.006	0.547	.001	0.493	.001	0.666	< .001

BMI, body mass index; BW, birthweight; cbInsulin, cord blood insulin; cbLMW, cord blood low molecular weight; FGV_E, fetal growth velocity in early third trimester; FGV_L, fetal growth velocity in late third trimester; mAdiponectin, maternal adiponectin; mLMW, maternal low molecular weight; SDS, SD score; SSF, sum of 4 skinfolds.

^a Log transformed before analysis. For pregravid BMI, only in whole group analysis.

Simón-Muela. Adiponectin multimers and neonatal fat mass. Am J Obstet Gynecol 2013.

Multiple regression analysis

To further determine the variables that better explained BW and neonatal adiposity, we constructed a stepwise multiple linear regression model in which BW SDS and the SSF were introduced as dependent variables, and maternal age, pregravid BMI, HOMA-IR, mSA, glucose, cbInsulin, and cord blood adiponectin multimers were the variables introduced for selection. cbInsulin and cbLMW emerged as positive, independent determinants of BW SDS in male neonates, explaining 28.3% of the BW variation. cbLMW was the sole determinant of the SSF in the male group explaining approximately 22% of the variance. An increase in 1 U of cbLMW corresponded to a 0.258 SD increase (95% confidence interval, 0.025–0.490) in BW SDS and a 0.826-mm increase (95% confidence interval, 0.269–1.383) in the SSF value (Table 4).

On the other hand, in the female group, cbInsulin, pregravid BMI, and cord blood MMW adiponectin emerged as positive predictors of BW SDS. Adiposity in this group was also positively associated with cbInsulin and pregravid BMI, but in this case the most relevant multimer was the HMW isoform. These models reconciled 43.1%

and 57.7% of the variance of BW SDS and SSF, respectively (Table 4).

We also explored the independent relationships between umbilical adiponectin multimers and FGV in the third trimester. Similar stepwise regression analyses were performed with dependent variables FGV_E and FGV_L. In male

neonates, for dependent variables FGV_E and FGV_L, cbLMW and cbInsulin emerged as independent determinants. These models explained 19.1% of the variance of FGV_E and 27.1% of the variance of FGV_L. In female neonates, maternal age and pregravid BMI were the independent predictors of FGV_E.

TABLE 4
Stepwise linear regression for BW, SDS, and SSF in male and female neonates

Gender	Dependent variables	Independent variable	Unstandardized B coefficient (95% CI)	P value
Male	BW SDS (model $r^2 = 0.283$)	cbInsulin ^a	1.282 (0.206–2.357)	.021
		cbLMW	0.258 (0.025–0.490)	.031
	SSF ($r^2 = 0.222$)	cbLMW	0.826 (0.269–1.383)	.032
Female	BW SDS ($r^2 = 0.431$)	cbInsulin ^a	0.939 (0.303–1.576)	.005
		Pregravid BMI	0.098 (0.043–0.153)	.001
		cbMMW	0.196 (0.030–0.362)	.031
	SSF ($r^2 = 0.557$)	Pregravid BMI	0.388 (0.260–0.516)	< .001
		cbInsulin ^a	1.859 (0.451–3.268)	.011
		cbHMW	0.145 (0.033–0.258)	.016

BMI, body mass index; BW, birthweight; cbHMW, cord blood high molecular weight; cbInsulin, cord blood insulin; cbLMW, cord blood low molecular weight; cbMMW, cord blood medium molecular weight; CI, confidence interval; SDS, SD score; SSF, sum of 4 skinfolds.

^a Log transformed for analysis.

Simón-Muela. Adiponectin multimers and neonatal fat mass. Am J Obstet Gynecol 2013.

TABLE 5

Stepwise multiple regression model for FGV in early and late third trimester in male and female neonates

Gender	Dependent variables	Independent variable	Unstandardized B coefficient (95% CI)	P value
Male	FGV _E (model $r^2 = 0.239$)	cbLMW	0.241 (0.012–0.470)	.039
		cbInsulin ^a	1.061 (0.001–2.121)	.049
	FGV _L ($r^2 = 0.271$)	cbInsulin ^a	1.389 (0.191–2.588)	.025
Female	FGV _E ($r^2 = 0.233$)	cbLMW	0.277 (0.018–0.536)	.037
		Pregravid BMI	0.090 (0.031–0.148)	.003
	Age	–0.060 (–0.116 to –0.003)	.039	
	FGV _L ($r^2 = 0.478$)	cbInsulin ^a	1.246 (0.474–2.018)	.002
		Pregravid BMI	0.080 (0.16–0.145)	.017
		cbHMW	0.064 (0.009–0.119)	.024
mSA		–3.067 (–5.825 to –0.289)	.031	

BMI, body mass index; cbHMW, cord blood high molecular weight; cbInsulin, cord blood insulin; cbLMW, cord blood low molecular weight; CI, confidence interval; FGV_E, fetal growth velocity in early third trimester; FGV_L, fetal growth velocity in late third trimester.

^a Log transformed for analysis.

Simón-Muela. Adiponectin multimers and neonatal fat mass. *Am J Obstet Gynecol* 2013.

This model reconciled 23.3% of the variance of FGV_E. For dependent variable FGV_L, mSA emerged as an independent and negative determinant, while cbInsulin, pregravid BMI, and cord blood HMW emerged as positive, independent determinants, with this model explaining the 47.8% variance of FGV in this period (Table 5).

COMMENT

In this study we report that fetal growth and adipose tissue accretion during fetal life may be mediated by cord blood adiponectin with marked gender dimorphism regarding molecular isoforms, with LMW in males and HMW in females being the main isoforms involved. Furthermore, fetal insulin levels and maternal metabolic status seem to play a more important role in female than male infants.

Despite the fact that several pieces of evidence have suggested a role of adiponectin in FM accretion and growth regulation during fetal life,¹⁷ the relationship reported of maternal or umbilical adiponectin with BW has been inconsistent.^{10–16} In our cohort, maternal adiponectin concentrations were unrelated

with neonatal anthropometric measures, but, in agreement with a previous report, mSA was found to be inversely related with BW and fetal adiposity.²⁶ On the other hand, cord blood adiponectin, and in particular the LMW isoform, was positively related with neonatal adiposity, reinforcing experimental data that show a potential role of this adipokine in fetal adipogenesis.²⁷ These results are in line with some previous reports in which total cord blood adiponectin was associated with BW and skinfold thicknesses in Asiatic populations^{10,11} and with neonatal adiposity measure by anthropometric methods at birth in the female neonates of Caucasian women.¹⁷

It is worth mentioning that circulating multimeric forms influence biological activity of adiponectin.^{8,27,28} Thus, total adiponectin levels may not adequately reflect the effects of this adipokine on metabolic events. Interestingly, in our study we have observed that its multimeric forms exert a different influence on FM accretion during fetal life depending on neonate gender. The cbLMW isoform emerged as the main determinant of subcutaneous FM in

male neonates, whereas cbInsulin and the HMW isoform were more relevant in female neonates. This gender dimorphism of the adiponectin multimeric forms on neonatal FM has also been described by Basu et al.¹⁷ In their report, the HMW isoform was associated with neonatal adiposity only in female neonates, but no other isoforms were determined. These observations lead us to speculate that fetal gender dimorphism could determine multimeric adiponectin distribution and some differences in its metabolic events (mainly insulin sensitizer activity) influencing fat deposition during fetal life.

Recently, it has become apparent that cord blood C-peptide concentrations, as a surrogate marker of insulin levels, are higher in female than in male neonates, determining a slower growth velocity during the first year of life.²⁹ In our cohort, we have also observed a gender dimorphism regarding cbInsulin levels and adiposity. Insulin and LMW concentrations in cbInsulin were independent predictors of FGV in male neonates. In female neonates, in the early third trimester, maternal factors, such as pregravid weight and age were the most important determinants of fetal growth, whereas in the late third trimester, fetal insulin and HMW concentrations became relevant. Furthermore, the HMW to total adiponectin ratio in maternal serum seems only to be a negative determinant of fetal growth in females, suggesting that lower mSA might be associated with a higher transfer of nutrients across the placenta.

Our findings highlight the role of this adipokine in fetal growth and adipose tissue accretion during pregnancy and should be considered in future studies searching for biomarkers with predictive value in some chronic diseases in adult life such as type 2 diabetes or obesity.

Little is known about the regulation of adiponectin secretion and the role of its molecular forms in fetal life. In adults, these forms are prevalently active in peripheral tissues and in the central nervous system. One is tempted to extrapolate the effect of these isoforms observed in adult life to the fetal being, hypothesizing a possible contribution in

the programming of adipose tissue intrauterine. In fact, umbilical adiponectin has been related with the degree of adiposity later in childhood.³⁰

We are aware of some of the limitations of this study that must be acknowledged. Body composition was assessed by anthropometric measurements, a noninvasive method validated as a measure of body fat in neonates and children.³¹ This method allows us to evaluate only subcutaneous FM, omitting information with regard to the amount of visceral fat.

CONCLUSIONS

In summary, we report that fetal adiponectin multimers are related with fetal growth and neonatal body composition in the neonates of healthy pregnant women, and that the relevance of the multimeric form depends on the gender of the neonate. Besides, maternal factors such as pregravid weight and metabolic markers seem to be more important determinants of adiposity in females than in males. As there is increasing evidence that newborn body composition may be related with the appearance of diseases later in life, such as obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes, we believe that greater knowledge of hormonal factors, particularly adipokines, and metabolic factors involved in the regulation of fetal growth and fat deposition is mandatory. ■

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Miriam Campos and Lluís Gallart from the biobank at University Hospital Joan XXIII for their help with laboratory work.

REFERENCES

- Sparks JW. Human intrauterine growth and nutrient accretion. *Semin Perinatol* 1984;8:74-93.
- Knight B, Shield BM, Turner M, Powell RJ, Yajnik CS, Hattersley AT. Evidence of genetic regulation of fetal longitudinal growth. *Early Hum Dev* 2005;81:823-31.
- Symonds ME, Pope M, Sharkey D, Budge H. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia* 2012;55:1597-606.
- Shepard MJ, Richards UA, Berkowitz RL, Warsoff SL, Hobbins JC. An evaluation of two equations for predicting fetal weight by ultrasound. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:47-54.
- Briana DD, Malamitsi-Puchner A. The role of adipocytokines in fetal growth. *Ann NY Acad Sci* 2010;1205:82-7.
- Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Adiponectin action from head to toe. *Endocrinology* 2010;37:11-32.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004;94:e27-31.
- Wang Y, Lam KSL, Yau M, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 2008;409:623-33.
- Kajantie E, Hyttinanti T, Hovi P, Andersson S. Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4031-6.
- Chan TF, Yuan SS, Chen HS, et al. Correlations between umbilical and maternal serum adiponectin levels and neonatal birth weights. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:165-9.
- Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, et al. Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy neonates: positive correlation with birth weight and neonatal adiposity. *Clin Endocrinol* 2004;61:88-93.
- Weyermann M, Beermann C, Brenner H, Rothenbacher D. Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clin Chem* 2006;52:2095-102.
- Lindsay RS, Walker JD, Havel PJ, et al. Adiponectin is present in cord blood but is unrelated to birth weight. *Diabetes Care* 2003;26:2244-9.
- Odden N, Mørkrid L. High molecular weight adiponectin dominates in cord blood of newborns but is unaffected by pre-eclamptic pregnancies. *Clin Endocrinol* 2007;67:891-6.
- Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, et al. Maternal and fetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:447-53.
- Nakano Y, Itabashi K, Maruyama T. Association between serum adipocytokine and cholesterol levels in cord blood. *Pediatr Int* 2009;51:790-4.
- Basu S, Laffineuse L, Presley L, Minium J, Catalano PM, Haugel-de Monzon S. In utero gender dimorphism of adiponectin reflects insulin sensitivity and adiposity of the fetus. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1144-9.
- Ballesteros M, Simón I, Vendrell J, et al. Maternal and cord blood adiponectin multimeric forms in gestational diabetes mellitus: a prospective analysis. *Diabetes Care* 2011;34:2418-23.
- Hawkes CP, Hourihane JOB, Kenny LC, Irvine AD, Kiely M, Murray DM. Gender- and gestational age-specific body fat percentage at birth. *Pediatrics* 2011;128:e645-51.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bieker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999;70:811-6.
- National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-57.
- Carrascosa A, Ferrandez A, Yeste D, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte I: valores de peso y longitud en recién nacidos de 26-42 semanas de edad gestacional. *An Pediatr (Barc)* 2008;68:544-51.
- Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements—a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:333-7.
- Larsen T, Greisen G, Petersen S. Intrauterine growth correlation to postnatal growth—influence of risk factors and complication in pregnancy. *Early Hum Dev* 1997;47:157-65.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1995;28:412-9.
- Ong GK, Hamilton JK, Sermer M, et al. Maternal serum adiponectin and infant birthweight: the role of adiponectin isoform distribution. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:108-14.
- Koenen RB, van Tits LJH, Holveijn S, et al. Adiponectin multimer distribution in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:164-8.
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003;278:40352-63.
- Regnault N, Botton J, Heude B, et al. Higher cord C-peptide concentrations are associated with slower growth rate in the 1st year of life in girls but not in boys. *Diabetes* 2011;60:2152-9.
- Mantzoros CS, Rifas-Shiman SL, Williams CJ, Fargnoli JL, Kelesidis T, Gillman MW. Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: a prospective cohort study. *Pediatrics* 2009;123:682-9.
- Schmelzle HR, Fusch C. Body fat in neonates and young infants: validation of skinfold thickness versus dual-energy x-ray absorptiometry. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1096-100.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

6. DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

La DMG aparece cuando la secreción de insulina por las células β es insuficiente para hacer frente a la resistencia a la insulina que aparece a lo largo de la gestación (41). En los últimos años existe un especial interés en conocer la contribución de algunas adipoquinas a la fisiopatología de la DMG, dado su papel modulador en la resistencia a la insulina. En nuestros trabajos hemos estudiado el papel de alguna de estas nuevas proteínas en la fisiopatología de la DMG. Entre ellas, hemos escogido ZAG y el sistema activina A-follistatina dada su relación fuera de la gestación con el metabolismo glucídico.

Por otro lado, la insulina es uno de los elementos esenciales reguladores del crecimiento fetal, y dado que las adipoquinas tienen un efecto modulador sobre la acción de la insulina han emergido como posible nexo de unión entre el metabolismo materno, resistencia a la insulina y crecimiento fetal. Por ello, en nuestros trabajos hemos valorado también la contribución de ZAG y del sistema activina A-follistatina al crecimiento fetal. Por último dado el dimorfismo sexual en el crecimiento fetal hemos querido estudiar si el sexo puede influir en los niveles de los multímeros de adiponectina afectando al crecimiento fetal.

ZAG sérico en diabetes mellitus gestacional. Correlación con parámetros metabólicos y adiponectina sérica

Como se ha comentado en la introducción, ZAG es esencialmente una adipoquina lipolítica y su expresión se ve disminuida en el tejido adiposo de obesos (200,203-206). Su expresión en tejido adiposo presenta una marcada correlación con la expresión de adiponectina (182,201,206) y la administración de ZAG aumenta la expresión de esta adipoquina (182), por lo

que se ha especulado que ZAG promueve el efecto sensibilizador a la insulina de adiponectina (200). Fuera de la gestación, varios estudios han objetivado que la expresión de ZAG se asocia de forma negativa con resistencia a la insulina medida por HOMA-IR lo que podría indicar un papel protector de ZAG en el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina (182,198,201,206).

En base a estas asociaciones descritas en otros grupos de población, consideramos que el estudio de esta proteína en una situación fisiológica de resistencia a la insulina, como es la gestación, podría arrojar algo de luz al papel de esta proteína en el contexto de la resistencia a la insulina.

A pesar de objetivar que los niveles de ZAG se asocian de forma negativa con la resistencia a la insulina medida por HOMA-IR y con los niveles de triglicéridos, y positivamente con los niveles de colesterol-HDL, no hemos conseguido demostrar diferencias en los niveles circulantes entre las gestantes sanas y las pacientes con DMG. Si bien existen datos indirectos que sugieren que puede asociarse con un mejor perfil metabólico, no se ha mostrado como un marcador útil capaz de diferenciar a las mujeres con DMG en nuestra cohorte. Al realizar el análisis de regresión multivariable para determinar el peso real de las asociaciones halladas, el colesterol-HDL es el único que aparece como predictor positivo de los niveles séricos de ZAG lo que cuestiona la utilidad real de esta adipoquina como marcador de un buen perfil metabólico, al menos en la gestación. Tan solo existe otro estudio que ha valorado los niveles séricos de ZAG en gestantes y objetiva que los niveles de ZAG en 37 gestantes con preeclampsia están aumentados con respecto a las 37 gestantes controles. A diferencia de nuestro estudio, no encuentran una clara asociación con parámetros del síndrome metabólico lo que puede deberse al bajo número de gestantes incluidas (207).

Fuera de la gestación se han obtenido resultados discordantes en cuanto a los niveles séricos de ZAG en situaciones de resistencia a la insulina. En obesos se han descrito niveles circulantes disminuidos (198,205,278) sin cambios (200,206) o aumentados (279). A su vez, en personas con DM 2 y con síndrome metabólico se han evidenciado niveles circulantes de ZAG disminuidos y correlacionados de forma negativa con resistencia a la insulina y el IMC (278) pero también se han objetivado niveles aumentados (279,280) o sin cambios (206,281). Estos datos discordantes a nivel sérico hacen difícil interpretar hasta qué punto esta proteína realmente interviene en los procesos metabólicos que determinan la resistencia a la insulina o si por el contrario, lo que observamos es un efecto derivado de los procesos que configuran la propia resistencia a la insulina. La divergencia entre lo observado a nivel tisular, especialmente en tejido adiposo, y en plasma, hace pensar que esta proteína puede tener un papel sobre la función paracrina de dicho tejido y que su reflejo en plasma no está traduciendo los procesos que tienen lugar a nivel local (182). Esto no es exclusivo de esta adipoquina, y hoy sabemos que este escenario es más habitual de lo previsto para numerosas proteínas que pueden ser detectadas a nivel circulante, pero mantienen una actividad específica en diversos tejidos que no tiene porque coincidir con sus niveles periféricos. Así en esta línea, no hemos encontrado relación entre los niveles séricos de ZAG y el IMC pregestacional, lo que sugiere que el tejido adiposo no sería el principal determinante de los niveles séricos de ZAG en la gestación, si bien no se puede desacartar un efecto paracrino de ZAG. La placenta podría ser una fuente de esta proteína, por este motivo, creemos que sería interesante en futuros trabajos medir la

expresión de ZAG en placenta para valorar si esta puede representar una fuente relevante de proteína durante la gestación.

Respecto a la relación descrita entre esta proteína y otras adipoquinas como la adiponectina, hemos podido objetivar una asociación positiva entre los niveles séricos de ambas, lo que está en concordancia con estudios previos que han mostrado una relación positiva entre la expresión de ZAG en tejido adiposo y los niveles séricos de adiponectina (200,201). Además, al analizar los factores asociados a los niveles séricos de adiponectina en las gestantes, objetivamos que los niveles circulantes de ZAG son uno de los principales determinantes positivos, mientras que HOMA-IR aparece como uno de los principales determinantes negativos por lo que no podemos excluir totalmente una influencia indirecta de ZAG en el metabolismo glucídico a través de su asociación positiva con adiponectina.

ZAG en cordón umbilical. Asociación con parámetros antropométricos neonatales.

La variabilidad de diversas proteínas en sangre de cordón, puede traducir en parte los cambios homeostáticos que están teniendo lugar en el feto. Por ello nos parece relevante analizar estas moléculas en el contexto de los cambios antropométricos fetales, como una forma indirecta de obtener información útil del proceso metabólico que acontece en los recién nacidos de madres con DMG.

En nuestra cohorte no hemos podido objetivar diferencias significativas en los niveles de ZAG en cordón umbilical entre DMG y controles. Sí que hemos observado que los niveles de ZAG en cordón umbilical se relacionan positivamente con la edad gestacional, el peso y la masa magra neonatales.

Aunque dado el diseño del estudio no se pueden realizar interpretaciones de causalidad, el hallazgo de estas correlaciones nos hace especular sobre un posible rol de ZAG en el crecimiento fetal. Al controlar por factores de confusión, el principal factor determinante de ZAG en cordón umbilical es la edad gestacional, lo que sugiere que los niveles de ZAG en cordón umbilical están determinados por la madurez del tejido adiposo fetal más que por la cantidad de materia grasa. Sin embargo, no hemos observado relación entre los niveles de ZAG sérico materno y parámetros de antropometría fetal, lo que detrae utilidad a esta proteína en sangre materna como biomarcador de maduración fetal.

Un aspecto interesante de lo observado en sangre de cordón, es que los niveles de ZAG son muy inferiores a los niveles séricos de ZAG circulante materno. Es difícil interpretar estos resultados, sin embargo, no sería descabellado pensar que dada la función lipolítica de ZAG los niveles bajos de ZAG en la vida intrauterina podrían ayudar a proteger al feto de una actividad lipolítica excesiva en la fase final de la gestación, cuando domina la actividad anabólica. Estos niveles bajos de ZAG contrastan con los niveles proporcionalmente elevados de adiponectina umbilical (146) la cual estimula la adipogénesis en modelos experimentales (282). A diferencia de lo observado en sangre materna, no hemos objetivado una asociación entre los niveles de ZAG y los de adiponectina en sangre de cordón, lo que iría en consonancia con su diferente actividad en la vida fetal.

Con respecto a la antropometría neonatal, aunque se ha descrito que los niños de madres con DMG presentan una mayor cantidad de masa grasa a pesar de tener similar peso al nacer (283), en nuestro estudio no hemos objetivado diferencias en cuanto a peso, masa grasa y masa magra entre los

recién nacidos de madres con DMG y los de madres con TNG. En el estudio de Catalano et al (283) las gestantes con DMG eran obesas, en cambio en nuestro estudio no hay diferencias en el IMC pregestacional entre las gestantes con DMG y las gestantes con TNG, presentado ambos grupos un IMC medio dentro del normopeso. Dados los efectos aditivos de obesidad y DMG en cuanto a la adiposidad neonatal (135), el normopeso en las gestantes con DMG de nuestro estudio podría explicar la ausencia de diferencias en cuanto a masa grasa neonatal. Nuestros resultados están en concordancia con un estudio reciente que evalúa la composición corporal en el recién nacido mediante la técnica de desplazamiento de aire y que tampoco objetiva diferencias en cuanto a peso, masa grasa y masa magra en recién nacidos de madres con DMG con buen control glucémico con respecto a recién nacidos de madres con TNG (284).

Sistema activina A-folistatina en diabetes mellitus gestacional.

Relación con resistencia a la insulina.

Entre los hallazgos más destacables de nuestro trabajo, hemos constatado por primera vez que los niveles de folistatina están disminuidos en las gestantes con DMG con respecto a las gestantes con TNG. Estos niveles disminuidos en DMG muestran una asociación negativa con la resistencia a la insulina medida mediante HOMA-IR. La propia DMG aparece como un factor determinante en la variación de los niveles de esta adipoquina por lo cual, a pesar de que se trata de un estudio observacional que no permite inferir relaciones causales, si que podría sugerir un posible papel de folistatina en el metabolismo glucídico durante la gestación. En cambio, ni los niveles de

activina A ni los de FSTL3 fueron diferentes entre los grupos de gestantes estudiados.

Previamente, activina A se ha determinado en gestantes con DMG en otros 2 estudios del grupo de Petraglia y, en contraste con nuestros resultados, ellos han objetivado niveles elevados de activina A en las gestantes con DMG (268,269). La diferencia con nuestros resultados puede deberse a varios motivos, como el método utilizado para el análisis de activina A, el menor número de gestantes o la semana de gestación en que se realizó la determinación de activina A (desde la semana 20 hasta el final de la gestación). En la gestación, esta adipoquina también se ha descrito elevada en preeclampsia (259) y en gestantes de fetos con CIR, sobretodo en presencia de isquemia placentaria lo que sugiere que activina A se eleva como respuesta al compromiso fetal (259). Al investigar cuáles eran los factores más relacionados con las concentraciones circulantes de activina A en nuestra cohorte, observamos que FSTL3 y los niveles de triglicéridos son los que mejor determinan sus niveles. Una potencial explicación a la asociación entre FSTL3 y activina A podría atribuirse a la actividad reguladora de FSTL3 sobre activina A. La asociación con los niveles de triglicéridos es más difícil de explicar, si bien podríamos especular sobre los efectos de activina A como regulador de la adipogénesis dado que estimula la proliferación e inhibe la diferenciación de progenitores de adipocitos humanos (231), lo cual podría relacionarse de forma indirecta con los niveles circulantes de triglicéridos.

Un aspecto interesante relacionado con activina A, es su potencial actividad proinflamatoria en tejido adiposo, donde se objetiva que estimula la secreción de citoquinas inflamatorias por preadipocitos y por macrófagos del

tejido adiposo por lo que el incremento de actividad de activina A podría promover un estado proinflamatorio favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina (234). Dado que en nuestro estudio no hemos objetivado relación de activina A con resistencia a la insulina medida por HOMA-IR y dado que no se objetivan diferencias en los niveles de activina A en gestantes con DMG respecto a gestantes con TNG, parece difícil suponer que el efecto inflamatorio de esta adipoquina sea relevante en la resistencia a la insulina durante la gestación. Es cierto, sin embargo, que no disponemos de marcadores inflamatorios en este estudio que nos permitan aseverar sin duda la potencial relación que se le ha atribuido con dichos marcadores inflamatorios.

Respecto a FSTL3 se ha estudiado como posible marcador de desarrollo de DMG con resultados divergentes (265,266). Al valorar los niveles de FSTL3 al final de la gestación en una pequeña cohorte de gestantes de raza oriental con DMG a diferencia de nuestra cohorte, observan niveles séricos bajos que coinciden con una expresión placentaria disminuida, sin que se relacionen con otros parámetros metabólicos (267). En nuestro estudio los niveles de FSTL3 tampoco se correlacionan con ningún marcador metabólico, salvo con los niveles de activina A, único determinante de los niveles de FSTL3. Por este motivo, nuestros datos no apoyan un posible papel de FSTL3 en el metabolismo glucídico de las gestantes con DMG.

Sistema Activina A-Folistatina en relación con crecimiento fetal y adiposidad neonatal.

Un aspecto interesante de estas proteínas es su potencial papel regulador del metabolismo y del crecimiento fetal. La estimación ecográfica del peso

fetal permite detectar y monitorizar un crecimiento anormal (285), sin embargo, el peso estimado fetal tiene una baja correlación con la adiposidad neonatal (286). En los últimos años se ha introducido la medición del volumen fraccional de extremidades mediante la ecografía tridimensional, el cual presenta una mejor correlación con la adiposidad neonatal (285). Entre los métodos antropométricos validados para cuantificar la cantidad de masa grasa neonatal se encuentra la suma de pliegues cutáneos (277) y la estimación del porcentaje de grasa (275). En nuestro estudio hemos utilizado ésta última que incluye además del peso y la talla neonatal, la medición del grosor del pliegue suprailíaco.

Al analizar la relación de activina A, folistatina y FSTL3 con la estimación del peso fetal, con el volumen fraccional del muslo como estimación de adiposidad fetal y con el peso y el porcentaje de masa grasa neonatal, objetivamos diversas asociaciones. Así, en el conjunto de mujeres estudiadas folistatina se asocia de forma positiva aunque débil, pero independientemente del IMC pregestacional y del IMC ganado durante la gestación, con los parámetros ecográficos de estimación de peso y adiposidad fetal (volumen fraccional del muslo), y con el peso neonatal y la estimación del porcentaje de grasa neonatal. Al dividir por grupos, se evidencia que estas relaciones se producen a expensas del grupo de TNG ya que las relaciones con el peso y la estimación del porcentaje de grasa neonatal son más potentes en este grupo, pero en cambio se pierden en el grupo de DMG.

Aunque no hay una clara explicación para entender las diferencias entre los grupos, pensamos que la intervención terapéutica en el grupo DMG puede jugar un papel en la pérdida de relación. Los niños de madres con DMG bien controlada normalizan su peso neonatal lo que conlleva un cambio en la

velocidad de crecimiento fetal y en el depósito de masa grasa durante el tercer trimestre. Dado que los niveles de folistatina se obtuvieron antes de iniciar la intervención terapéutica, es posible que dicha intervención haya alterado la relación entre folistatina y los parámetros ecográficos y antropométricos en el grupo de DMG.

En un estudio reciente se ha evaluado el papel de folistatina en la adipogénesis humana y se ha objetivado que folistatina estimula la diferenciación de progenitores de adipocitos in vitro (242). Aunque dadas las características de nuestro estudio, no se pueden inferir relaciones causales, el papel que juega folistatina como estimulador de la adipogénesis in vitro permite sugerir un posible rol de folistatina en la adiposidad fetal.

En cambio, los niveles séricos de Activina A sólo se relacionan positivamente de forma débil con el peso estimado ecográficamente al inicio del tercer trimestre, aunque dicha asociación se pierde al ajustar por parámetros de confusión, y por último, FSTL3 no se relaciona con ningún parámetro ecográfico y antropométrico.

Dimorfismo sexual en la asociación de multímeros de adiponectina con el crecimiento fetal y con la masa grasa neonatal.

El crecimiento fetal depende de la interacción de factores genéticos, nutricionales y endocrinos, siendo la insulina uno de sus principales reguladores (287). Algunas adipoquinas han emergido como nexo de unión entre el metabolismo materno, la resistencia a la insulina y el crecimiento fetal (141). Dado el papel insulinosensibilizador de adiponectina es razonable asumir que juegue un papel regulador en el crecimiento fetal (141). Los

niveles de adiponectina en cordón umbilical se incrementan progresivamente desde la mitad hasta el final de la gestación. Así, en el momento del parto los niveles en cordón umbilical son de dos a tres veces superiores que los descritos en adultos (146–148) lo que sugiere un posible rol en el crecimiento fetal (141). En varios estudios previos los niveles de adiponectina umbilical se correlacionan con el peso neonatal (146–149). En un estudio previo de nuestro grupo se evidencia una relación positiva de adiponectina total y de adiponectina de alto peso molecular en cordón umbilical con el peso y el índice ponderal neonatal, un marcador indirecto de adiposidad (150).

Sabemos que existe un dimorfismo sexual en el crecimiento fetal. Las niñas incrementan su porcentaje de masa grasa en mayor medida que los niños durante el tercer trimestre. En el nacimiento, las niñas presentan mayor masa grasa y menor masa magra que los niños (158).

En nuestro estudio hemos realizado una estimación de la adiposidad neonatal, por medio de la medición del grosor de los pliegues cutáneos, método bien correlacionado con la cantidad de masa grasa en neonatos (277), en 53 niñas y 43 niños nacidos de madres con TNG y hemos analizado los determinantes de la misma.

Aunque en nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias en cuanto a adiposidad neonatal entre los niños y las niñas, posiblemente debido al bajo número de neonatos estudiados, si que hemos evidenciado diferencias relacionadas con el sexo en los factores determinantes de la misma. Los mejores determinantes de la adiposidad neonatal en las niñas son el IMC pregestacional materno, la insulina en cordón umbilical y la adiponectina de alto peso molecular en cordón umbilical, que es la principal implicada en el efecto sensibilizador a la insulina de la adiponectina. En cambio en los niños

el principal determinante positivo de la adiposidad neonatal es la adiponectina umbilical de bajo peso molecular. Al igual que en nuestro trabajo, estudios previos en población asiática han objetivado una relación positiva de los niveles de adiponectina total umbilical con estimaciones de adiposidad neonatal (147,149) pero no valoraron los diferentes multímeros de adiponectina ni las diferencias según el sexo neonatal. Besu et al en cambio objetiva una asociación positiva entre la adiponectina total umbilical y la adiposidad neonatal sólo en las niñas pero no ha valorado la asociación con los diferentes multímeros (151). En nuestro estudio, en las niñas, a diferencia de los niños, la adiposidad neonatal también viene determinada por los niveles de insulina umbilical y el IMC pregestacional materno, lo que sugiere que en las niñas estos factores tienen una mayor importancia como determinantes de adiposidad neonatal en comparación con los niños. Esto guarda concordancia con un estudio previo que objetiva que en las niñas de madres con DMG el principal predictor del porcentaje de grasa neonatal fue el IMC pregestacional materno (160).

También se objetiva un dimorfismo sexual en los predictores de crecimiento fetal. En los niños, los principales determinantes positivos de la velocidad de crecimiento fetal, tanto al inicio como al final del tercer trimestre, son la insulina umbilical y la adiponectina de bajo peso molecular umbilical. En las niñas la velocidad de crecimiento en el inicio del tercer trimestre viene determinada positiva y exclusivamente por factores maternos, como son el IMC materno pregestacional y la edad materna. En cambio, la velocidad de crecimiento al final del tercer trimestre viene determinada positivamente por la insulina umbilical y la adiponectina de alto peso molecular umbilical además de por el IMC materno pregestacional. Por

el contrario, el ratio adiponectina de alto peso molecular materna/adiponectina total materna aparece como un predictor negativo de la velocidad de crecimiento. Esta relación negativa sugiere que a menor ratio mayor resistencia a la insulina materna y mayor paso de nutrientes a través de la placenta lo que favorecería el crecimiento fetal.

Este estudio pone de relieve la asociación de adiponectina umbilical con el crecimiento fetal y la adiposidad neonatal y evidencia un dimorfismo sexual en los multímeros de adiponectina implicados, siendo la adiponectina de bajo peso molecular la principal implicada en los niños y la de alto peso molecular en las niñas. Además, también se objetiva que el IMC pregestacional materno tienen una mayor importancia como determinante de la adiposidad neonatal en las niñas que en los niños.

Limitaciones de los estudios

La principal limitación de nuestros estudios es su diseño transversal que nos impide establecer relaciones de causalidad. Además, para la medición de la resistencia a la insulina hemos utilizado el HOMA-IR, el cual es un método ampliamente validado para la práctica clínica pero que presenta limitaciones con respecto al clamp hiperinsulinémico-euglucémico, que no nos ha sido factible de utilizar por su elevado coste y laboriosidad. En cuanto a la medición de la grasa corporal neonatal, aunque la mejor cuantificación se consigue mediante técnicas diagnósticas sofisticadas (DEXA, pletismografía, conductividad eléctrica corporal total) en nuestros trabajos hemos utilizado medidas antropométricas que permiten una estimación de la cantidad de grasa y que han sido validadas en estudios previos (275,277). Sin embargo, la valoración antropométrica sólo permite evaluar el tejido adiposo

subcutáneo sin aportar información del componente visceral. Por otro lado, sólo se ha realizado una determinación de las adipoquinas maternas al inicio del tercer trimestre lo que puede haber infraestimado la asociación con parámetros ecográficos y antropométricos neonatales. Por último, hay que tener en cuenta que en nuestros estudios sólo se han incluido gestantes de raza caucásica, por lo que los resultados obtenidos no se pueden extrapolar a otras razas.

7. CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

-
1. Los niveles circulantes de ZAG se asocian a un perfil metabólico favorable en mujeres gestantes. ZAG no se ha mostrado una adipoquina útil como marcador de la DMG.
 2. Los bajos niveles de ZAG detectados en sangre de cordón y su relación con la edad gestacional, hacen pensar que puede tener un papel en la homeostasis metabólica fetal y en el desarrollo fetal.
 3. La folistatina circulante se asocia de forma inversa con la resistencia a la insulina en la gestación y se halla disminuida en las pacientes con DMG, lo que sugiere su implicación potencial en la patogénesis de la DMG.
 4. Los niveles de folistatina materna pueden influir en parámetros de crecimiento fetal y adiposidad neonatal.
 5. Activina A y FSTL3 no se han mostrado como biomarcadores útiles en la DMG.
 6. Los niveles de los multímeros de adiponectina en cordón umbilical se asocian con la velocidad de crecimiento fetal y la adiposidad neonatal de forma diferente dependiendo del sexo del recién nacido, indicando un dimorfismo sexual en cuanto al comportamiento de esta proteína sobre los parámetros fetales estudiados.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

8. BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015

1. Catalano P, Tyzbir E, Wolfe R, Calles J, Roman N, Amini S, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol.* 1993;264:E60-E67.
2. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:903-16.
3. Ryan E, O'Sullivan M, Skyler J. Insulin action during pregnancy: studies with the euglycemic glucose clamp technique. *Diabetes.* 1985;34:380-9.
4. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1667-72.
5. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162:1008-14.
6. Toyoda N, Murata K, Sugiyama Y. Insulin binding, glucose oxidation, and methylglucose transport in isolated adipocytes from pregnant rats near term. *Endocrinology.* 1985;116(3):998-1002.
7. Hauguel S, Gilbert M, Girard J. Pregnancy-induced insulin resistance in liver and skeletal muscles of the conscious rabbit. *Am J Physiol.* 1987;252:E165-E169.
8. Buchanan TA. Pancreatic B-Cell Defects in Gestational Diabetes: Implications for the Pathogenesis and Prevention of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:989-93.
9. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obs Gynaecol.* 1978;85:818-20.
10. Pallardo LF. Alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en la gestación. *Diabetes y Embarazo.* 2008. p. 3-14.
11. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol.* 2009;587:5031-7.
12. Kühl C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. *Diabetes.* 1991;40 Suppl 2:18-24.
13. Buchanan T. Intermediary metabolism during pregnancy. Implications for diabetes mellitus. In: LeRoith D, Taylor S, Olefsky J, editors. *Diabetes mellitus A fundamental and clinical text.* Philadelphia. 2004. p. 1237-50.
14. Ramos MP, Crespo-Solans M, Del Campo S, Cacho J, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E318-328.

15. Herrera E, Ortega-senovilla H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy – Are these the cause of the problem? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* Elsevier Ltd; 2010;24:515–25.
16. Duggleby SL, Jackson AA. Protein, amino acid and nitrogen metabolism during pregnancy: how might the mother meet the needs of her fetus? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:503–9.
17. Reece EA, Homko C, Miodovnik M, Langer O. A consensus report of the Diabetes in Pregnancy Study Group of North America Conference, Little Rock, Arkansas, May 2002. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002;12:362–4.
18. Buckley BS, Harreiter J, Damm P, Corcoy R, Chico A, Simmons D, et al. Gestational diabetes mellitus in Europe: Prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review. *Diabet Med.* 2012;29:844–54.
19. Reece EA. The fetal and maternal consequences of gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Mar;23:199–203.
20. Bellamy L, Casas J-P, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2009;373:1773–9.
21. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational Diabetes and the Incidence of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25:1862–8.
22. Shah BR, Retnakaran R, Booth GL. Increased Risk of Cardiovascular Disease in Young Women Following Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2008;31:1668–9.
23. Vohr BR, Boney CM. Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21:149–57.
24. Dabelea D, Knowler WC, Pettitt DJ. Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern Fetal Med.* 2000;9:83–8.
25. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA HSCRG. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008;358:1991–2002.
26. Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med.* 2009;361(14):1339–48.
27. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 1979;28:1039–57.
28. Carpenter M, Coustan D. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 1982;144:768–73.

29. Metzger B, Coustan D, The Organizing Committee. Summary and Recommendations of the Fourth International Workshop- Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1998;21:B161-B167.
30. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:676-82.
31. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference on Diagnosing Gestational Diabetes Mellitus: Final Statement [Internet]. 2013. Available from: <http://prevention.nih.gov/cdp/conf>
32. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37:S81-S90.
33. World Health Organization. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report. *Tech Rep Ser*. 1980;646:1-80.
34. Grupo Español de Diabetes y Embarazo. Diabetes y embarazo. Guía asistencial (3ª ed). *Av Diabetol*. 2006;22:73-7.
35. Ricart W, López J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, González N, et al. Potential impact of American Diabetes Association (2000) criteria for diagnosis of gestational diabetes mellitus in Spain. *Diabetologia*. 2005;48:1135-41.
36. Corcoy R, Lumbreras B, Bartha J, Ricart W, y el Grupo Español de Diabetes y Embarazo. Nuevos criterios diagnósticos de diabetes mellitus gestacional a partir del estudio HAPO. ¿Son válidos en nuestro medio? *Endocrinol Nutr*. 2010;57:277-80.
37. Kautzky-Willer A, Prager R, Waldhäusl W, Pacini G, Thomaseth K, Wagner OF, et al. Pronounced insulin resistance and inadequate β -cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care*. 1997;20:1717-23.
38. Ryan EA, Imes S, Liu D, McManus R, Finegood DT, Polonsky KS, et al. Defects in insulin secretion and action in women with a history of gestational diabetes. *Diabetes*. 1995;44:506-12.
39. Homko C, Sivan E, Chen XH, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:568-73.
40. Buchanan TA. Pancreatic B-cell defects in gestational diabetes: implications for the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:989-93.
41. Buchanan, TA, Xiang, A, Kjos, SL & Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care*. 2007;30:S105-S111.
42. Petersen JS, Dyrberg T, Damm P, Kühl C, Mølsted-Pedersen L, Buschard K. GAD65 autoantibodies in women with gestational or insulin dependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. *Diabetologia*. 1996;39:1329-33.

43. Mauricio D, Corcoy R, Codina M, Balsells M, Puig-Domingo M, Pou J, et al. Islet cell antibodies identify a subset of gestational diabetic women with higher risk of developing diabetes shortly after pregnancy. *Diab Nutr Metab*. 1992;5:237-41.
44. Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, Frid A, et al. Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes-associated HLA genotypes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2002;25:68-71.
45. Kousta E, Ellard S, Allen LIS, Saker PJ, Huxtable SJ, Hattersley AT, et al. Glucokinase mutations in a phenotypically selected multiethnic group of women with a history of gestational diabetes. *Diabet Med*. 2001;18:683-4.
46. Chen Y, Liao W, Roy A, Loganath A, Ng S. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pr*. 2000;48:29-35.
47. Ryan E, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67:341-7.
48. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: Implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 1993;132:879-87.
49. Beck P, Daughaday WH. Human Placental Lactogen: Studies of Its Acute Metabolic Effects and Disposition in Normal Man. *J Clin Invest*. 1967;46:103-10.
50. Kirwan JP, Mouzon SH, Lepercq J, Challier J, Huston-presley L, Friedman JE, et al. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 2002;51:2207-13.
51. Barbour LA, Shao J, Qiao L, Pulawa LK, Jensen DR, Bartke A, et al. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186:512-7.
52. Lacroix M, Guibourdenche J, Frenzo J, Muller F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone: a review. *Placenta*. 2002;23:S87-S94.
53. Barbour L, McCurdy C, Hernandez T, Kirwan J, Catalano P, Friedman J. Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:S112-S119.
54. McIntyre HD, Chang AM, Callaway LK, Cowley DM, Dyer AR, Radaelli T, Farrell KA, Huston-Presley L, Amini SB, Kirwan JP CP. Hormonal and Metabolic Factors Associated With Variations in Insulin Sensitivity in Human Pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:356-60.
55. Fasshauer M, Blüher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:488-99.
56. Shoelson S, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*. 2007;132:2169-80.

57. Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest.* 1983;72:1150-62.
58. Gastaldelli A. Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5098-103.
59. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444:860-7.
60. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:1793-801.
61. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, et al. Maternal Obesity and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2007;11:2070-6.
62. Castro J De, Sevillano J, Marciniak J, Rodriguez R, Gonza C, Viana M, et al. Implication of Low Level Inflammation in the Insulin Resistance of Adipose Tissue at Late Pregnancy. *Endocrinology.* 2011;152:4094-105.
63. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology.* 2003;144:2195-200.
64. Resi V, Basu S, Haghiac M, Presley L, Minium J, Kaufman B, et al. Molecular inflammation and adipose tissue matrix remodeling precede physiological adaptations to pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303:E832-E840.
65. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-De Mouzon S. Gestational Diabetes Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways. *Diabetes.* 2003;52:2951-8.
66. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals. *Placenta.* 2006;27:794-8.
67. Richardson AC, Carpenter MW. Inflammatory Mediators in Gestational Diabetes Mellitus. *Obs Gynecol Clin North Am.* 2007;34:213-24.
68. Wolf M, Sauk J, Shah A, Vossen Smirnakis K, Jimenez-Kimble R, Ecker J, et al. Inflammation and Glucose Intolerance. *Diabetes Care.* 2004;27:21-7.
69. Kinalski M, Telejko B, Kuymicki M, Kretowski A, Kinalska I. Tumor necrosis factor alpha system and plasma adiponectin concentration in women with gestational diabetes. *Horm Metab Res.* 2005;37:450-4.
70. Williams MA, Qiu C, Muiy-Rivera M, Vadachkoria S, Song T, Luthy DA. Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2306-11.
71. Vrachnis N, Augoulea A, Iliodromiti Z, Lambrinouadaki I, Sifakis S, Creatsas G. Previous gestational diabetes mellitus and markers of cardiovascular risk. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:458610.

72. Kim C, Cheng YJ, Beckles GL. Inflammation Among Women With a History of Gestational Diabetes Mellitus and Diagnosed Diabetes in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2008;31:1386–8.
73. Lowe LP, Metzger BE, Lowe WL, Dyer AR, Mcdade TW. Inflammatory Mediators and Glucose in Pregnancy : Results from a Subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:5427–34.
74. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994;43:1271–8.
75. Walsh JM, McGowan CA, Byrne JA, Rath A, McAuliffe FM. The association between TNF- α and insulin resistance in euglycemic women. *Cytokine*. 2013;64:208–12.
76. Wauters M, Considine R V., Van Gaal LF. Human leptin: From an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*. 2000;143:293–311.
77. Hamed EA, Zakary MM, Ahmed NS, Gamal RM. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pr*. 2011;94:434–41.
78. D'Ippolito S, Tersigni C, Scambia G, Di Simone N. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *BioFactors*. 2012;38:14–23.
79. Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: Consequences of maternal obesity. *Placenta*. 2013;34:205–11.
80. Lacroix M, Kina E, Hivert M. Maternal / Fetal Determinants of Insulin Resistance in Women During Pregnancy and in Offspring Over Life. *Curr Diab Rep*. 2013;13:238–44.
81. Briana DD, Malamitsi-puchner A. Adipocytokines in Normal and Complicated Pregnancies. *Reprod Sci*. 2009;16:921–37.
82. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, Alford FP. Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with or without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006;22:131–8.
83. Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2006;55:501–12.
84. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409:307–12.
85. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, Wallace TM, Hull RL, Zraika S, et al. Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia*. 2005;48:2330–3.
86. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah M, Korita D, et al. Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1394–7.

87. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, et al. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66:447-53.
88. Chen D, Fang Q, Chai Y, Wang H, Huang H, Dong M. Serum resistin in gestational diabetes mellitus and early postpartum. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67:208-11.
89. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, et al. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:351-7.
90. Megia A, Vendrell J, Gutierrez C, Sabaté M, Broch M, Fernández-Real JM, et al. Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:173-8.
91. Lain KY, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69:407-11.
92. Lee J, Chan J, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, et al. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4848-56.
93. Kuzmicki M, Telejko B, Szamatowicz J, Zonenberg A, Nikolajuk A, Kretowski A, et al. High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25:258-63.
94. Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin , adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76:2-11.
95. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005;307:426-30.
96. Mastorakos G, Valsamakis G, Papatheodorou DC, Barlas I, Margeli A, Boutsiadis A, et al. The role of adipocytokines in insulin resistance in normal pregnancy: Visfatin concentrations in early pregnancy predict insulin sensitivity. *Clin Chem*. 2007;53:1477-83.
97. Telejko B, Kuzmicki M, Zonenberg A, Szamatowicz J, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Nikolajuk A, et al. Visfatin in gestational diabetes: Serum level and mRNA expression in fat and placental tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;84:68-75.
98. Hu W, Wang Z, Wang H, Huang H, Dong M. Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87:413-8.
99. Chan T, Chen Y, Lee C, Chou F, Wu L, Jong S, et al. Decreased plasma visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13:364-7.

100. Haider D, Handisurya A, Storka A, Vojtassakova E, Luger A, Pacini G, et al. Visfatin response to glucose is reduced in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2007;30:1889–91.
101. Krzyzanowska K, Krugluger W, Mittermayer F, Rahman R, Haider D, Shnawa N, et al. Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Clin Sci*. 2006;110:605–9.
102. Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Erez O, et al. Visfatin in human pregnancy: Maternal gestational diabetes vis-a-vis neonatal birthweight. *J Perinat Med*. 2009;37:218–31.
103. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real J. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care*. 2009;32:S362–S367.
104. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: A controversial adipokine. *Eur J Endocrinol*. 2011;165:703–11.
105. Ueland T, Dalsoren T, Voldner N, Godang K, Henriksen T, Bollerslev J. Retinol-binding protein-4 is not strongly associated with insulin sensitivity in normal pregnancies. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:49–54.
106. Inoue S, Takamoto N, Akahori Y, Masumoto A, Nakatsukasa H, Msuyama H, et al. Elevated level of serum retinol-binding protein 4 in pregnancy-induced hypertension. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009;35:293–300.
107. Chan TF, Chen HS, Chen YC, Lee CH, Chou FH, Chen IJ, et al. Increased serum retinol-binding protein 4 concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *ReprodSci*. 2007;14:169–74.
108. Ortega-Senovilla H, Schaefer-Graf U, Meitzner K, Abou-Dakn M, Graf K, Kintscher U, et al. Gestational Diabetes Mellitus Causes Changes in the Concentrations of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein and Other Adipocytokines in Cord Blood. *Diabetes Care*. 2011;34:2061–6.
109. Tepper BJ, Kim YK, Shete V, Shabrova E, Quadro L. Serum Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) and retinol in a cohort of borderline obese women with and without gestational diabetes. *Clin Biochem*. 2010;43:320–3.
110. Krzyzanowska K, Zemany L, Krugluger W, Schernthaner G, Mittermayer F, Schnack C, et al. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:1115–22.
111. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, et al. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:549748.
112. Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: A novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia*. 2013;56:10–21.

113. Kralisch S, Stepan H, Kratzsch J, Verlohren M, Verlohren HJ, Drynda K, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid binding protein are increased in gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:33-8.
114. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: More than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003;26:2442-50.
115. Mazaki-Tovi S, Romero R, Vaisbuch E, Erez O, Mittal P, Chaiworapongsa T, et al. Maternal serum adiponectin multimers in gestational diabetes. *J Perinat Med.* 2009;37:637-50.
116. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, et al. Adiponectin in human pregnancy: Implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2006;49:1677-85.
117. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, Flyvbjerg A, Ovesen P. A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG.* 2006;113:110-3.
118. Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Wiser A, Schiff E, et al. Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *J Perinatol.* 2007;27:77-81.
119. Girouard J, Giguere I, Moutquin J, Forest J. Previous hypertensive disease of pregnancy is associated with alterations of markers of insulin resistance. *Hypertension.* 2007;49:1056-62.
120. Retnakaran A, Retnakaran R. Adiponectin in Pregnancy: Implications for Health and Disease. *Curr Med Chem.* 2012;19:5444-50.
121. Retnakaran R, Connelly PW, Maguire G, Sermer M, Zinman B, Hanley AJG. Decreased high-molecular-weight adiponectin in gestational diabetes: Implications for the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2007;24:245-52.
122. Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, et al. Secretion of adiponectin by human placenta: Differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia.* 2006;49:1292-302.
123. Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E326-E333.
124. Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol.* 2005;186:457-65.
125. Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, Cetin I. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. *Placenta.* 2003;24:343-7.
126. Catalano PM, Tyzbit ED, Allen SR, McBean JH, McAuliffe TL. Evaluation of fetal growth by estimation of neonatal body composition. *Obstet Gynecol.* 1992;79:46-50.

127. Sparks J. Human intrauterine growth and nutrient accretion. *Semin Perinatol.* 1984;8:74–93.
128. Pedersen J. Diabetes and pregnancy: blood sugar of newborn infants. Copenhagen Danish Sci Press. 1952;230.
129. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: Associations With Neonatal Anthropometrics. *Diabetes.* 2009;58:453–9.
130. Freinkel N. Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes.* 1980;29:1023–35.
131. Kitajima M, Oka S, Yasuhi I, Fukuda M, Rii Y, Ishimaru T. Maternal serum triglyceride at 24-32 weeks' gestation and newborn weight in nondiabetic women with positive diabetic screens. *Obstet Gynecol.* 2001;97:776–80.
132. Knopp RH, Bergelin RO, Wahl PW, Walden CE. Relationships of infant birth size to maternal lipoproteins, apoproteins, fuels, hormones, clinical chemistries, and body weight at 36 weeks gestation. *Diabetes.* 1985;34:71–7.
133. Schaefer-Graf UM, Graf K, Kulbacka I, Kjos SL, Dudenhausen J, Vetter K, et al. Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2008;31:1858–63.
134. Catalano PM, Mouzon SH. Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic? *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier Inc.; 2011;204:479–87.
135. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG.* 2006;113:1126–33.
136. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycaemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) study: Associations with maternal body mass index. *BJOG.* 2010;117:575–84.
137. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care.* 2009 Jun;32(6):1076–80.
138. Black M, Sacks D, Xiang A, Lawrence J. The Relative Contribution of prepregnancy overweight and obesity, gestational weight gain, and IADPSG-defined gestational diabetes mellitus to fetal overgrowth. *Diabetes Care.* 2013;36:56–62.
139. Ricart W, López J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, González N, et al. Body mass index has a greater impact on pregnancy outcomes than gestational hyperglycaemia. *Diabetologia.* 2005;48:1736–42.
140. Catalano P, Thomas A, Huston L, Fung C. Effect of maternal metabolism on fetal growth and body composition. *Diabetes Care.* 1998;21:B85–B90.
141. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. The role of adipocytokines in fetal growth. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1205:82–7.

142. Ong KK, Ahmed ML, Sherriff A, Woods KA, Watts A, Golding J, et al. Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1145–8.
143. Vela-Huerta M, San Vicente-Santoscoy E, Guizar-Mendoza J, Amador-Licona N, Aldana-Valenzuela C, Hernández J. Leptin, insulin, and glucose serum levels in large-for-gestational-age infants of diabetic and non-diabetic mothers. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;21:17–22.
144. Kiess W, Petzold S, Töpfer M, Garten A, Blüher S, Kapellen T, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Feb;22:135–53.
145. Devaskar SU, Anthony R, Hay W. Ontogeny and insulin regulation of fetal ovine white adipose tissue leptin expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R431–R438.
146. Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C, Efraty Y, Schiff E, Hemi R, et al. Adiponectin in Human Cord Blood: Relation to Fetal Birth Weight and Gender. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5656–60.
147. Chan TF, Yuan SSF, Chen HS, Guu CF, Wu LC, Yeh YT, et al. Correlations between umbilical and maternal serum adiponectin levels and neonatal birthweights. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83:165–9.
148. López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Garrido E, Rovira R, Brichs R, Genaró P, et al. Maternal soluble tumour necrosis factor receptor type 2 (sTNFR2) and adiponectin are both related to blood pressure during gestation and infant's birthweight. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61:544–52.
149. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Chiou CH, Hsu YW, et al. Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy term neonates: Positive correlation with birthweight and neonatal adiposity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61:88–93.
150. Ballesteros M, Simón I, Vendrell J, Ceperuelo-Mallafré V, Miralles RM, Albaiges G, et al. Maternal and cord blood adiponectin multimeric forms in gestational diabetes mellitus: A prospective analysis. *Diabetes Care.* 2011;34:2418–23.
151. Basu S, Laffineuse L, Presley L, Minium J, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. In utero gender dimorphism of adiponectin reflects insulin sensitivity and adiposity of the fetus. *Obesity.* 2009;17:1144–9.
152. Pirc LK, Owens JA, Crowther CA, Willson K, De Blasio MJ, Robinson JS. Mild gestational diabetes in pregnancy and the adipoinular axis in babies born to mothers in the ACHOIS randomised controlled trial. *BMC Pediatr.* 2007;7:18–25.
153. Ng P, Lee C, Lam C, Wong E, Chan I, Fok T. Plasma ghrelin and resistin concentrations are suppressed in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5563–8.
154. Malamitsi-Puchner A, Briana DD, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D. Blood visfatin concentrations in normal full-term pregnancies. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2007;96:526–9.

155. Briana DD, Boutsikou M, Gourgiotis D, Kontara L, Baka S, Iacovidou N, et al. Role of visfatin, insulin-like growth factor-I and insulin in fetal growth. *J Perinat Med*. 2007;35:326-9.
156. Chan T, Tsai Y, Wu C, Lee C, Wang S, Su J. The positive correlation between cord serum retinol-binding protein 4 concentrations and fetal growth. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72:98-102.
157. Giacomozzi C, Ghirri P, Lapolla R, Bartoli A, Scirè G, Serino L, et al. Retinol-binding protein 4 in neonates born small for gestational age. *J Endocrinol Invest*. 2010;33:218-21.
158. Hawkes CP, Hourihane JO, Kenny LC, Irvine AD, Kiely M, Murray DM. Gender- and gestational age-specific body fat percentage at birth. *Pediatrics*. 2011;128:e645-51.
159. Shields BM, Knight B, Hopper H, Hill A, Powell RJ, Hattersley AT, et al. Measurement of cord insulin and insulin-related peptides suggests that girls are more insulin resistant than boys at birth. *Diabetes Care*. 2007;30:2661-6.
160. Lingwood BE, Henry AM, D'Emden MC, Fullerton A mand.-M, Mortimer RH, Colditz PB, et al. Determinants of Body Fat in Infants of Women With Gestational Diabetes Mellitus Differ With Fetal Sex. *Diabetes Care*. 2011;34:2581-5.
161. Ricart W, López J, Mozas J, Pericot A, Sancho MA, González N, et al. Maternal glucose tolerance status influences the risk of macrosomia in male but not in female fetuses. *J Epidemiol Community Heal*. 2009;63:64-8.
162. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*. 1999 Nov 1;70:811-6.
163. Barker D, Osmond C, Simmonds S, Wield G. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Br Med J*. 1993;306:422-6.
164. Barker D. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*. 1995;1:418-23.
165. Pettitt DJ, Jovanovic L. Birth weight as a predictor of type 2 diabetes mellitus: the U-shaped curve. *Curr Diab Rep*. 2001;1:78-81.
166. Hillier T, Pedula K, Schmidt M, Mullen J, Charles M, Pettitt D. Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care*. 2007;30:2287-92.
167. Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettitt DJ, Imperatore G, Gabir MM, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: A Study of Discordant Sibships. *Diabetes*. 2000;49:2208-11.
168. Pettitt D, Nelson R, Saad M, Bennett P, Knowler W. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *Diabetes Care*. 1993;16:310-4.

169. Bush NC, Chandler-Laney PC, Rouse DJ, Granger WM, Oster RA, Gower BA. Higher maternal gestational glucose concentration is associated with lower offspring insulin sensitivity and altered B-cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E803–E809.
170. Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obs Gynecol.* 2007;109:419–33.
171. Catalano P, Farrell K, Thomas A, Huston-Presley L, Mencin P, Hauguel-de Mouzon S, et al. Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1303–13.
172. Dabelea D, Crume T. Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. *Diabetes.* 2011 Jul;60:1849–55.
173. Sánchez LM, Chirino AJ, Bjorkman P j. Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. *Science.* 1999;283:1914–9.
174. Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem.* 1961;236:1066–74.
175. Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T. Immunohistochemical localization of Zinc- α 2- Glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1991;39:1221–6.
176. Díez-Itza I, Sánchez LM, Allende MT, Vizoso F, Ruibal A, López-Otín C. Zn-alpha 2-glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *Eur J Cancer.* 1993;29A:1256–60.
177. Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF. Zinc α -2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:846–53.
178. Albertus D, Seder C, Chen G, Wang X, Hartojo W, Lin L, et al. AZGP1 autoantibody predicts survival and histone deacetylase inhibitors increase expression in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2008;3:1236–44.
179. Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2500–5.
180. Tzanavari T, Bing C, Trayhurn P. Postnatal expression of zinc-alpha2-glycoprotein in rat white and brown adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;279:26–33.
181. Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P. Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett.* 2005;579:41–7.
182. Mracek T, Ding Q, Tzanavari T, Kos K, Pinkney J, Wilding J, et al. The adipokine zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) is downregulated with fat mass expansion in obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72:334–41.

183. Hassan M, Waheed A, Yadav S, Singh T, Ahmad F. Zinc α -2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res.* 2008;6:892–906.
184. López-Boado YS, Díez-Itza I, Tolivia J, López-Otín C. Glucocorticoids and androgens up-regulate the Zn-alpha 2-glycoprotein messenger RNA in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;29:247–58.
185. He N, Brysk H, Tying SK, Ohkubo I, Brysk MM. Zinc-alpha(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression. *J Cell Biochem.* 2001;Suppl 36:162–9.
186. Schmitt R, Marlier A, Cantley LG. ZAG expression during aging suppresses proliferation after kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:2375–83.
187. Hale LP. Zinc alpha-2-glycoprotein regulates melanin production by normal and malignant melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2002;119:464–70.
188. Ding Z, Qu F, Guo W, Ying X, Wu M, Zhang Y. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 2007;74:1124–31.
189. Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ. Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res.* 1998;58:2359–65.
190. Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ. Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res.* 1998;58:2353–8.
191. Mracek T, Stephens N a, Gao D, Bao Y, Ross J a, Rydén M, et al. Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *Br J Cancer.* 2011 Feb 1;104:441–7.
192. Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ. Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc- α 2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2004;1636(1):59–68.
193. Russell ST, Tisdale MJ. The role of glucocorticoids in the induction of zinc-alpha2-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. *Br J Cancer.* 2005;92:876–81.
194. Russell ST, Hirai K, Tisdale MJ. Role of β 3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor. *Br J Cancer.* 2002;86:424–8.
195. Bing C, Russell ST, Beckett EE, Collins P, Taylor S, Barraclough R, et al. Expression of uncoupling proteins-1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br J Cancer.* 2002;86:612–8.
196. Russell ST, Tisdale MJ. Antidiabetic properties of zinc-alpha2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinology.* 2010 Mar;151:948–57.
197. Rolli V, Radosavljevic M, Astier V, Macquin C, Castan-Laurell I, Visentin V, et al. Lipolysis is altered in MHC class I zinc-alpha(2)-glycoprotein deficient mice. *FEBS Lett.* 2007;581:394–400.

198. Gong F-Y, Zhang S-J, Deng J-Y, Zhu H-J, Pan H, Li N-S, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein is involved in regulation of body weight through inhibition of lipogenic enzymes in adipose tissue. *Int J Obes*. 2009;33:1023-30.
199. Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S, et al. Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a type 2 diabetes model: Is Zn- α 2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes*. 2003;52:2175-81.
200. Balaz M, Vician M, Janakova Z, Kurdiová T, Surova M, Imrich R, et al. Subcutaneous adipose tissue zinc- α 2-glycoprotein is associated with adipose tissue and whole-body insulin sensitivity. *Obesity*. 2014 Apr 22;22:1821-9.
201. Garrido-Sánchez L, García-Fuentes E, Fernández-García D, Escoté X, Alcaide J, Perez-Martinez P, et al. Zinc-alpha 2-glycoprotein gene expression in adipose tissue is related with insulin resistance and lipolytic genes in morbidly obese patients. *PLoS One*. 2012;7:e33264.
202. Bing C, Mracek T, Gao D, Trayhurn P. Zinc- α 2-glycoprotein: an adipokine modulator of body fat mass? *Int J Obes*. 2010;34:1559-65.
203. Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan G, Bickerton A, Wåhlén K, et al. A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5834-40.
204. Marrades MP, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2008;64:61-6.
205. Selva DM, Lecube A, Hernández C, Baena JA, Fort JM, Simó R. Lower zinc- α 2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4499-507.
206. Ceperuelo-Mallafré V, Näf S, Escoté X, Caubet E, Gomez JM, Miranda M, et al. Circulating and adipose tissue gene expression of zinc- α 2- glycoprotein in obesity: Its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:5062-9.
207. Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, et al. Serum levels of the adipokine zinc- α 2-glycoprotein are increased in preeclampsia. *J Endocrinol Invest*. 2012;35:562-5.
208. Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res*. 1988;44:1-34.
209. Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, et al. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature*. 1995;374:354-6.
210. Woodruff TK. Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:953-63.
211. Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T, Cui X. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J*. 2008;55:11-21.

212. Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:157–71.
213. Xia Y, Schneyer AL. The biology of activin: Recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol.* 2009;202:1–12.
214. Phillips DJ. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol.* 2005;28:1–16.
215. Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity. *Vitam Horm.* 2011;85:255–97.
216. Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:153–64.
217. Cruise BA, Xu P, Hall AK. Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia. *Dev Biol.* 2004;271:1–10.
218. Ogawa K, Abe K, Kurosawa N, Kurohmaru M, Sugino H, Takahashi M, et al. Expression of alpha, beta A and beta B subunits of inhibin or activin and follistatin in rat pancreatic islets. *FEBS Lett.* 1993;319:217–20.
219. Wada M, Shintani Y, Kosaka M, Sano T, Hizawa K, Saito S. Immunohistochemical localization of activin A and follistatin in human tissues. *Endocr J.* 1996;43:375–85.
220. Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, et al. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1866–71.
221. Florio P, Luisi S, Marchetti P, Lupi R, Cobellis L, Falaschi C, et al. Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. *J Endocrinol Invest.* 2000;23:231–4.
222. Matsuoka T, Kaneto H, Stein R, Miyatsuka T, Kawamori D, Henderson E, et al. MafA regulates expression of genes important to islet β -cell function. *Mol Endocrinol.* 2007;21:2764– 2774.
223. Mashima H, Shibata H, Mine T, Kojima I. Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. *Endocrinology.* 1996;137:3969–76.
224. Demeterco C, Beattie GM, Dib SA, Lopez AD, Hayek A. A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3892–7.
225. Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T, et al. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J Clin Invest.* 1993;92:1491–6.
226. Mine T, Kojima I, Ogata E. Stimulation of glucose production by activin-A in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology.* 1989;125:586–91.

-
227. Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, Raheer MJ, Xia Y, Rosen ED, et al. FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1348-53.
228. Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen J-P. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E157-E164.
229. Link BA, Nishi R. Opposing effects of activin A and follistatin on developing skeletal muscle cells. *Exp Cell Res*. 1997;233:350-62.
230. Hashimoto O, Funaba M. Activin in Glucose Metabolism. *Vitam Horm*. 2011;85:217-34.
231. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, et al. Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes*. 2010;59:2513-21.
232. Hirai S, Yamanaka M, Kawachi H, Matsui T, Yano H. Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;232:21-6.
233. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol*. 2009;23:11-24.
234. Dani C. Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes*. 2013;37:163-6.
235. Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol*. 1998;19:287-322.
236. Harrington AE, Morris-Triggs SA, Ruotolo BT, Robinson C V, Ohnuma S-I, Hyvönen M. Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *EMBO J*. 2006;25:1035-45.
237. Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, et al. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149:744-9.
238. Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*. 1990;247:836-8.
239. Sidis Y, Mukherjee A, Keutmann H, Delbaere A, Sadatsuki M, Schneyer A. Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin, and bone morphogenetic proteins. *Endocrinology*. 2006;147:3586-97.
240. Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 1998;12:96-106.
241. Zhang YQ, Cleary MM, Si Y, Liu G, Eto Y, Kritzik M, et al. Inhibition of activin signaling induces pancreatic epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic β -cells. *Diabetes*. 2004;53:2024-33.

242. Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, Dungner E, Wahlen K, Decaunes P, et al. Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3003–9.
243. Klein R, Clarke IJ, Hedger MP, Robertson DM. Plasma follistatin concentrations increase following lipopolysaccharide administration in sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:754–5.
244. Michel U, Ebert S, Phillips D, Nau R. Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:559–64.
245. Tortoriello D V., Sidis Y, Holtzman DA, Holmes WE, Schneyer AL. Human follistatin-related protein: A structural homologue of follistatin with nuclear localization. *Endocrinology.* 2001;142:3426–34.
246. Wu H, Wu M, Chen Y, Allan C a, Phillips DJ, Hedger MP. Correlation between blood activin levels and clinical parameters of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012 Jan;2012:410579.
247. Chen WJY, Greulich S, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Lamb HJ, de Roos A, et al. Activin A is associated with impaired myocardial glucose metabolism and left ventricular remodeling in patients with uncomplicated type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol. Cardiovascular Diabetology;* 2013 Jan;12:150.
248. Ueland T, Aukrust P, Aakhus S, Smith C, Endresen K, Birkeland KI, et al. Activin A and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2012;9:234–7.
249. Andersen G, Ueland T, Knudsen EC, Scholz H, Yndestad A, Sahraoui A, et al. Activin A levels are associated with abnormal glucose regulation in patients with myocardial infarction: Potential counteracting effects of activin A on inflammation. *Diabetes.* 2011;60:1544–51.
250. Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Wæhre T, Otterdal K, et al. Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:369–75.
251. Kozaki K, Akishita M, Eto M, Yoshizumi M, Toba K, Inoue S, et al. Role of activin-A and follistatin in foam cell formation of THP-1 macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2389–94.
252. Hansen, J, Rinnov, A, Krogh-Madsen, R, Fischer, CP, Andreasen, AS, Berg, RMG, Moller, K, Pedersen, BK PP. Plasma follistatin is elevated in patients with type 2 diabetes: relationship to hyperglycemia , hyperinsulinemia , and systemic low-grade in fl ammation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29:463–72.
253. Eldar-Geva T, Spitz IM, Groome NP, Margalioth EJ, Homburg R. Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *HumReprod.* 2001;16:2552–6.
254. Norman RJ, Milner CR, Groome NP, Robertson DM. Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001;16:668–72.

-
255. Chen MJ, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS, Yang WS. The relationship between follistatin and chronic low-grade inflammation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2009;92:2041-4.
 256. Teede H, Ng S, Hedger M, Moran L. Follistatin and activins in polycystic ovary syndrome: relationship to metabolic and hormonal markers. *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2013 Oct;62:1394-400.
 257. Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Bjørø K, Gladhaug IP, Berge C, et al. A complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Sep;104:2196-205.
 258. Woodruff TK, Sluss P, Wang E, Janssen I, Mersol-Barg MS. Activin A and follistatin are dynamically regulated during human pregnancy. *J Endocrinol*. 1997;152:167-74.
 259. Florio P, Luisi S, Ciarmela P, Severi FM, Bocchi C, Petraglia F. Inhibins and activins in pregnancy. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;225:93-100.
 260. Lockwood GM, Ledger WL, Barlow DH, Groome NP, Muttukrishna S. Measurement of inhibin and activin in early human pregnancy: demonstration of fetoplacental origin and role in prediction of early-pregnancy outcome. *Biol Reprod*. 1997;57:1490-4.
 261. Petraglia F, Gallinelli A, Grande A, Florio P, Ferrari S, Genazzani AR, et al. Local production and action of follistatin in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:205-10.
 262. Ciarmela P, Florio P, Toti P, Franchini A, Maguer-Satta V, Ginanneschi C, et al. Human placenta and fetal membranes express follistatin-related gene mRNA and protein. *J Endocrinol Invest*. 2003;26:641-5.
 263. Muttukrishna S, Tannetta D, Groome N, Sargent I. Activin and follistatin in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;225:45-56.
 264. Okamoto A, Endo H, Kalionis B, Shinya M, Saito M, Nikaido T, et al. IGFBP1 and Follistatin-like 3 genes are significantly up-regulated in expression profiles of the IUGR placenta. *Placenta*. 2006;27:317-21.
 265. Thadhani R, Powe CE, Tjoa ML, Khankin E, Ye J, Ecker J, et al. First-trimester follistatin-like-3 levels in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33:664-9.
 266. Nanda S, Savvidou M, Syngelaki A, Akolekar R, Nicolaidis KH. Prediction of gestational diabetes mellitus by maternal factors and biomarkers at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31:135-41.
 267. Hu D, Tian T, Guo J, Wang H, Chen D, Dong M. Decreased maternal and placental concentrations of follistatin-like 3 in gestational diabetes. *Clin Chim Acta*. 2012;413:533-6.
 268. Petraglia F, De Vita D, Gallinelli A, Aguzzoli L, Genazzani AR, Romero R, et al. Abnormal concentration of maternal serum activin-A in gestational diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:558-61.

269. Gallinelli A, Gallo R, Genazzani AD, Matteo ML, Caruso A, Woodruff TK, et al. Episodic secretion of activin A in pregnant women. *Eur J Endocrinol.* 1996;135:340-4.
270. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-9.
271. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements- a prospective study. *Am J Obs Gynecol.* 1985;151:333-7.
272. Lee W, Balasubramaniam M, Deter RL, Hassan SS, Gotsch F, Kusanovic JP, et al. Fractional limb volume - A soft tissue parameter of fetal body composition: Validation, technical considerations and normal ranges during pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33:427-40.
273. Carrascosa Lezcano A, Ferrández Longás A, Yeste Fernández D, García-Dihinx Villanova J, Romo Montejó A, Copil Copil A, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte I: valores de peso y longitud en recién nacidos de 26-42 semanas de edad gestacional. *An Pediatría.* 2008;68:544-51.
274. Larsen T, Greisen G, Petersen S. Intrauterine growth correlation to postnatal growth - Influence of risk factors and complications in pregnancy. *Early Hum Dev.* 1997;47:157-65.
275. Catalano PM, Thomas AJ, Avallone DA, Amini SB. Anthropometric estimation of neonatal body composition. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1176-81.
276. Dauncey M, Gandey G, Gairdner D. Assesment of total body fat in infants from skinfold thickness measurements. *Arch Dis Child.* 1977;52:223-7.
277. Schmelzle HR, Fusch C. Body fat in neonates and young infants: Validation of skinfold thickness versus dual-energy X-ray absorptiometry. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1096-100.
278. Yang M, Liu R, Li S, Luo Y, Zhang Y, Yang G, et al. Zinc- α 2-glycoprotein is associated with insulin resistance in humans and is regulated by hyperglycemia, hyperinsulinemia, or liraglutide administration. *Diabetes Care.* 2013;36:1074-82.
279. Yeung DCY, Lam KSL, Wang Y, Tso AWK, Xu A. Serum zinc- α 2-glycoprotein correlates with adiposity, triglycerides, and the key components of the metabolic syndrome in Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2531-6.
280. Yilmaz Y, Yonal O, Eren F, Ramazan K, Celikel C, et al. Serum zinc- α 2-glycoprotein concentrations in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:93-7.
281. Stejskal D, Karpíšek M, Reutová H, Stejskal P, Kotolová H, Kollár P. Determination of serum zinc- α -2-glycoprotein in patients with metabolic syndrome by a new ELISA. *Clin Biochem.* 2008;41:313-6.

-
282. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res.* 2005;46:1369–79.
 283. Catalano PM, Thomas A, Huston-presley L. Increased fetal adiposity: A very sensitive marker of abnormal in utero development. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:1698–704.
 284. Au CP, Raynes-Greenow CH, Turner RM, Carberry AE, Jeffery HE. Body composition is normal in term infants born to mothers with well-controlled gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36:562–4.
 285. Lee W, Balasubramaniam M, Deter R, Yeo L, Hassan S, et al. New fetal weight estimation models using fractional limb volume. *Ultrasound Obs Gynecol.* 2009;34:556–65.
 286. Lee W, Balasubramaniam M, Deter RL, Hassan SS, Gotsch F, Kusanovic JP, et al. Fetal growth parameters and birth weight: Their relationship to neonatal body composition. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33:441–6.
 287. Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res.* 2006;65(Suppl 3):28–33.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE NUEVAS ADIPOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL Y EN EL CRECIMIENTO FETAL

Silvia Daniela Naf Cortés

Dipòsit Legal: T 977-2015