



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Repercusiones endocrino-metabólicas del bajo peso al nacer: influencia de la alimentación precoz y del crecimiento post-natal

Giorgia Sebastiani

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorado en Medicina:

Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina

TÍTULO DEL TRABAJO:

“Repercusiones endocrino-metabólicas del bajo peso al nacer: influencia de la alimentación precoz y del crecimiento post-natal”

Tesis Doctoral presentada por **Giorgia Sebastiani** para optar al título de **Doctora** por la

Universidad de Barcelona

Dra. Lourdes Ibañez Toda

Directora

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección de la Dra. Lourdes Ibañez Toda del Servicio de Endocrinología del Hospital Sant Joan de Déu

Giorgia Sebastiani

Barcelona, Julio 2016

Informe de la Directora de Tesis

La directora de la tesis, Dra. Lourdes Ibañez Toda (DNI nº 46314657V)

CERTIFICA que la Tesis Doctoral titulada:

“Repercusiones endocrino-metabólicas del bajo peso al nacer: influencia de la alimentación precoz y del crecimiento post-natal”

presentada por Giorgia Sebastiani para la obtención del grado de Doctor en Medicina de la Universitat de Barcelona cumple con todos los requisitos administrativos y académicos para ser sometida a su defensa adelante de la comisión correspondiente.

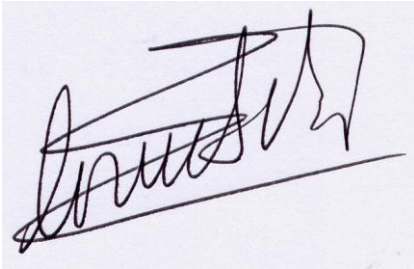
CERTIFICA que los artículos presentados en esta Tesis:

- Artículo 1: Circulating follistatin in the human foetus at term birth.
- Artículo 2: Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life.
- Artículo 3: Body composition and circulating high-molecular-weight adiponectin and IGF-1 in infants born small for gestational age: breast- versus formula-feeding.
- Artículo 4: Breast-feeding vs formula-feeding for infants born small-for-gestational-age: divergent effects on fat mass and on circulating IGF-1 and high-molecular-weight adiponectin in late infancy.
- Artículo 5: The Sequence of Prenatal Growth Restraint and Postnatal Catch-Up Growth Leads to a Thicker Intima Media and More Pre-Peritoneal and Hepatic Fat by Age 3-6 Years.

pertenecen a una misma unidad temática, que la doctoranda es la primera autora/coautora de la primera y la quinta publicación, la segunda autora/coautora de la tercera y cuarta publicación y la tercera autora/coautora de la segunda publicación; que están publicadas en revistas indexadas. Todos los artículos se sitúan en el primer cuartil

de su área de conocimientos excepto el primer artículo que se sitúa en segundo cuartil; ningún artículo forma parte de otra tesis doctoral.

Asimismo, la participación de la doctoranda ha sido fundamental y decisiva en el diseño, interpretación y análisis de los datos y redacción de los trabajos presentados.

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Lourdes Ibañez Toda'. There are some horizontal lines drawn across the signature, possibly indicating a signature line or a correction.

Dra. Lourdes Ibañez Toda,

Barcelona, 10 de Julio de 2016

AGRADECIMIENTOS

A todas las familias que han participado en nuestros estudios, gracias por confiar en nuestro equipo durante tantos años.

A la Dra. Lourdes Ibañez, por todo lo que he aprendido cómo endocrina y cómo investigadora durante todos estos años de trabajo juntas, por su apoyo en esta tesis y por confiar en mí.

A la Dra. Marta Díaz, por su incansable trabajo en las determinaciones de laboratorio y por las análisis estadísticas de todos los estudios, pero también por ser amiga, compañera y por apoyarme siempre de manera incondicionada en los momentos buenos y en los momentos duros de nuestro trabajo.

A todo el Equipo de Investigación de la Dra. Ibañez por ayudarme y apoyarme siempre.

A todo el Equipo de Sala de Partos del Hospital Sant Joan de Déu y a la Dra. María Dolores Gómez por la coordinación y la ayuda en la recogida de las muestras.

Al Dr. Abel López Bermejo por la ayuda en la análisis estadística de los artículos y al Dr. Francis de Zegher por su apoyo en la revisión de los artículos.

A Mis padres por todos los esfuerzos que han hecho para que pudiera llegar a formarme cómo pediatra, y por apoyarme siempre en todas las decisiones de mi vida.

A mi hermana Giada y a mis sobrinos Ale y Elena, aunque estemos lejos siempre estaremos unidos.

A Mauricio, Luca y Matteo mis tres hombres, lo mejor de mi vida, por la paciencia y el tiempo robado; a mis hijos les deseo que puedan tener todas las satisfacciones personales y profesionales en la vida que he tenido yo.

A Manu y África mis mejores amigas del Hospital.

A los compañeros que me han ayudado a mejorar el formato y las gráficas de esta tesis.

A tutti gli amici italiani, agli amici d' infanzia, dell' università e ai nuovi amici, grazie per il vostro affetto, e per mantenere vivi in me i ricordi dell' Italia.

ABREVIATURAS

ACVRIB: Activin type IIB

Adiponectina-APM: adiponectina de alto peso molecular

AEG: peso adecuado para la edad gestacional

AGL: ácidos grasos libres

AgRP: proteína r-argouti

aIMT: grosor de la íntima media aortica

C/EBP α : CCAAT enhancer-binding protein alfa

cIMT: grosor de la íntima media carotídea

DE: desviación estándar

CMO: contenido mineral óseo

DXA: absorciometría fotónica de doble energía de rayos X

FSH: hormona folículo-estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

GH: hormona de crecimiento

HOMA: homeostatic model assessment

IL-6: interleuquina-6

IL-10: interleuquina-10

IRS: receptor de la insulina

IMC: índice de masa corporal

IGFs: insulin like growth factors

LA: lactancia artificial

LM: lactancia materna

LPL: lipoproteín lipasa

LSH: lipasa sensible a hormona

NAFLD: non alcoholic fatty liver disease

NASH: esteatosis hepática no alcohólica

NFkB: factor nuclear kB

NPY: neuropéptido Y

PEG: pequeño para la edad gestacional

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gama

POMC: pro-opiomelanocortina

Pref-1: factor pre-adipocitario 1

SM: síndrome metabólico

Smad-2/3 : small mothers against decapentaplegic

TA: tejido adiposo

TAB: tejido adiposo blanco

TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa

TGF-beta: factor de crecimiento transformador beta

VCAM-1: vascular celular adhesion molecule-1

Vía ERK/MAPK: vía quinasa reguladora de la señal extracelular

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	pag. 5
ABREVIATURAS	pag. 9
1.INTRODUCCIÓN	pag. 19
1.1 BAJO PESO AL NACER: DEFINICIÓN	pag. 21
1.2 CRECIMIENTO FETAL	pag. 23
1.3 BAJO PESO AL NACER Y PROGRAMACIÓN FETAL (<i>FETAL PROGRAMMING</i>)	pag. 26
1.4 RELACIÓN ENTRE BAJO PESO AL NACER Y SÍNDROME METABÓLICO	pag. 27
1.4.1 <i>Definición de síndrome metabólico (SM)</i>	pag. 27
1.4.2 <i>Patogénesis del SM en niños PEG</i>	pag. 28
1.5 HIPERINSULINISMO Y GANANCIA PONDERAL EN INDIVIDUOS CON BAJO PESO AL NACER: RELACIÓN CON EL SM	pag. 30
1.5.1 <i>Crecimiento recuperador o catch-up</i>	pag. 30
1.5.2 <i>Programación fetal y resistencia a la insulina</i>	pag. 31
1.6 VENTANA CRÍTICA, IMPLICACION DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN EL SÍNDROME METABÓLICO E HIPÓTESIS DE LA EXPANSIBILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO	pag. 34
1.6.1 <i>Ventana crítica</i>	pag. 34
1.6.2 <i>Tejido adiposo y desarrollo de SM</i>	pag. 37
1.6.3 <i>Hipótesis de la expansibilidad del tejido adiposo blanco</i>	pag. 40
1.7 ADIPOQUINAS	pag. 44

1.7.1 ADIPONECTINA TOTAL Y ADIPONECTINA DE ALTO PESO MOLECULAR (APM)	pag. 46
1.7.2 LEPTINA	pag. 50
1.7.3 TNF- α / IL-6	pag. 54
1.7.4 FOLISTATINA	pag. 55
1.7.5 PREF-1	pag. 57
1.8 PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL E HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	pag. 60
1.9 INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN NEONATAL SOBRE EL RIESGO CARDIOMETABÓLICO	pag. 63
1.10 PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL: ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ADOLESCENCIA Y EN LA EDAD ADULTA	pag. 67
2. HIPÓTESIS	pag. 71
3. OBJETIVOS	pag. 75
4. RESULTADOS	pag. 79
4.1 ARTÍCULO 1	pag. 82
4.2 ARTÍCULO 2	pag. 85
4.3 ARTÍCULO 3	pag. 88
4.4 ARTÍCULO 4	pag. 96
4.5 ARTÍCULO 5	pag. 101
5. DISCUSIÓN	pag. 109
5.1. CARACTERÍSTICAS NEONATALES DE LOS NIÑOS PEG	pag.110

5.2. BAJO PESO AL NACER Y EVOLUCIÓN DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA: LACTANCIA MATERNA VS LACTANCIA ARTIFICIAL	pag. 117
5.3. BAJO PESO AL NACER Y EVOLUCIÓN A LOS 3-6 AÑOS DE VIDA	pag. 123
5.4 PUNTOS FUERTES Y LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS	pag. 128
6. CONCLUSIONES	pag. 130
7. BIBLIOGRAFÍA	pag. 134

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BAJO PESO AL NACER: DEFINICIÓN

Aproximadamente el 5% de los recién nacidos presentan un peso y/o longitud al nacer por debajo de los límites normales para su raza y entorno [medidos en desviaciones estándar (DE) de la media poblacional]. Actualmente, se define como recién nacido de bajo peso [pequeño para la edad gestacional, PEG] aquél que nace con un peso y/o longitud igual o inferior a -2 DE para la edad gestacional y sexo [1]. El retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) es un concepto dinámico diagnosticado mediante ecografía fetal y en la mayoría de los casos se debe a una insuficiencia placentaria medida por disminución de los flujos Doppler umbilicales [2,3] y fetales que puede estar asociada a patología o desnutrición materna pero puede estar relacionado también con enfermedades infecciosas, consumo de drogas o fármacos, factores genéticos y ambientales (ver Tabla 1) [4]. La Sociedad Americana de Obstetricia y Ginecología define el retraso de crecimiento intrauterino como “un feto que no puede alcanzar su potencial de crecimiento” y en el que su estimación de peso resulta inferior al percentil 10 (p10) según las curvas obstétricas [5]. En el estudio Irlandés PORTO se estima el riesgo fetal de padecer RCIU no sólo según el percentil de crecimiento sino también si el feto presenta además alteración del doppler de la arteria umbilical [6].

Tabla 1. Etiología del Retraso del Crecimiento Intrauterino

Fetal

Aneuploidia (trisomía 13, 18 y 21, triploidia, disomía uniparental)

Malformaciones Fetales (gastrosquisis, onfalocele)

Gestación Múltiple

Infecciones (toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, herpes)

Materna

Hipertensión

Diabetes

Enfermedad Renal

Enfermedad Vasculiar

Enfermedad Inflamatoria intestinal

Hipoxia (enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca)

Lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípidos

Trombofilia (Factor V de Leiden heterocigoto, Gen de la Protrombina G20210A heterocigoto, MTHFR heterocigoto)

Malformaciones uterinas (miomas, útero bicornio o septo)

Placentaria

Placenta previa

Tumores Placentarios

Mosaicismos

Ambiental

Estado socioeconómico bajo

Malnutrición

Tabaco

Alcohol

Drogas (cocaína, heroína, metadona, agentes terapéuticos)

1.2 CRECIMIENTO FETAL

El crecimiento fetal es un proceso complejo que depende del genotipo y epigenotipo del feto, de la nutrición materna, de la accesibilidad de nutrientes y de oxígeno al feto, de noxas intraútero (hipoxia, infección, tabaco) y de una variedad de factores de crecimiento y proteínas de origen materno o placentario.

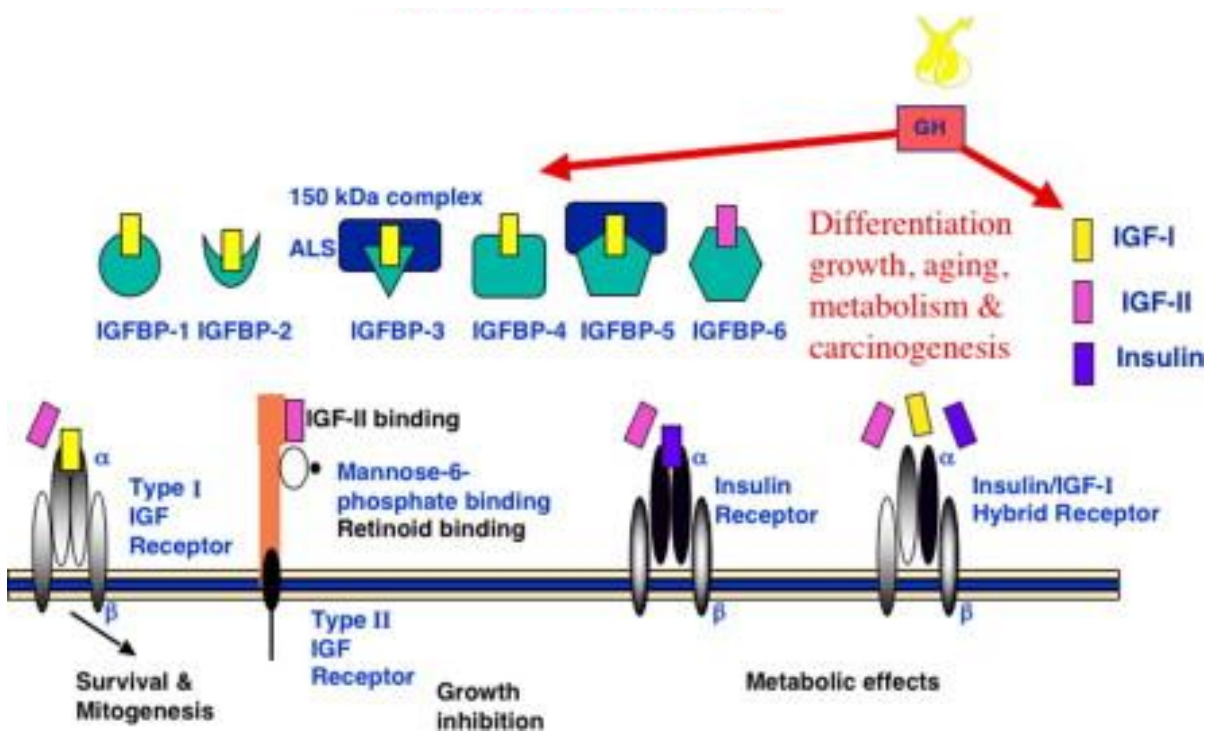
El factor genético influye en el crecimiento fetal principalmente en la primera mitad del embarazo. Por ejemplo la correlación entre bajo peso de la madre al nacer y bajo peso del neonato explica un efecto materno inter-generacional sobre el peso al nacer [7]. Los genomas parentales marcan una huella genómica o *genomic imprinting* desde la gametogénesis y explican entre un 35- 40% de las variaciones observadas en el peso al nacer. Este regulador genético viene modulado por otros reguladores de crecimiento externo: el regulador hormonal de origen fetal estimulante, y el regulador ambiental de origen materno y casi siempre restrictivo. Las principales hormonas implicadas en el control del crecimiento fetal son diferentes de las relacionadas con el crecimiento postnatal. Actualmente se conoce que el control fetal se debe a dos sistemas endocrinos: la insulina y el sistema de los *insulin-like growth factors* (IGFs). La insulina materna no atraviesa la barrera utero-placentaria, por lo que la insulina deriva del propio feto, aunque existe una correlación entre los niveles de insulina materna y el peso fetal. En los casos de restricción del crecimiento prenatal, existe una relativa resistencia a la insulina, a IGF-1 y a la hormona del crecimiento (GH). La regulación de las proteínas transportadoras de IGF también parece estar alterada [8].

Existen dos tipos de patrón anormal del crecimiento: simétrico y asimétrico. El patrón de crecimiento simétrico ocurre durante el primer trimestre del embarazo cuando el crecimiento fetal es debido principalmente a la división celular. Se caracteriza por el

tamaño reducido del esqueleto, cabeza, perímetro abdominal, peso, longitud y perímetro craneal que se sitúan por debajo del p10. Este tipo de crecimiento ocurre en un 20-30% de los niños con crecimiento fetal restringido, y las causas más comunes son malformaciones congénitas, drogas y otros agentes químicos, o patología metabólica materna [9]. El patrón de crecimiento asimétrico ocurre durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y es debido a una inadecuada presencia de sustratos para el metabolismo fetal, lo que determina un menor tamaño celular y menor peso fetal, con menos efectos en el número total de células, longitud y perímetro craneal. Este patrón de crecimiento afecta al 70-80% de niños con retraso del crecimiento fetal y es debido principalmente a una disminución de la perfusión utero-placentaria [10]. En el feto, la GH no juega un papel importante, siendo el eje de IGF el que controla directamente el crecimiento fetal. El IGF-1 es un polipéptido con estructura homóloga a la pro-insulina, con un peso molecular de 7,5 kDa; está codificado en el brazo largo del cromosoma 12. Su estructura similar a la insulina explica la capacidad de IGF-1 para unirse al receptor de la insulina, aunque con menor afinidad. Los IGFs se sintetizan en la mayoría de los tejidos siendo el hígado la principal fuente de IGF-1. IGF-1 y IGF-2 promueven el crecimiento fetal y post-natal ligando el receptor de IGF-1 que se encuentra en todos los tejidos incluida la placenta. Seis proteínas transportadoras modulan la acción del eje IGF (IGFBP-1 hasta IGFBP-6). [11]. Estas proteínas están formadas por 200-300 aminoácidos, y su peso molecular es de 25-31 kDa. La afinidad de las IGFBP por IGF está determinada por su estado de fosforilación, siendo las formas más fosforiladas las de mayor afinidad. Los niveles de IGFs y de las proteínas transportadoras están significativamente influenciadas por la nutrición fetal y por los niveles de insulina [12]. En el feto normal, los niveles de IGF-1 derivan principalmente de tejidos fetales y pueden

estar modulados por la placenta; aumentan significativamente entre las semanas 18-40, pero son cuatro veces inferiores a los niveles maternos [13].

Fig.1 Eje GH-IGF-IGFBPs



GH: hormona de crecimiento; IGF-1: insulin-like growth factor tipo 1; IGFBPs: insulin-like growth factor binding proteins

La nutrición materna puede alterar la expresión de genes fetales a través de la metilación del ADN del genoma fetal y el *imprinting* de estos genes. El retraso de crecimiento fetal “idiopático” podría deberse a alteraciones en el eje de IGF incluyendo mutaciones en heterozigosis, polimorfismos o mecanismos de regulación epigenética [14].

El crecimiento fetal es un proceso dinámico y está íntimamente ligado a la transferencia de nutrientes a través de la placenta, que a su vez está regulada por varios genes. El *imprinting* de estos genes (como el lactógeno placentario o hormonas esteroideas) y genes del eje de IGF están involucrados en la regulación de esta transferencia de

nutrientes a través de la placenta y como consecuencia del crecimiento fetal [15,16]. Se conoce que la aceleración del crecimiento del segundo y tercer trimestre de gestación se debe a la mayor o menor expresión de genes promotores o supresores del crecimiento, respectivamente. En fetos con patrón de crecimiento normal los cambios dinámicos del *imprinting* de estos genes optimizan el crecimiento fetal/placentario manteniendo un balance entre la expresión de los genes paternos que son promotores de crecimiento y los genes maternos que son supresores. Se ha demostrado que algunos de estos genes supresores del crecimiento están más expresados en las placentas de fetos con bajo peso [17,18].

1.3 BAJO PESO AL NACER Y PROGRAMACIÓN FETAL (*FETAL PROGRAMMING*)

La palabra *programming* se refiere a un mecanismo mediante el cual una agresión en un periodo crítico de la vida fetal o del desarrollo puede crear una predisposición a padecer una enfermedad a lo largo de la vida. Fetos expuestos a condiciones subóptimas durante la vida intrauterina programan mecanismos de desarrollo para la supervivencia anticipando condiciones similares postnatales. Si en la vida postnatal los recursos son abundantes, el organismo no está preparado para hacer frente al cambio y se hace más sensible al desarrollo de enfermedades [19]. Integrado al concepto de reprogramación fetal es la existencia de una ventana de sensibilidad, un período de tiempo durante el cual el organismo es particularmente sensible a las condiciones ambientales. Este período se caracteriza por cambios dinámicos y aumento de velocidad en la diferenciación/proliferación celular. El periodo intrauterino es un periodo clave de plasticidad del desarrollo y de máxima sensibilidad a insultos externos, aunque existen otras ventanas de sensibilidad como el periodo pre-concepcional y el periodo inmediato post-natal [20]. Otros autores introducen una hipótesis alternativa según la cual el estrés

intraútero causa una predisposición a desarrollar enfermedades crónicas pero sólo si en el periodo post-natal se manifiestan factores estresantes adicionales como obesidad o dieta hipercalórica. Esto ocurriría por ejemplo en países con un nivel de desarrollo medio donde a la escasa nutrición intrauterina seguiría una sobrenutrición en la vida adulta con el consecuente incremento de incidencia de diabetes [21].

1.4 RELACIÓN ENTRE BAJO PESO AL NACER Y SÍNDROME METABÓLICO

1.4.1 Definición de síndrome metabólico (SM)

La asociación entre bajo peso al nacer con hipertensión y diabetes tipo 2 [hipótesis del “origen fetal” del síndrome metabólico (SM)], fue descrita en adultos hace 30 años por Barker y cols. [22-25]. Posteriormente el hipocrecimiento prenatal y el crecimiento rápido posterior se han relacionado con el desarrollo de enfermedad coronaria en la edad adulta [26], y con otros componentes del denominado SM algunos de manifestación más precoz: resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, hipertensión, aumento de los depósitos de grasa visceral de distribución central con o sin obesidad, dislipemia, hiperandrogenismo ovárico, alteración de marcadores de inflamación como la PCR ultrasensible e hígado graso [27]. El acumulo de grasa visceral y la resistencia a la insulina tendrían un papel fundamental en la génesis del SM. Aunque la definición de SM sigue siendo controvertida, algunas de las alteraciones asociadas a riesgo cardiovascular son detectables ya en edad pediátrica, habiéndose desarrollado criterios de SM en niños. Independientemente de las diferencias raciales, la obesidad visceral, la resistencia a la insulina, la hipertensión y las concentraciones bajas de adiponectina se han propuesto como los marcadores más fiables del síndrome metabólico en niños [28]. La disminución de la producción de adiponectina, una adipoquina con propiedades anti-diabéticas, anti-

arteroescleróticas y anti-inflamatorias, sería un marcador precoz del SM [29, ver adiponectina apartado 1.7.1].

La prevalencia de SM ajustada por la edad entre la población adulta en Estados Unidos es de 23,7% o 47 millones de personas y la prevalencia aumenta desde 6.7% en individuos entre 20-29 años hasta más del 40% en personas de más de 60 años [30]. Otro estudio detecta una prevalencia en Estados Unidos en adolescentes del 9,2% siendo la prevalencia mucho más alta, estimada en un 38,7%, en niños con obesidad moderada y hasta un 49,7% en niños con obesidad mórbida [31,32].

1.4.2 Patogénesis del SM en niños PEG

La patogénesis del SM no está del todo esclarecida. Se ha descrito que fetos PEG presentan un deterioro del doppler de la arteria umbilical que conlleva a cambios fisiopatológicos durante la vida fetal. Según la teoría del *programming*, el feto responde a la disfunción placentaria con mecanismos compensatorios preservando el cerebro y el miocardio y llevando a la descompensación otros órganos como hígado, músculo, páncreas, riñón y tejido adiposo [33]. Las células responden al estrés con cambios epigenéticos (cambios en la función del gen sin cambios en la secuencia genética) como alteración de la metilación o transcripción de los genes, además presentan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, y alteraciones específicas en cada órgano [19]. La reprogramación anormal del páncreas es uno de los mecanismos principales que llevaría al SM. En animales de experimentación el estrés prenatal durante la gestación puede reducir la masa y la función de las células beta con una disminución de la respuesta de la insulina a los niveles de glucosa [34].

Las funciones de la insulina son bien conocidas:

- aumenta el transporte de glucosa hacia el músculo y tejido adiposo (a través del enzima GLUT-4), reduce la producción hepática de glucosa (inhibe la gluconeogénesis y la glucogenolisis), y estimula la síntesis de glucógeno
- aumenta el aclaramiento de los triglicéridos transportados a través de los quilomicrones en la circulación e inhibe su catabolismo a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormona (LSH)
- en los adipocitos aumenta la síntesis de triglicéridos a partir de la reesterificación de los ácidos grasos libres (AGL)
- activa selectivamente la lipoproteína-lipasa del tejido adiposo e inhibe la muscular permitiendo almacenar los triglicéridos en el tejido adiposo
- disminuye el flujo de AGL hacia el hígado e inhibe la cetogénesis hepática
- aumenta la síntesis proteica y reduce el catabolismo proteico muscular.

El estrés prenatal promueve una alteración de la respuesta a la insulina en el hígado, con consecuente gluconeogénesis hepática que contribuiría a la hiperglucemia, además existe un incremento de los niveles de triglicéridos por el aumento de la síntesis de los ácidos grasos hepáticos y disminución de la beta oxidación [35]. También a nivel del músculo esquelético se produce un mecanismo de resistencia a la insulina, siendo significativamente menor en estos fetos el contenido de glucógeno y la captación de glucosa a través de la enzima 2-desoxiglucosa estimulada por la insulina (en condiciones normales el 80% de la captación total de la glucosa del organismo ocurre en músculo esquelético) [36]. A nivel del tejido adiposo las alteraciones intraútero provocan un aumento de citoquinas pro-inflamatorias como Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- α), Interleuquina 1-beta (IL1- β) e Interleuquina-6 (IL-6), que actúan en tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético, el hígado y el endotelio, determinando un estado de inflamación. Además el aumento de los AGL inhibe la captación de glucosa estimulada

por la insulina en el músculo y reduce la lipólisis dependiente de la insulina [37]. Estos mecanismos parecen estar relacionados, cómo se demuestra en un estudio en ratas, con una alteración a nivel de las vías de señalización activadas por el receptor de la insulina, dado que ratas con retraso de crecimiento tienen niveles bajos de fosfatidilinositol 3-quinasa y de proteína quinasa B pero niveles similares del receptor de insulina y de fosforilación de la tirosina a nivel del receptor [38].

1.5 HIPERINSULINISMO Y GANANCIA PONDERAL EN INDIVIDUOS CON BAJO PESO AL NACER: RELACIÓN CON EL SM

1.5.1 Crecimiento recuperador o *catch-up*

El 90% de los individuos PEG han recuperado el percentil de crecimiento que genéticamente les corresponde a los 2 años de edad. Este crecimiento recuperador o *catch-up* es un mecanismo de supervivencia y de compensación a la desnutrición intrauterina y se refiere a un aumento de la velocidad de crecimiento con consecuente cambio en el percentil de crecimiento. El mecanismo por el cual se produce todavía no está bien esclarecido, se han propuesto dos hipótesis: la hipótesis neuroendocrina y la hipótesis de la placa de crecimiento [39]. Según la hipótesis neuro-endocrina hay mecanismos propios del sistema nervioso central que van ajustando el crecimiento, regulando la talla actual del individuo según la que le correspondería por la edad, de acuerdo con su potencial genético y la talla media parental. La otra teoría sugiere que el crecimiento recuperador es debido a mecanismos intrínsecos a la placa de crecimiento [40]. La nutrición jugaría un papel fundamental en los mecanismos que producen el *catch-up* (ver apartado 1.9). En la mayoría de niños PEG, el *catch-up* empieza rápidamente en las primeras semanas postnatales, y se ha producido ya a los 12 meses de edad [41].

Estudios recientes han demostrado que el bajo peso al nacer *per se* no es un factor clave en la génesis de las alteraciones que componen el SM. Sin embargo, la combinación de bajo peso al nacer con un crecimiento recuperador exagerado postnatal, específicamente con una ganancia rápida de peso en los primeros meses de vida, parece ser el elemento fundamental que conlleva al desarrollo completo del SM ya en la adolescencia y se relaciona con la teoría de la programación fetal [42,43]. Esta secuencia también se ha observado cuando se combina un peso al nacer dentro del rango adecuado para la edad gestacional con una ganancia rápida de peso y el desarrollo ulterior de obesidad. En ratas sin bajo peso al nacer el aumento de ingesta calórica durante los primeros días de vida provoca una aceleración del crecimiento y un aumento de las concentraciones de insulina, colesterol, tensión arterial y obesidad [44].

1.5.2 Programación fetal y resistencia a la insulina

Según la teoría del “*fetal programming*”, la malnutrición durante épocas críticas del crecimiento y desarrollo puede alterar estructuras y funciones de algunos órganos especialmente del sistema neuro-endocrino y determinar cambios permanentes en el metabolismo glucosa-insulina, como una reducción de la secreción de insulina o resistencia a la insulina, mecanismo denominado hipótesis del fenotipo del ahorro [45]. En condiciones de malnutrición un genotipo que confiere resistencia a la insulina sería preferentemente seleccionado durante la evolución porque incrementaría la supervivencia. Este fenómeno se conoce como la hipótesis de la supervivencia de los niños PEG [46]. La adaptación a la malnutrición intraútero aumenta la sensibilidad de los tejidos periféricos a los glucocorticoides y la insulina, mejorando la supervivencia y aumentando el crecimiento pero programaría al feto a aumentar el apetito con consecuente desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina. La hipótesis alternativa

sugiere que el estado de resistencia a la insulina en los PEG estaría ya determinado genéticamente independientemente del ambiente intrauterino desfavorable como consecuencia de una predisposición genética a alteraciones metabólicas. Según esta teoría (*fetal-insulin hypothesis*) habría polimorfismos o mutaciones en los genes asociados a resistencia a la insulina que alterarían el crecimiento intrauterino, y aumentarían la susceptibilidad para diabetes tipo 2. Las alteraciones monogénicas que alteran la secreción de insulina fetal causan retraso de crecimiento durante el tercer trimestre justo cuando el aumento de insulina es el factor de crecimiento más importante [47]. Estos desórdenes genéticos son raros, por lo cual la teoría actual es que ambas hipótesis, la genética junto con los factores ambientales y sus interacciones contribuyan al desarrollo del SM [48].

La resistencia a la insulina sería el mecanismo clave que llevaría al desarrollo del SM. Los primeros estudios retrospectivos describieron que adultos jóvenes que habían nacido con bajo peso ya presentaban resistencia a la insulina a pesar de tener el mismo índice de masa corporal (IMC) [49]. También Ong et al. demostraron que el “*catch-up*” que realizan estos niños durante los primeros 3 años de vida se acompañaba de un incremento de los niveles de insulina y de IGF-1 a los 8 años de edad que se correlacionaba positivamente con el IMC [50,51].

Estudios prospectivos más recientes demuestran que los niños PEG nacidos a término presentan al nacer insulinas más bajas que los niños con peso adecuado para la edad gestacional (AEG). Sin embargo, en los que han realizado el *catch-up*, los valores de insulina se encuentran ya elevados al año de vida, en comparación con niños AEG, aunque el IMC es menor [52]. Este hallazgo persiste en la misma cohorte a los 3 años de edad y se relaciona con el rápido incremento de peso desde el nacimiento hasta los 3 años [53]. Los valores de IGF-1 también son más bajos al nacer en niños PEG, lo que

confirma el papel clave del IGF-1 -como de la insulina- en el crecimiento fetal [54]. Los niños PEG que experimentan un crecimiento rápido y aumento de peso postnatal excesivo también presentan un aumento más rápido de IGF-1 circulante entre el nacimiento y los 3 años comparados con niños AEG; los niveles de IGF-1 tienen una relación directa con la ganancia de peso y una relación inversa con la secreción de insulina, indicando un estado de resistencia a la insulina y posiblemente también de resistencia a IGF-1 [55].

El papel de IGF-1 en el metabolismo de la glucosa es bien conocido. El IGF-1 regula la homeostasis de la glucosa, mantiene la secreción de insulina y promueve el crecimiento y la diferenciación de las células beta del páncreas [56]. Los animales de experimentación con delección hepática de IGF-1 tienen concentraciones de insulina basales más altas e intolerancia a la glucosa [57]. Por eso el rápido *catch-up* acompañado de aumento de los niveles de IGF-1, podría ser crucial para lograr una masa de células beta suficiente para mantener la adecuada secreción de insulina, al aumentar la demanda de producción de las células beta, si durante la infancia se desarrolla obesidad y resistencia a la insulina [58]. Se han relacionado polimorfismos comunes del gen del IGF-1 con el tamaño al nacer y las variaciones de los niveles circulantes de IGF-1, indicando que la masa y la función de las células beta del páncreas están ya programadas intraútero y reducidas en niños PEG, hecho que explicaría la relación entre el bajo peso al nacer y la resistencia a la insulina [59].

Se ha sugerido que el hiperinsulinismo resultante del *catch-up* ya presente en los niños PEG en edades tempranas de la vida, sea el responsable de las alteraciones que componen el SM. La interacción entre la adaptación fetal a un ambiente uterino adverso y la susceptibilidad genética sería crucial para el desarrollo del SM y conferiría a la larga un mayor riesgo metabólico y cardiovascular [60]. Los tejidos fetales en PEG crónicamente

deficientes en insulina e IGF-1 de repente expuestos en la vida post-natal a aumento rápido de las concentraciones de estos marcadores desarrollan resistencia a la insulina como mecanismo de defensa que protegería de la hipoglucemia [61].

1.6 VENTANA CRÍTICA, IMPLICACION DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO EN EL SÍNDROME METABÓLICO E HIPÓTESIS DE LA EXPANSIBILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSEO

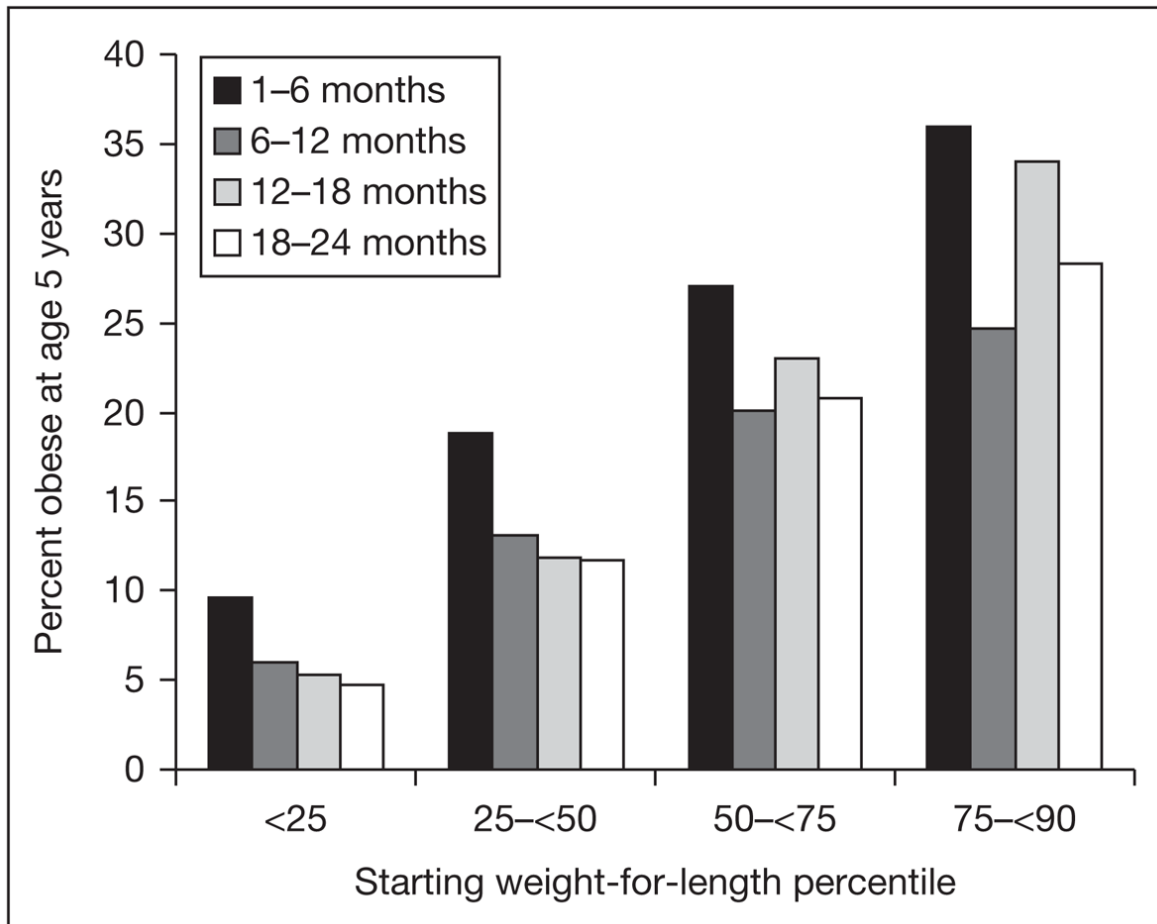
1.6.1 Ventana crítica

El período más vulnerable o ventana crítica de la vida postnatal durante el cual la ganancia rápida de peso después de una restricción del crecimiento fetal determina un aumento de riesgo cardiovascular futuro y SM no está bien determinado. La aparente controversia en los estudios existentes podría deberse a su carácter retrospectivo y a la heterogeneidad de factores ambientales y alimentarios que pueden ser determinantes en la evolución individual de la curva pondo-estatural.

El periodo crítico durante el cual un crecimiento recuperador llevaría a las complicaciones metabólicas futuras parece situarse en los primeros meses de vida postnatal, aunque no existe consenso. Un crecimiento exagerado durante los primeros 6 meses de vida se relacionaría con aumento del IMC a los 4 años [62]. Un estudio reciente de Singhal et al. sitúa la ventana crítica en las primeras 2 semanas de vida postnatal: adolescentes con antecedentes de prematuridad que tuvieron un aumento de peso exagerado durante este periodo de la vida, presentaron una menor distensibilidad de la arteria braquial (una medida precoz de disfunción endotelial) comparados con los que hicieron un crecimiento más lento o con controles normopeso. Esto da soporte a la hipótesis de que un crecimiento lento durante las primeras semanas de vida postnatal tendría un efecto beneficioso sobre el riesgo cardiovascular futuro [63]. Botton et al. también demostraron

que un aumento de peso entre los 3-6 meses era predictivo de más masa grasa en la adolescencia [64]. Chomtho et al. mostraron que un aumento de peso en los primeros 3 meses de vida era predictivo de aumento de masa grasa y magra en la edad adulta, que un incremento de peso entre los 3 y 6 meses era predictivo sólo del aumento de masa grasa, y que un incremento de peso entre los 6-12 meses no era predictivo de estas variables [65]. Gillman recientemente observó que un incremento de percentiles de la relación peso-talla en los primeros 6 meses de vida era predictivo de alto riesgo de obesidad a los 5 años [66].

Fig. 2 Prevalencia de obesidad e incremento de percentiles en la infancia



La prevalencia de obesidad en niños de 5 años (IMC > 95^o percentil) es precedida por un incremento de percentiles entre 1-6, 6-12, 12-18, y 18-24 meses de edad. Gillman et al. [66].

Los primeros 3-6 meses de vida representan una fase dinámica y un periodo de plasticidad y elevada sensibilidad a influencias ambientales que programarían efectos adversos en la vida futura. El crecimiento recuperador acelerado durante esta época llevaría al daño celular, incremento del estrés oxidativo, disminución de la longitud telomérica, y reducción del *turnover* proteico [67] por mecanismos epigenéticos que influirían en la disregulación y cambios permanentes de la expresión de los genes.

1.6.2 Tejido adiposo y desarrollo de SM

El tejido adiposo (TA) parece jugar un papel fundamental en el desarrollo del SM en niños PEG. Antiguamente, el TA se consideraba un órgano para almacenamiento del exceso de energía en forma de grasa. Actualmente se considera que el TA es un órgano dinámico, donde se almacena el exceso de energía pero también un órgano endocrino que sintetiza hormonas -las adipoquinas- que juegan un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa y en la inflamación, modulando el metabolismo de varios órganos incluyendo músculo, hígado, endotelio vascular y cerebro [68]. El TA se compone de adipocitos y una fracción de estroma vascular en el cual macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y pre-adipocitos están presentes. Los pre-adipocitos se originan de una célula multi-potente de origen mesodérmico que tiene el potencial de generar nuevos adipocitos que persisten durante toda la vida. El papel principal del TA es de almacenar los AGL después de la ingesta y liberarlos durante el ayuno para asegurar la homeostasis energética. Durante el periodo post-prandial, los AGL son adsorbidos desde el torrente sanguíneo hasta el tejido adiposo a través de la hidrólisis de los triglicéridos en las lipoproteínas ricas en los mismos (lipoproteína de muy baja densidad VLDL-c) y quilomicrones, gracias a la lipoproteín lipasa (LPL). La movilización de estas reservas ocurre gracias a la hidrólisis de los triglicéridos en los adipocitos a través de la lipasa sensible a la hormona (LSH). La insulina es la principal reguladora de los depósitos de grasa en los adipocitos siendo un potente inhibidor de LSH, aumentando la captación de los AGL y la síntesis de triglicéridos en los adipocitos [69].

La adipogénesis se produce en el TA subcutáneo y es el proceso en el cual se diferencian los adipocitos maduros a partir de sus precursores (*stem cells* o pre-adipocitos). El factor de transcripción más importante en el control de la adipogénesis es el PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). El PPAR γ promueve la diferenciación

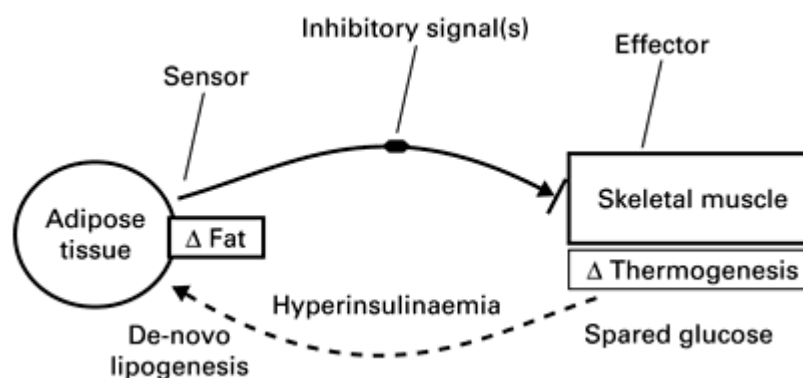
de los adipocitos inmaduros y el almacenamiento de los lípidos en las células adiposas maduras, y tiene un papel central en la regulación del desarrollo de los adipocitos y de los depósitos de grasa. Las ratas sin expresión de PPAR γ 2, la isoforma de PPAR γ implicada en la adipogénesis, desarrollan todas las características del SM [70].

Este proceso es muy sensible al ambiente nutricional, en particular a las concentraciones de IGF-1, glucosa, insulina y glucocorticoides. Si las células grasas o adipocitos están expuestos a un exceso de nutrientes en momentos cruciales de su desarrollo en la vida fetal, se altera el desarrollo del TA y aumenta la capacidad de formar nuevos adipocitos (adipogénesis). Si por el contrario están expuestos a un déficit de nutrientes, tienden a almacenar lípidos en los adipocitos ya existentes (lipogénesis) durante la vida postnatal. Estos individuos tienden a almacenar el exceso de energía en forma de grasa y aumentan su susceptibilidad a la obesidad y a sus consecuencias metabólicas.

El estado de resistencia a la insulina descrito anteriormente está vinculado a una ganancia desproporcionada de masa grasa durante el *catch-up* [71]. Estudios hechos en adultos jóvenes encontraron que a paridad de IMC los que habían nacido PEG tenían más proporción de masa grasa abdominal comparados con los niños AEG [72] y además el músculo presentaba una reducción de la expresión de proteínas clave implicadas en las vías de señalización de la insulina y transporte de glucosa [73]. En estudios hechos en animales se ha demostrado que una limitación de alimentos asociada a una pérdida de peso provocaría supresión de la termogénesis, que es un mecanismo necesario para conservar la energía y que ocurre principalmente en el TA marrón y en el músculo esquelético. Si hay una depleción de las reservas del TA blanco debida a malnutrición, el TA blanco ejerce una supresión de la termogénesis para ahorrar energía (control específico del TA sobre la termogénesis o *adipose-specific control of thermogenesis*) [74]. La supresión de la termogénesis alteraría el metabolismo del músculo esquelético, que

llevaría a una reducción en la utilización de glucosa por parte del músculo provocando hiperinsulinismo y la utilización de la glucosa durante la realimentación para la lipogénesis *de novo* y para aumentar las reservas insuficientes de TA. Esto provocaría un estado de resistencia a la insulina en el músculo y una hiper-respuesta a la insulina en el TA blanco durante la fase de realimentación y *catch-up* [75]. La supresión de la termogénesis resultaría en un exceso de masa grasa durante el *catch-up* por conversión de las células del TA marrón a adipocitos blancos en respuesta a dieta hipercalórica y para almacenar energía [76], con redistribución central de la grasa, aumento de lípidos circulantes y resistencia a la insulina; todos estos cambios adaptativos precederían las complicaciones del SM [77].

Fig. 3 Mecanismos de supresión de la termogénesis.



Fuente: Dulloo et al. [74]

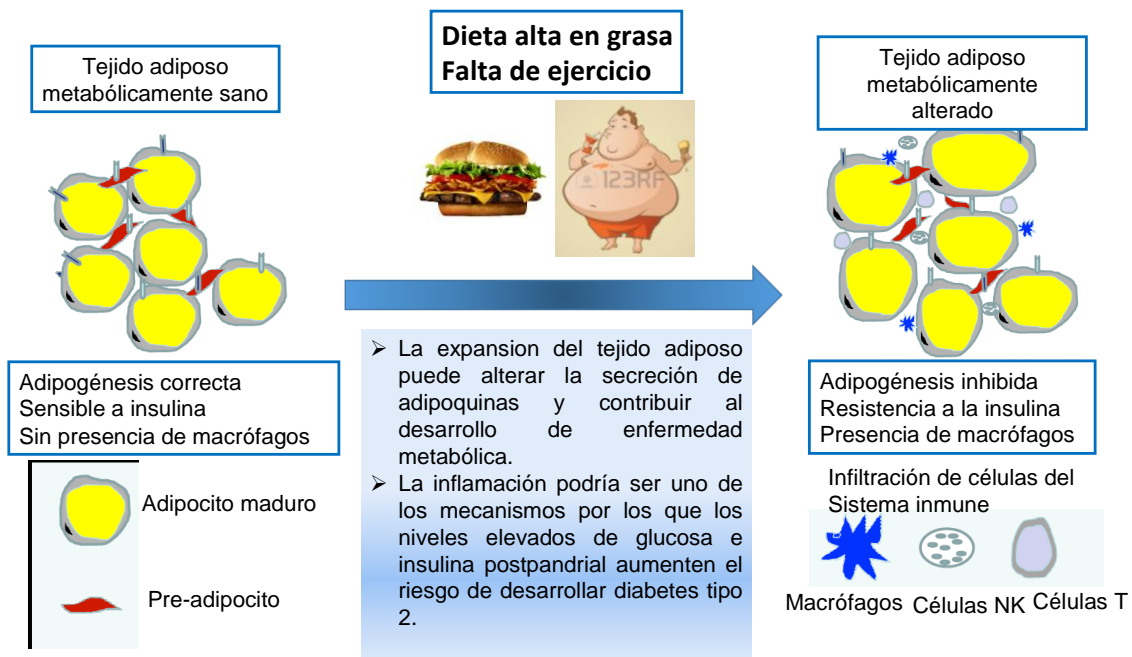
Se ha descrito que ya entre los 2 y los 4 años los niños nacidos PEG que han realizado crecimiento recuperador, a pesar de la misma ganancia de peso, acumulan más grasa abdominal y tienen más resistencia a la insulina, comparados con niños AEG [78].

1.6.3 Hipótesis de la expansibilidad del tejido adiposo blanco

Recientemente se ha descrito la teoría de la expansibilidad del TA blanco que explicaría los mecanismos patogénicos que llevarían al SM. Según esta teoría el TA tiene una capacidad limitada para expandirse de manera segura para almacenar el exceso de lípidos de la ingesta. Esta capacidad es predeterminada individualmente por factores genéticos y ambientales. Cuando el TA subcutáneo excede su máxima capacidad de almacenamiento se produce lipotoxicidad, que se caracteriza por aumento de AGL y triglicéridos, un perfil de adipoquinas desfavorable y acúmulo ectópico de lípidos en hígado, músculo o páncreas. Esta lipotoxicidad tiene un efecto adverso sobre el metabolismo y la acción de la insulina, y se produciría al alcanzarse un “setpoint metabólico”, un límite por encima del cual un mayor almacenamiento de lípidos provocaría lipotoxicidad y resistencia a la insulina [79]. Este mecanismo determina, por la imposibilidad de reclutar nuevos adipocitos, un aumento del tamaño de los mismos (hipertrofia). Esta hipótesis ha sido demostrada en ratones, en los cuales citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, producidas por los adipocitos hipertróficos, además de infiltración de macrófagos producirían un estado inflamatorio [80-82]. El estudio reciente de Spalding et al. [83] demuestra que el periodo de reclutamiento durante el cual aumenta y se establece el número de adipocitos subcutáneos ya está establecido durante la infancia y adolescencia y permanece estático en la edad adulta, sugiriendo un umbral máximo individual para la expansión del TA. Las ventanas críticas para este reclutamiento serían el período prenatal y los primeros meses de vida (antes de los 2 años) y el período puberal (10-14 años). Durante la infancia, el número de adipocitos crece de manera dramática, y ocurre antes en sujetos obesos ($2,1 \pm 0,9$ años en obesos/ $5,7 \pm 0,8$ años en sujetos delgados), el número relativo de adipocitos es mayor en obesos pero el límite de expansión se alcanza antes ($16,5 \pm 1,3$ años) que en sujetos delgados ($18,5 \pm 0,7$). Por

esta razón el número total de adipocitos durante la infancia se establece antes en sujetos obesos que en sujetos delgados y el *turnover* del TA mantiene estable este número establecido de adipocitos.

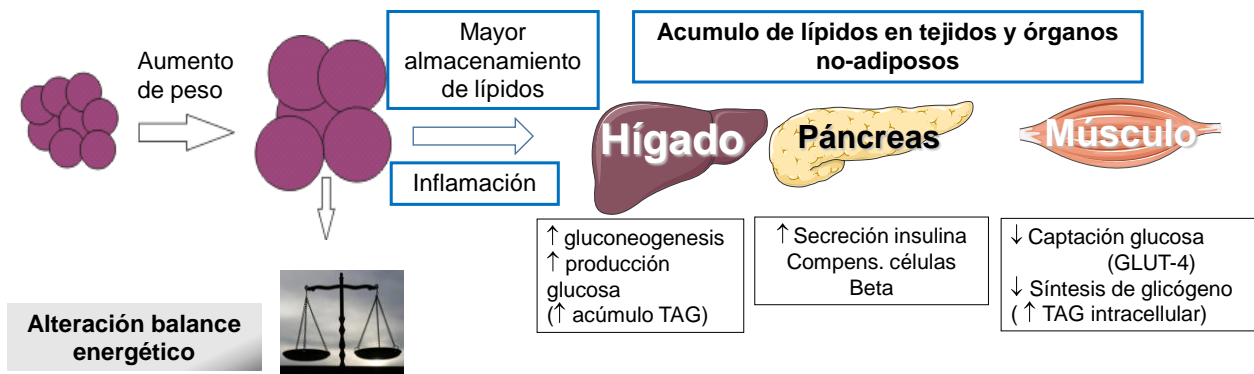
Fig.4 Expansibilidad del TA: consecuencias metabólicas



Células NK: Natural Killers. Fuente: Elaboración propia.

La hipertrofia el TA limita la función fisiológica de los adipocitos [84]. En estado postprandial hay una reducción en la habilidad de la insulina en suprimir la lipólisis y un fallo en la capacidad del TA en captar lípidos desde la circulación. Este proceso aumenta los AGL y triglicéridos circulantes, que se acumularían en otros órganos como el hígado y el músculo determinando resistencia a la insulina [85]. También el acúmulo de los triglicéridos en las células beta conlleva un fallo de estas células.

Fig.5 Síndrome metabólico y mecanismos de lipotoxicidad



TAG=triglicéridos. GLUT-4: glucose transporter type 4. Fuente: elaboración propia

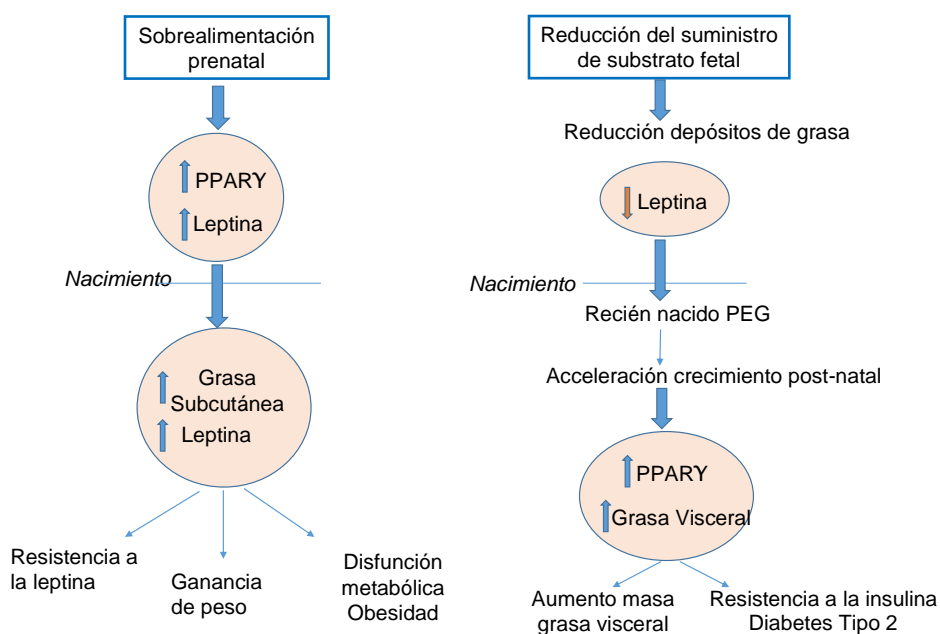
Según estudios experimentales los humanos en la infancia tienen el mayor porcentaje de TA subcutáneo por peso corporal [86].

Los depósitos excesivos en el TA subcutáneo en niños expuestos a exceso de nutrientes intraútero, están más asociados a hiperleptinemia llevando a una resistencia a la leptina y mayor susceptibilidad a ganar peso [87]. Al contrario, en individuos expuestos a desnutrición durante la gestación, el desarrollo de los adipocitos inicialmente se ve afectado a favor de los órganos esenciales [88] por lo cual estos individuos cuando nacen tienen poco TA subcutáneo y visceral, pero realizan un *catch-up* recuperador a expensas del TA visceral hecho que llevaría a la lipotoxicidad [89].

Los TA subcutáneo y visceral tienen funciones y características distintas. Los genes que codifican angiotensinógeno (regulador de la tensión arterial), factores del complemento, y de proteínas ligadoras de los ácidos grasos, se expresan más en el TA visceral. Además

el TA visceral drena directamente a la circulación portal. Los depósitos en el tejido subcutáneo son metabólicamente menos activos, secretan más leptina y adiponectina y menos AGL y producen de la misma manera TNF- α que el TA visceral [87]. El acumulo de TA en el compartimento visceral llevaría a resistencia a la insulina.

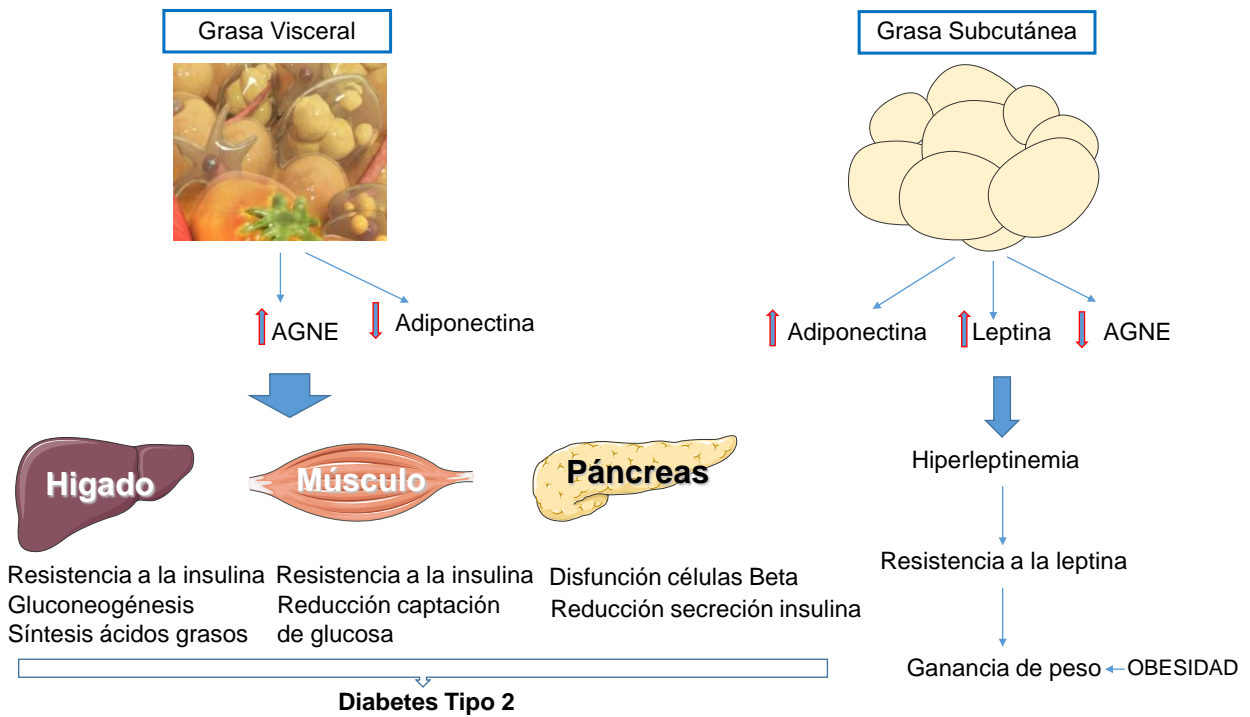
Fig.6 Consecuencias de la sobrealimentación o desnutrición prenatal



PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

Fuente: adaptado de Muhlhausler et al. [87]

Fig.7 Diferentes funciones del TA subcutáneo y visceral: implicaciones en el SM



AGNE: ácidos grasos no esterificados

Fuente: adaptado de Muhlhausler et al. [87]

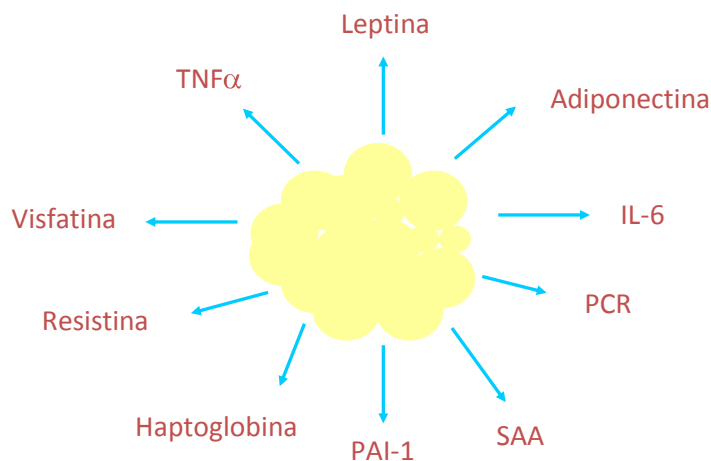
1.7 ADIPOQUINAS

El TA secreta múltiples adipoquinas que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina y que tienen varias acciones pro- y anti- inflamatorias regulando los mecanismos de inflamación subclínica, y modulan también la capacidad de expansión del TA [90,91]. La obesidad y la hipoxia local son determinantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el TA [92,93]. La hipertrofia del TA en sujetos obesos determina hipoxia local, aumento de infiltración de los macrófagos y desregulación en la producción de adipoquinas que causaría un estado de inflamación crónica y resistencia a la insulina [94,95]. El TA subcutáneo también participa en la producción de adipoquinas pro-inflamatorias [96]. En sujetos delgados el TA secreta preferiblemente adipoquinas anti-

inflamatorias como la adiponectina, TGF- β o IL-10, mientras que en sujetos obesos el TA secreta adipoquinas e interleuquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, leptina y reduce la producción de las adipoquinas anti-inflamatorias [97]. El estado de enfermedad metabólica altera las funciones de las adipoquinas determinando directamente resistencia a la insulina por alteración de las vías de señalización de la insulina, o indirectamente por estimulación de las vías inflamatorias [98]. El bajo peso al nacer y sus complicaciones metabólicas se relacionan con alteraciones en las funciones y vías de señalización de las adipoquinas.

Fig.8

IMPLICACIÓN DEL TAB EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA



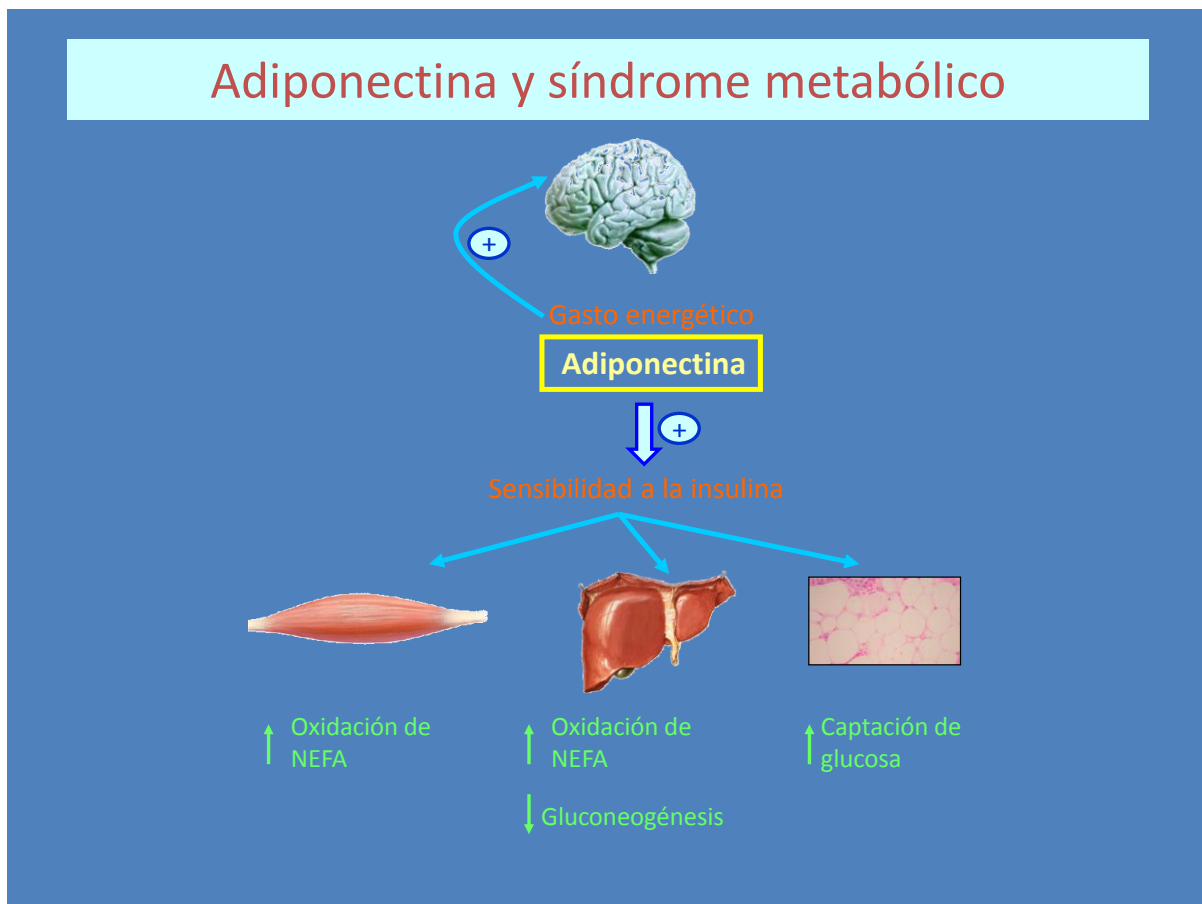
TAB: tejido adiposo blanco; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-6: interleuquina-6; PCR: proteína C reactiva; SAA: amiloide sérico A. Fuente: elaboración propia.

1.7.1 ADIPONECTINA TOTAL Y ADIPONECTINA DE ALTO PESO MOLECULAR (APM)

La adiponectina está codificada por el gen apM1 (*abundant gene transcript-1*). Su concentración oscila entre 2-20 mcg/ml por lo cual es una proteína relativamente abundante en plasma. Su producción está regulada por PPAR γ [99]. Los sujetos con diabetes y obesidad tienen niveles circulantes bajos de adiponectina [100,101] que se relacionan inversamente con el aumento de la adiposidad central [102]. La adiponectina incrementa la secreción y transcripción de insulina mediada por los niveles de glucosa, y en cultivos celulares tiene efectos anti-apoptóticos en célula beta [103]. Estas funciones se realizan a través del receptor de la adiponectina ADIPOR1 que se expresa en las células beta pancreáticas y músculo esquelético y ADIPOR2 que se expresa en hígado. Su activación incrementa la actividad de la ceramidasa provocando un decremento intracelular de ceramida y un aumento de los niveles de los metabolitos anti-apoptóticos como la esfingosina-1 fosfato [104]. En el músculo esquelético mediante el receptor ADIPOR1, actúa a través de la AMP-proteína-quinasa e incrementa la captación de glucosa (vía translocación del GLUT-4) y la glicólisis no oxidativa, reduciendo también el contenido intramiocelular de triglicéridos y promoviendo la oxidación de los AGL [105]. En cultivos celulares de pacientes diabéticos se ha demostrado que la acción de la adiponectina está dañada por lo cual esta adipoquina no puede estimular la fosforilación de la AMP-quinasa y la oxidación de ácidos grasos [106]. Estudios en animales han demostrado también que los receptores de la adiponectina tienen una densidad menor en ratones obesos con resistencia a la insulina [107]. La adiponectina suprime la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) y sensibiliza los hepatocitos a la acción de la insulina de manera que la producción de glucosa está suprimida por los niveles de insulina en presencia de niveles fisiológicos de adiponectina [108]. La adiponectina también actúa en el metabolismo de los AGL promoviendo su oxidación, disminuye la

lipogénesis y protege del desarrollo de hígado graso [109]. En el TA juega un papel autocrino o paracrino disminuyendo los macrófagos y suprimiendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias [110]. La adiponectina tiene efectos anti-aterogénicos: inhibe la expresión de moléculas de adhesión incluyendo la VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) y la E-selectina. Inhibe también el TNF- α e induce la activación del Factor Nuclear kB (NFkB) inhibiendo de esta manera la adhesión de los monocitos a las células endoteliales. Además inhibe la expresión del receptor tipo A-1 de los macrófagos (*macrophage scavenger receptor type A-1*) resultando en una marcada disminución en la captación del LDL oxidado e inhibición de la formación de nuevas células espumosas (*foam cells*), inhibiendo la proliferación y migración de las células del músculo liso [111]. Debido a todas estas funciones la adiponectina juega un papel prioritario en el metabolismo de la glucosa y tiene una acción anti-inflamatoria, anti-aterogénica y sensibilizante de la acción de la insulina. Los ratones con déficit de adiponectina desarrollan características del SM como resistencia a la insulina, dislipemia o hipertensión [112].

Fig.9 Implicación de la adiponectina-APM en el SM



NEFA: ácidos grasos no esterificados. Fuente: elaboración propia.

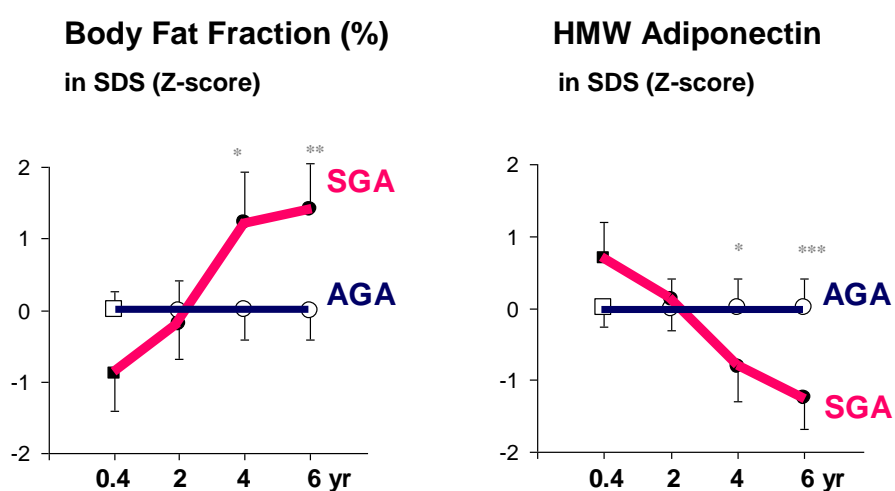
La adiponectina es secretada al torrente sanguíneo en 3 isoformas: de alto peso molecular (APM), de medio peso molecular (MPM) y de bajo peso molecular (BPM). De estas 3 isoformas, la adiponectina-APM es la forma metabólicamente más activa y el mejor marcador de resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular actuando principalmente en hígado [113,114]. En adultos y adolescentes los niveles totales de adiponectina y de adiponectina-APM son más altos en el sexo femenino debido a las concentraciones elevadas de testosterona en varones que modulan la acción de esta adipoquina [115]. En niños prepuberales las concentraciones de adiponectina-APM no varían entre sexos y se correlacionan inversamente con el IMC, el índice HOMA y la grasa visceral [116]. La expresión de genes de adiponectina y los niveles de esta proteína son

mayores en el TA subcutáneo que en el TA visceral [117]. Por tanto, el aumento de adiposidad visceral es un predictor negativo independiente de los niveles de adiponectina [118]; cuando aumenta la grasa visceral, el TNF- α actuaría modulando negativamente la adiponectina [119].

Las concentraciones de adiponectina en sangre de cordón son exclusivamente de origen fetal, se encuentran más elevadas que en adultos y se relacionan con el peso al nacer [120,121]. La relación directa con el peso al nacer reflejaría la composición corporal del recién nacido, cuya grasa total está constituida en un 90% por TA subcutáneo y en un 4% por TA visceral, por estas razones, los recién nacidos tienen mayor sensibilidad a la insulina que los adultos [122]. Kotani et al. demostraron una relación inversa entre la adiponectina en sangre de cordón y los niveles de insulina. También demostraron que los niveles de adiponectina a los 5 años eran más bajos que al nacimiento, lo que relacionaron con el incremento de grasa visceral (desde el 4% al nacer hasta el 11% entre los 4-8 años) [120]. Entre los 2 y los 6 años los niños PEG que realizan catch-up espontáneo tienen concentraciones elevadas de insulina, IGF-1, aumento de grasa visceral y disminución de los niveles de adiponectina-APM. Todos estos cambios estarían relacionados con el paso de un estado de sensibilidad a la insulina al nacer a un estado de resistencia a la insulina en la primera infancia [123].

Fig.10 Cambios longitudinales en la masa grasa y en la adiponectina-APM en niños AEG y PEG entre los 2-6 años.

Ibañez et al. [123]



Estudio longitudinal niños AEG ($n = 22$) y PEG ($n = 29$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ para AEG vs PEG.

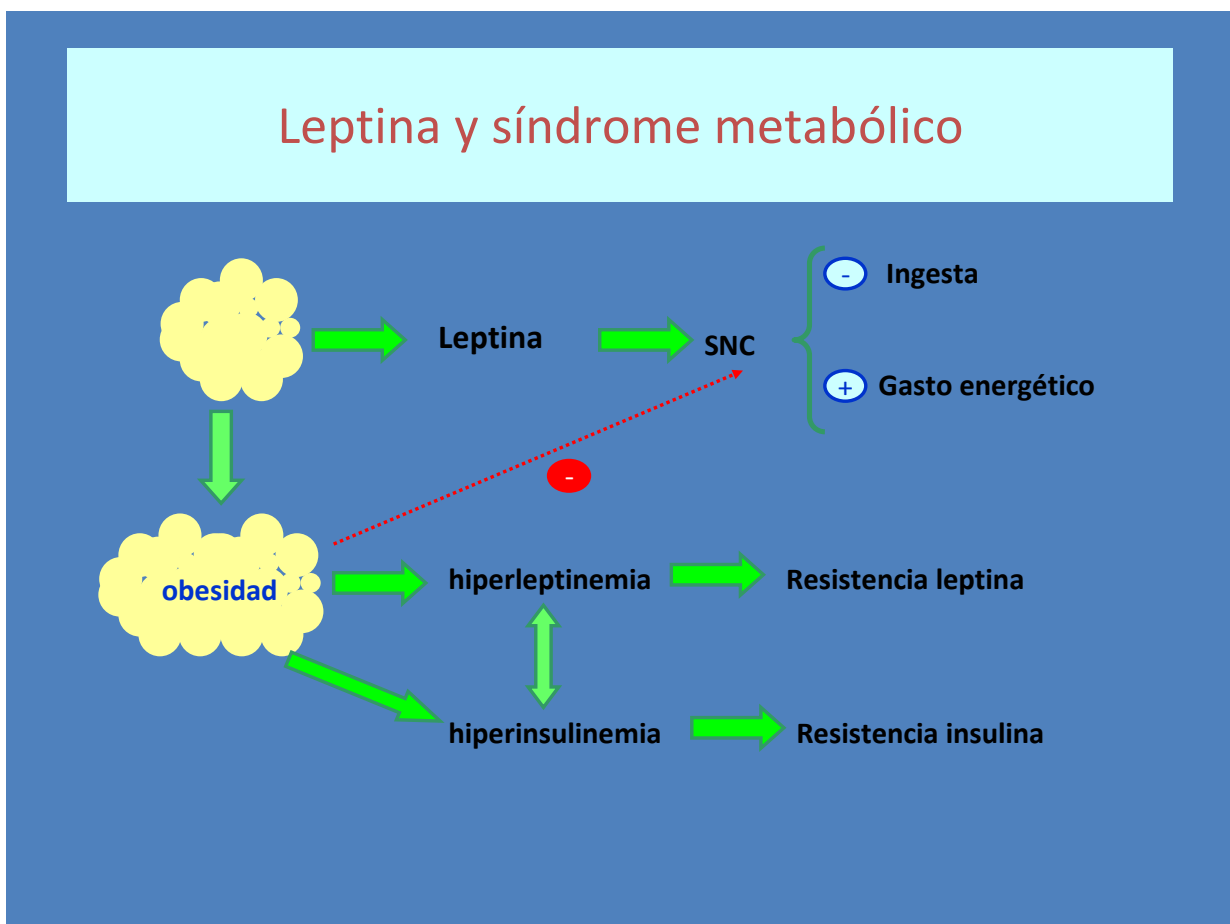
1.7.2 LEPTINA

La leptina fue una de las primeras adipoquinas secretada por el TA descritas en la literatura. La inyección de leptina en ratones obesos *ob/ob* (deficientes de leptina) reduce rápidamente la ingesta y la masa grasa manteniendo la masa magra; incrementa el gasto energético y restablece la glucemia y las funciones reproductoras, confirmando que tiene una papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética [124]. Esta adipoquina se produce principalmente en el TA pero se encuentra expresada en otros

tejidos como placenta, ovarios, mama, y médula ósea. Para realizar sus funciones se une a los receptores que están presentes en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos y de los cuales se han descrito 6 isoformas. La isoforma ObRb se expresa en el hipotálamo y es importante para la homeostasis energética, la regulación del apetito y las funciones neuroendocrinas [125]. La leptina ejerce un efecto anorexígeno aumentando la señal de saciedad activando la vía de la pro-opiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato e inhibe las neuronas orexígenas NPY (neuropéptido Y) y AgRP (proteína r-Agouti) [126]. En humanos, la leptina llega a la circulación de forma pulsátil y sigue un ritmo circadiano [127]. Los obesos tienen niveles circulantes de leptina más elevados debido a una mayor cantidad de tejido adiposo [128] aunque a paridad de IMC las mujeres tienen concentraciones más altas que los hombres [129]. En presencia de menos reservas del TA y durante el ayuno disminuyen las concentraciones de leptina para aumentar la ingesta, por lo cual se correlacionan directamente con el porcentaje de TA [130]. A nivel del eje hipotalámico-hipófiso-gonadal, la leptina regula la función reproductiva activando NPY, la POMC y la kisspeptina que actúan sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) [131]. La leptina aumenta la producción de Hormona de Crecimiento (*Growth Hormone*, GH) estimulando a nivel hipotalámico la hormona liberadora de GH (GHRH) [132]. En ratones *ob/ob* la inyección de leptina reduce los niveles de glucosa de manera dosis-dependiente, indicando que la leptina tiene efectos directos en la regulación de la sensibilidad a la insulina independientemente de los cambios en el peso corporal, porque en condiciones fisiológicas reduce significativamente la secreción de insulina de la célula beta [133, 134]. Estos efectos se realizan a través de vías de señalización central o a nivel periférico en los tejidos sensibles a la insulina. A nivel periférico la leptina aumenta los niveles de glucagón y GH en plasma para mantener la euglicemia y a través de un mecanismo central inhibe la producción de glucosa

hepática [135]; además incrementa la captación de glucosa y aumenta la oxidación de los AGL en músculo esquelético *in vivo* y en modelos animales y disminuye los depósitos de lípidos en el TA [136]. Estudios recientes han demostrado que todas estas funciones no se mantienen en personas obesas que además tienen concentraciones más elevadas de leptina, sugestivas de resistencia a la misma [137,138].

Fig. 11. Relación entre leptina y SM



SNC: sistema nervioso central. Fuente: elaboración propia.

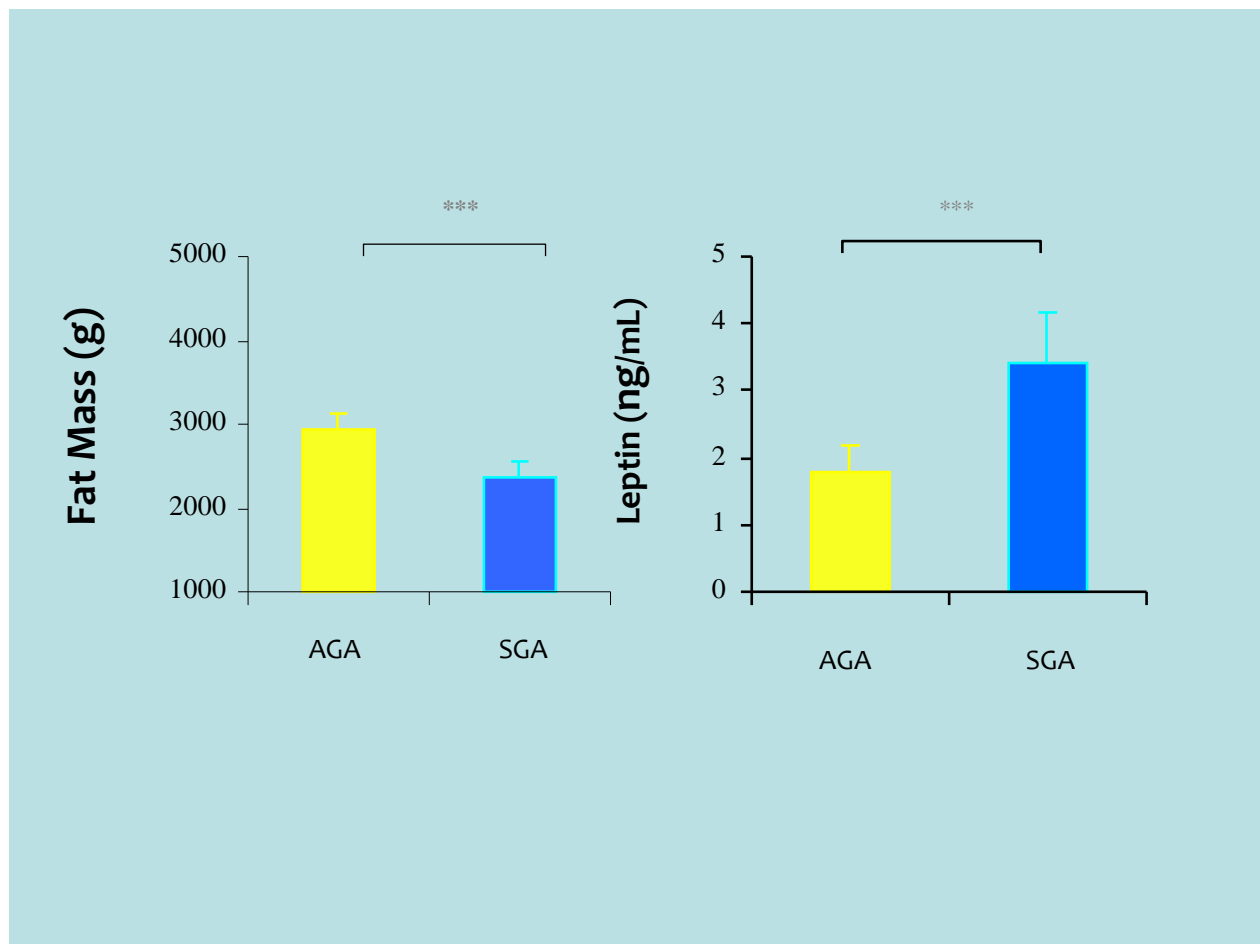
La leptina también regula el sistema inmune; una variedad de células del sistema inmunitario expresan el receptor de la leptina ObRb. La leptina aumenta la actividad

fagocítica en los macrófagos y promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-10 [139].

Durante la gestación la leptina es producida por el tejido adiposo materno y fetal y por la placenta [140]. La leptina en sangre de cordón oscila desde 2.0 hasta 84.5 ng/mL (media 19.9 +/- 17.4 ng/mL), siendo significativamente más baja en varones y tiene una relación directa con el peso al nacer y la masa grasa [141,142]. Los niños PEG tienen concentraciones más bajas de leptina en sangre de cordón, que se asocian a un crecimiento rápido post-natal con aumento de la ingesta calórica [143,144]. En un estudio realizado en ratas nacidas con bajo peso por malnutrición materna se demostró que en las ratas nutridas con dieta hipercalórica el tratamiento con leptina en el periodo neonatal reducía la masa grasa total, la ingesta calórica, y normalizaba los niveles de leptina y de insulina en edad adulta demostrando los efectos permanentes de la leptina en revertir la programación metabólica. Este estudio demuestra que la alteración de los niveles de leptina perinatal influencia las consecuencias metabólicas a largo plazo [145]. Además, las concentraciones de leptina durante las primeras semanas de vida se relacionan inversamente con el porcentaje de masa grasa a los 2 años así que parecen predecir la adiposidad posterior [146].

Nuestro grupo estudió la composición corporal y las concentraciones de leptina en niños PEG alimentados con lactancia materna (LM) exclusiva al nacer y a los 4 meses, demostrando que a los 4 meses los PEG son menos adiposos que los AEG pero tienen concentraciones de leptina dos veces superiores. Esta hiper-leptinemia podría deberse en parte a las concentraciones de leptina en la leche materna, y podría ser un mecanismo homeostático para reducir la ingesta en estos niños PEG alimentados al pecho y el posterior reclutamiento de masa grasa durante los primeros años de vida [147].

Fig.12 Masa grasa y niveles de leptina a los 4 meses en niños PEG y AEG alimentados con LM. Ibañez et al. [147]



Lactantes AEG (n=46; 23 niñas y 23 niños) y PEG (n=28; 14 niñas y 14 niños) a los 4 meses. ***p<0.001 AEG vs PEG.

1.7.3 TNF- α / IL-6

El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria y fue el primer factor derivado de los adipocitos al que se relacionó con obesidad, inflamación y resistencia a la insulina. Los macrófagos, que contribuyen de manera crucial a generar un estado inflamatorio, son la mayor fuente de TNF- α producido por el TA blanco [148]. El TNF- α reduce la fosforilación de tirosina en el receptor de la insulina IRS1 en músculo y tejido adiposo, provocando un estado de

resistencia a la insulina [149]. En humanos el TNF- α se encuentra elevado en suero y TA de sujetos obesos y los niveles circulantes disminuyen al perder peso [150]. El tratamiento con inhibidores de TNF- α en sujetos con SM mejora la resistencia a la insulina y aumenta las concentraciones de adiponectina [151].

La IL-6 aumenta la captación de glucosa en músculo esquelético durante el ejercicio, aumentando la miogénesis y la oxidación de los AGL, con efectos anti-inflamatorios [152]. En TA y en hígado, por el contrario, la IL-6 es una adipocina pro-inflamatoria; incrementa la resistencia a la insulina aumentando la expresión del supresor de la citoquina-signalling-3 (SOCS3), y la fosforilación del IRS1 [153]. La IL-6 se relaciona positivamente con aumento de la grasa visceral y con los AGL, y está elevada en diabetes tipo 2, además de incrementar el riesgo de padecer esta enfermedad [154].

1.7.4 FOLISTATINA

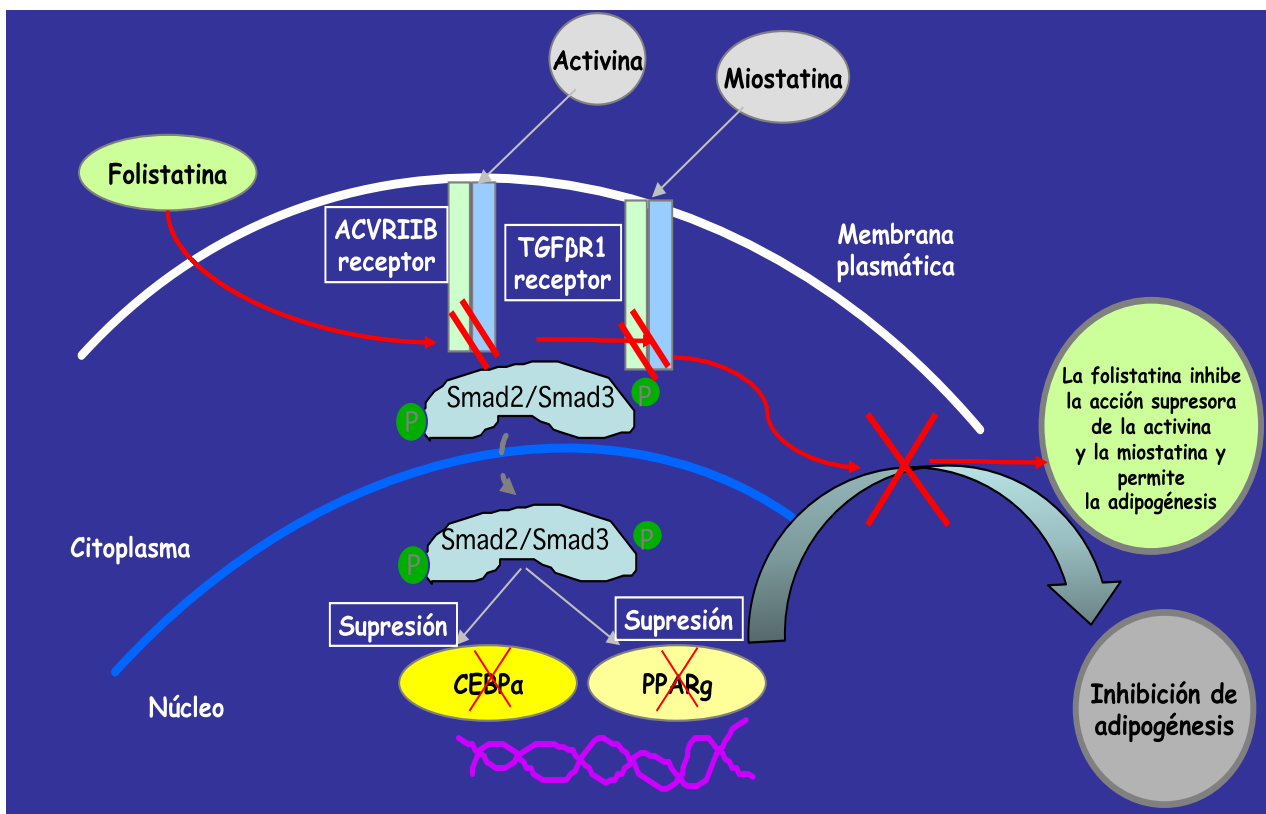
La folistatina es una glicoproteína extracelular que originalmente fue identificada como un inhibidor de la FSH (hormona folículo-estimulante) hipofisaria [155]. La folistatina se expresa en diversos tejidos y actúa como antagonista de algunos miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformadores β (TGF- β) como la activina, la miostatina y las proteínas óseas morfogénicas [156]. Existen 3 isoformas de folistatina (FST315, FST288, FST303); cada una es responsable de diferentes actividades biológicas. La isoforma FST315 que es la más larga, es la predominante y la FST303 está expresada fundamentalmente en ovario. La FST-like-3 (FSTL3) comparte la misma estructura y funciones que la folistatina, ambas regulan las actividades biológicas y homeostáticas de la activina, aunque la FSTL3 es un antagonista más débil de la activina dado que no contiene la región conocida como secuencia ligadora de la heparina (*Heparin Binding Sequence HBS*) a través de la cual se liga a los proteoglicanos en la superficie

celular [157]. La miostatina es un factor clave en la regulación de la masa del músculo esquelético, se expresa exclusivamente en músculo y es un potente regulador de su crecimiento. En animales de experimentación, la inhibición de miostatina aumenta la masa muscular [158]. La folistatina es un potente inhibidor de la miostatina y el aumento de expresión de la folistatina en ratas transgénicas provoca un aumento dramático de la masa muscular [159]. La hipertrofia muscular inducida por la folistatina se caracteriza por un aumento del diámetro de las fibras musculares, y del contenido proteico del músculo. La folistatina actúa también ligando el receptor de la activina, e inhibiendo esta proteína que causa atrofia muscular [156]. Los ratones homocigotos para una mutación con pérdida de función del gen FST de la folistatina tienen menos tejido muscular demostrando la importancia de la folistatina en la regulación de la miogénesis [160]. La folistatina media también los efectos miogénicos de los andrógenos [161] y regula la formación, crecimiento y síntesis de cartílago [162].

Recientemente se ha descrito que la folistatina promueve la adipogénesis atenuando la acción inhibitoria de la activina A y de la miostatina en la diferenciación de los pre-adipocitos en adipocitos maduros. La folistatina inhibe la unión de la activina y miostatina con sus receptores Activin type IIB y TGF β R1 que activarían la fosforilación de Smad-2/3 (*small mothers against decapentaplegic*) que inhibe la adipogénesis [163]. El TA subcutáneo secreta folistatina *in vitro* y la isoforma FST315 es la predominante. En mujeres obesas los niveles del mRNA de folistatina son bajos en TA subcutáneo y aumentan cuando se produce pérdida de peso. El tratamiento con folistatina recombinante promueve la diferenciación de los progenitores de los adipocitos y neutraliza la acción inhibitoria de la miostatina *in vitro*, demostrando la importancia de la folistatina en la adipogénesis [164]. La folistatina también promueve la diferenciación de los adipocitos del TA marrón regulando el metabolismo energético [165]. A nivel del

metabolismo de la insulina la expresión aumentada de folistatina en ratas reduce el acúmulo de grasa secundario a una dieta rica en grasa y mejora la sensibilidad a la insulina en músculo, la sensibilidad hepática al glucagón y el contenido de glucagón pancreático [166].

Fig. 13 Funciones de la folistatina en la adipogénesis



ACVR1IB: Activin type IIB; TGF- β : factores de crecimiento transformadores β ; Smad2/3: small mothers against decapentaplegic; CEBP α : CCAAT/ enhancer binding protein alfa; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

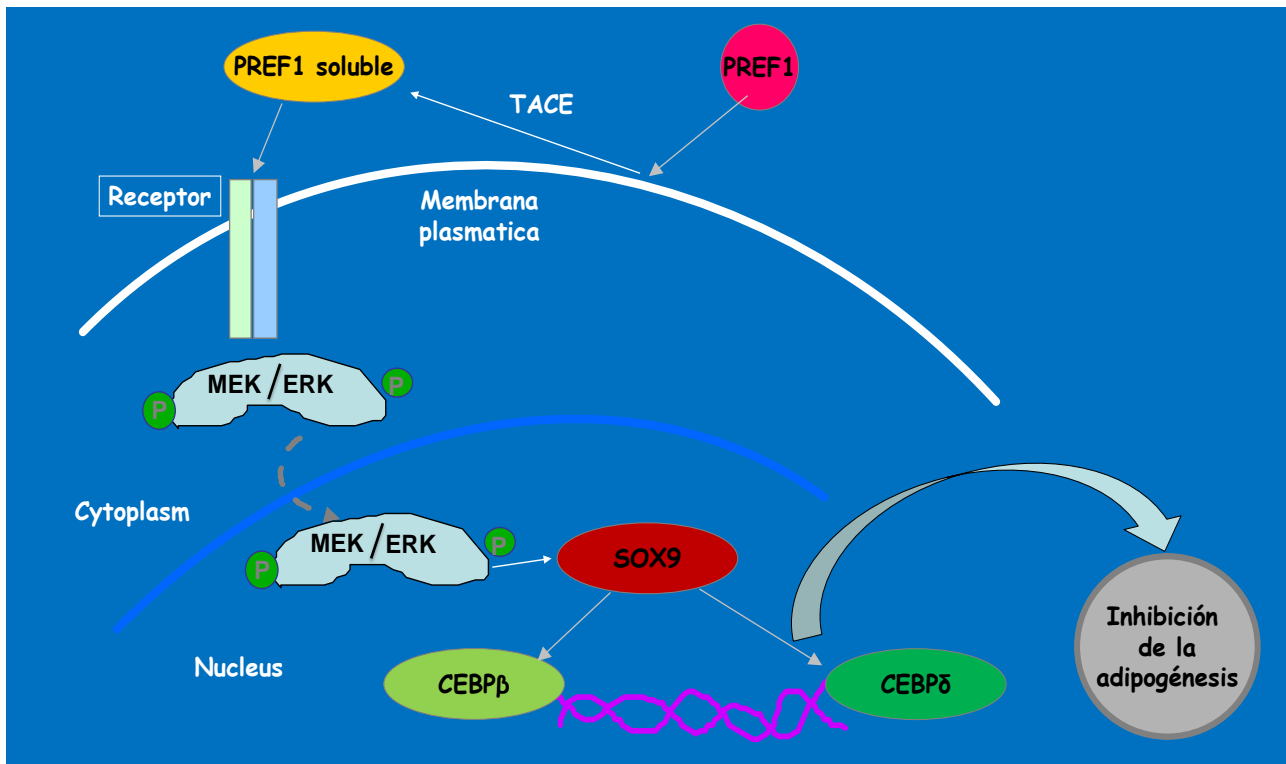
Fuente: elaboración propia.

1.7.5 PREF-1

El Pref-1 (factor pre-adipocitario 1) también conocido como Delta-like-1 (Dlk-1) y antígeno fetal A (FA1) es una proteína transmembrana codificada por un gen expresado en el

cromosoma 14q32 que contiene un dominio extracelular constituido por repeticiones del factor de crecimiento epidérmico [167]. La parte junto a la membrana a través del enzima convertidor de TNF- α (TACE), genera una forma soluble de 50-KDa, que es la forma biológicamente activa que inhibe la diferenciación de los adipocitos aumentando la expresión de Sox9 en los pre-adipocitos. Sox9 directamente liga C/EBP β , C/EBP δ y PPAR γ , suprimiendo su transcripción, y suprimiendo su actividad promotora, por lo cual previene la diferenciación de los adipocitos. Además Pref-1 promueve la inducción de condrocitos en células mesenquimales generando condrocitos inmaduros e inhibiendo su maduración y la diferenciación de los osteoblastos [168, 169]. El mRNA de Pref-1 y los niveles de esta proteína están elevados en los pre-adipocitos 3T3-L1 *in vitro*, pero la expresión del Pref-1 disminuye durante la diferenciación de los adipocitos y está ausente en adipocitos maduros por lo cual el Pref-1 se utiliza habitualmente como marcador pre-adipocitario. El aumento de Pref-1 inhibe la diferenciación de los adipocitos y la ausencia de Pref-1 aumenta la diferenciación de adipocitos en cultivos celulares [169]. Pref-1 activa la vía ERK/MAPK (vía quinasa reguladora de la señal extracelular) para inhibir la diferenciación de los adipocitos [170].

Fig.14 Mecanismos de inhibición de la adipogénesis de Pref-1



TACE: enzima convertidor TNF- α ; SOX9 (SRY-related HMG-box) transcription factor; MEK/ERK: mitogen-activated protein kinases/ extracellular signal-regulated kinases; C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein beta; C/EBP δ : CCAAT/enhancer-binding protein delta.

Fuente: elaboración propia

Los ratones sin Pref-1 tienen más TA y mayor expresión de marcadores adipocitarios, con consecuente aumento de los lípidos circulantes, una característica asociada comúnmente a la obesidad [171]. Por el contrario, los ratones con más expresión de Pref-1 tienen menos TA blanco y menor diferenciación de los adipocitos demostrando que niveles adecuados de Pref-1 son esenciales para el correcto desarrollo del TA [172]. Las biopsias del TA subcutáneo y omental de sujetos obesos metabólicamente sanos, presentan concentraciones más bajas de Pref-1, de macrófagos, de TNF- α , y de factor estimulante de las colonias de los granulocitos, y mayores concentraciones de

adiponectina. Además Pref-1 en TA omental se correlaciona positivamente con el tamaño de los adipocitos, el porcentaje de hígado graso, glucosa y triglicéridos e inversamente con el colesterol HDL y la adiponectina. Concentraciones elevadas de Pref-1 en sujetos con problemas metabólicos limitarían la diferenciación de los pre-adipocitos llevando a una hipertrofia de los escasos adipocitos maduros, mientras que las concentraciones bajas en sujetos metabólicamente sanos reflejarían un aumento de la capacidad adipogénica del TA subcutáneo y omental resultando en aumento del número de las células adiposas pequeñas y “sanas” (hiperplasia) con reducción de los depósitos de lípidos ectópicos. Estas características en obesos sanos tendrían un papel protector frente a un perfil metabólico adverso asociado a un exceso de adiposidad hipertrófica [173]. Recientemente se ha descrito que mujeres que desarrollaban diabetes como consecuencia de resistencia a la insulina, tenían niveles más bajos de Pref-1 durante el seguimiento y que la incidencia de evolución a diabetes fue más alta cuanto más bajos fueron los niveles de Pref-1, por lo cual los niveles de Pref-1 pueden utilizarse como marcador precoz del riesgo de desarrollar diabetes [174].

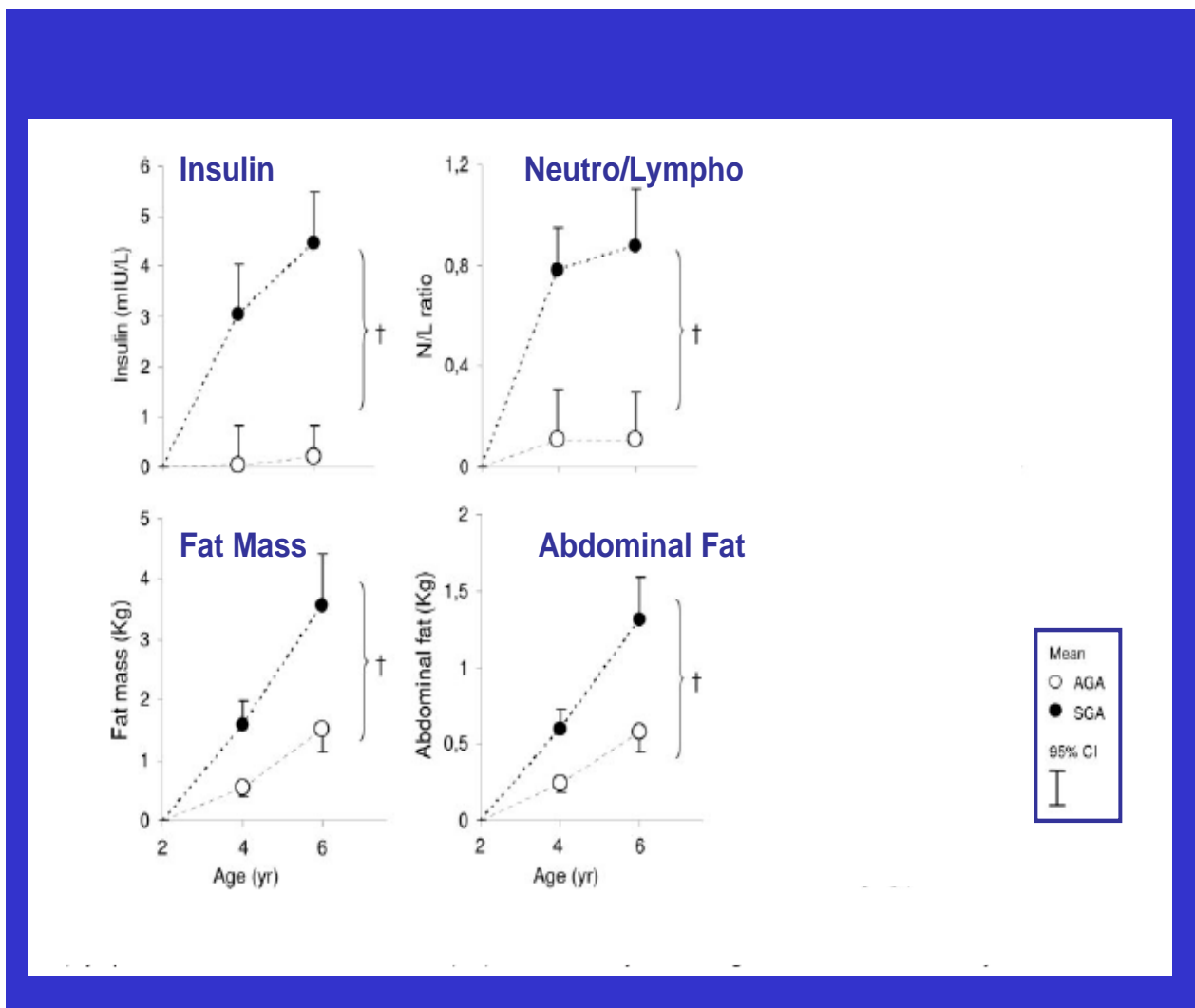
1.8 PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL E HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La resistencia a la insulina que desarrollan los PEG juega un papel fundamental en la patogénesis del hígado graso no alcohólico o NAFLD (*non alcoholic fatty liver disease*). El término NAFLD se refiere a un espectro de enfermedades que incluyen desde el hígado graso a la esteatosis hepática no alcohólica (NASH) con o sin fibrosis que puede evolucionar a cirrosis hepática. El hígado graso es un proceso mayoritariamente benigno mientras que la inflamación propia de la NASH sería el mecanismo que llevaría a la cirrosis y al carcinoma hepático. Hay varias teorías sobre la patogénesis de esta entidad. El acumulo de lípidos en el hígado y la resistencia a la insulina son los mecanismos

primarios para la génesis de NASH que llevarían al hígado a ser más vulnerable a insultos secundarios como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la disfunción del TA en la producción de adipocinas [175]. Como se ha descrito anteriormente en la teoría del *programming* los niños PEG presentan una alteración del funcionamiento del hígado desde el nacimiento por redistribución del gasto cardiaco a los órganos esenciales. La malnutrición intrauterina alteraría además la expresión de determinados genes como el PPAR- α y el *liver X receptor alpha* (Lxra) por mecanismos epigenéticos que alterarían a su vez el metabolismo de lípidos en el hígado y contribuirían a la esteatosis hepática [176]. Ibáñez et al. describieron que niños PEG a los 6 años tenían más predisposición a acumular grasa visceral que los AEG, en ausencia de obesidad y esto se acompañaba de un cambio de un estado de sensibilidad a la insulina a un estado de resistencia a la insulina [177].

Fig. 15 Incremento de masa grasa abdominal en niños PEG entre los 2-6 años.

Ibañez et al. [177]



Incremento de insulina, ratio neutrófilos/linfocitos, masa grasa y grasa abdominal entre los 2 y 6 años en niños AEG (n=22) y PEG (n=29). † p < 0.0001 para los cambios entre AEG y PEG

El acumulo de grasa visceral en niños PEG sería el factor determinante para el desarrollo de resistencia a la insulina [75]. La redistribución de glucosa del musculo-esquelético al TA durante el *catch-up* sería un evento crucial en la relación entre *catch-up*, hiperinsulinemia y riesgo de SM [178]. Estudios recientes han demostrado que la resistencia a la insulina sería el determinante fundamental en la génesis de la NASH también en sujetos no obesos [179]. Faienza et al. demostraron que niños nacidos PEG,

que a los 8 años de edad desarrollaban NAFLD, tenían un HOMA más elevado que se correlacionaba con la esteatosis hepática independientemente del IMC y se acompañaba de un incremento de grasa visceral [180]. La disfunción de TA y la alteración del patrón de adipocinas son factores clave en la patogénesis de la NAFLD. La disminución de la sensibilidad a la insulina en el TA favorecería el aumento de la lipólisis y del flujo de los AGL y de IL-6 al hígado con el consecuente acumulo de triglicéridos en hígado [181]. La disminución de la adiponectina debido al aumento de TA visceral provocaría una disminución de la sensibilización de los hepatocitos a la acción de la insulina [108]. Los descendientes de ratas con bajo peso expresan menos PPAR γ y más el elemento regulador esteroide de la *binding-protein-1* y de la síntesis de AGL, proteínas que están involucradas en la regulación del metabolismo lipídico y en la respuesta inflamatoria asociada con la NAFLD [182].

1.9 INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN NEONATAL SOBRE EL RIESGO CARDIOMETABÓLICO

El crecimiento rápido y exagerado durante los primeros meses de vida post-natal sería un determinante fundamental del riesgo de padecer obesidad y diabetes tipo 2 en la adolescencia y edad adulta. La ganancia rápida de peso durante los primeros meses de vida -definida como un aumento de $>0,67$ DE entre el nacimiento y los 24 meses-, se asocia a riesgo de padecer obesidad en la adolescencia [183,184]. Ekelund et al. realizaron un estudio prospectivo donde valoraron que el crecimiento rápido postnatal durante los primeros 6 meses de vida y entre los 3 y 6 años se asociaban a mayor IMC y masa grasa en la adolescencia [185].

En la ganancia de peso influyen factores genéticos clave en el crecimiento post-natal [186] pero también hay numerosos estudios que apuntan al papel fundamental de la

nutrición. Un desequilibrio en la nutrición durante la gestación o durante el periodo de la “ventana crítica” post-natal alteraría, por mecanismos epigenéticos, la metilación del ADN y la expresión de determinados genes, por ejemplo el de la POMC, un factor anorexígeno hipotalámico, provocando su menor expresión con el consecuente aumento de la ingesta. También la sobrealimentación post-natal provocaría la hipermetilación del gen promotor del receptor hipotalámico de la insulina produciendo resistencia a la insulina a ese nivel [187]. Una alteración en la nutrición y en la regulación hormonal durante la gestación y en el periodo post-natal podría influenciar entonces el desarrollo del hipotálamo, principal regulador del control del apetito [188].

El tipo de alimentación recibida durante el periodo post-natal juega un papel fundamental en estos mecanismos. El estudio longitudinal de Karaolis et al. demuestra que niños nacidos AEG con crecimiento rápido desde el nacimiento hasta los 2 años tienen riesgo de presentar obesidad y aumento de masa grasa a los 6 años de edad especialmente los que recibieron leche artificial. Además los que habían ganado peso rápidamente desarrollaban más masa grasa si eran hijos de madres obesas o fumadoras [189]. Estudios observacionales apuntan al papel protector de la LM sobre el riesgo de adiposidad en la edad adulta, aunque hay otros estudios que no lo demuestran [190]. Existen varios mecanismos a través de los cuales la LM tendría un papel protector frente a la obesidad. Los niños alimentados con LM controlan la cantidad de leche que consumen por lo cual auto-regulan la ingesta y el gasto energético. El contenido de leptina en la LM actúa a nivel cerebral y promueve la formación de circuitos neuronales que controlan la ingesta y previenen la adiposidad futura [191]. Se ha demostrado también que la LM se asocia a menores concentraciones de masa grasa y de leptina en la adolescencia sugiriendo que la mejor regulación del apetito en niños que recibieron LM, persiste en la adolescencia y en la vida adulta [192]. La leche materna contiene más

ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (PUFA) y menos proteínas [193], además de hormonas, factores de crecimiento y factores bioactivos en cantidades adecuadas [194]. Los niños que reciben LM tienen un patrón de crecimiento más lento con consecuente menor riesgo de enfermedades cardiovasculares [63]. Se ha descrito que la LM exclusiva durante 4 meses determina menor masa grasa a los 24 meses [195]. Además la duración de la LM es fundamental para prevenir la obesidad, una duración mayor a 6 meses confiere una mayor protección contra la adiposidad futura, y cada mes de LM baja de un 6% el riesgo de padecer obesidad [196] y este efecto se mantiene y programa los hábitos alimentarios saludables en adultos jóvenes [197]. El periodo crucial que conllevaría a problemas futuros en el cual la nutrición jugaría un papel fundamental, parece situarse en las primeras semanas de vida [198]. Los posibles mecanismos para el desarrollo de adiposidad durante la ventana de sensibilidad a la influencia de agentes externos, cómo la nutrición, podrían deberse a cambios estructurales permanentes como decremento de la masa de células beta, aceleración de la edad celular (*accelerated cellular aging*), menor longitud telomérica y daño oxidativo, además de los cambios epigenéticos ya descritos [199].

En una revisión reciente realizada por Oddy et al. se apunta que el periodo de más riesgo para el desarrollo futuro de obesidad son los primeros 6 meses de vida post-natal y la recomendación actual es seguir con LM un mínimo de 6 meses. Una dieta enriquecida en proteínas durante este periodo ventana tendría efectos adversos sobre el sistema cardio-metabólico promoviendo una aceleración exagerada del crecimiento con consiguiente riesgo de obesidad de inicio precoz [200] hecho relacionado con la teoría de la programación de origen fetal del SM [201].

Se ha demostrado que los prematuros de bajo peso alimentados con fórmulas enriquecidas en proteínas y micronutrientes y que presentan mayor ganancia de peso en

las primeras dos semanas de vida, tienen mayor grado de resistencia a la insulina en la adolescencia [202]. Una alimentación con alto contenido en proteínas estimularía la producción de insulina e IGF-1 lo que provocaría una aceleración del crecimiento [203]. Singhal et al. realizaron un estudio prospectivo en niños PEG a término alimentados con fórmula estándar o enriquecida que contenía un 28% más de proteínas por lo cual aceleraba el *catch-up* post-natal. Constataron que los niños que habían recibido fórmula estándar, a los 6-8 años de edad, tenían una tensión arterial diastólica y media significativamente inferior a los que habían recibido la fórmula enriquecida en proteínas y esto daba soporte a la hipótesis de los efectos adversos de la sobrealimentación post-natal que implicaría aumento rápido de peso en época temprana de la vida y problemas cardiovasculares posteriores [204]. Los niños PEG que reciben fórmulas hipercalóricas tienen mayor riesgo de realizar un *catch-up* rápido y exagerado, con imposibilidad de almacenar el exceso de lípidos y como consecuencia con más riesgo de lipotoxicidad que los niños AEG. Singhal et al. realizaron un estudio longitudinal de niños a término de más de 37 semanas de gestación y con peso al nacer < p10 a los cuales les asignaban fórmula artificial estándar o enriquecida en proteínas y los comparaban con niños PEG que habían recibido LM. Demostraron que los niños que habían recibido fórmula enriquecida y que habían tenido un crecimiento exagerado en los primeros 9 meses de vida tenían más masa grasa que los alimentados con fórmula estándar o con LM a los 6-8 años de edad [205].

Por estas razones Weber et al. han demostrado recientemente que la alimentación con leche artificial (LA) baja en proteínas reduce el riesgo de obesidad en edad escolar [206] y una revisión sistemática del 2015 apoya que fórmulas artificiales bajas en proteínas determinan un crecimiento adecuado de los lactantes, igual que los niños alimentados con LM, previniendo los riesgos metabólicos futuros [207].

1.10 PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL: ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ADOLESCENCIA Y EN LA EDAD ADULTA

Los niños PEG que realizan un *catch-up* rápido durante los primeros meses de vida, tienen mayor riesgo de presentar disfunción cardiovascular en la edad adulta [208]. Estudios recientes demuestran que los sujetos PEG ya sufren alteraciones cardiovasculares en la vida intrauterina [209]. El mecanismo fisiopatológico consistiría en la adaptación cardiocirculatoria del feto a la hipoxia y malnutrición que llevaría a priorizar la perfusión de los órganos vitales como el cerebro y el corazón como consecuencia de la modulación selectiva de las resistencias vasculares. Esto sería el mecanismo adaptativo que llevaría a la remodelación cardíaca y vascular en fetos PEG [210]. También existe evidencia bioquímica de daño miocárdico subclínico como demuestran los niveles aumentados de péptido natriurético atrial y de troponina en sangre de cordón [211].

El endotelio es el mayor regulador en la homeostasis vascular, mantiene el balance entre vasodilatación y vasoconstricción, inhibición y promoción de la proliferación y migración de las células del músculo liso, prevención y estimulación de la adhesión de plaquetas, trombogénesis y fibrinólisis y juega un papel fundamental en regular el tono vascular y el flujo sanguíneo [212]. En animales de experimentación se ha descrito la presencia de alteraciones vasculares estructurales en los descendientes de madres con restricción calórica como remodelación de la aorta y arteria mesentérica, disminución de la distensibilidad arterial, alteración en la estructura del lecho vascular, disminución de la angiogénesis y aumento de tensión arterial [213]. La malnutrición fetal debida a insuficiencia placentaria altera la función vascular en dos generaciones de ratas, indicando un efecto inter-generacional. Estos efectos son el resultado del *imprinting* genómico y mecanismos epigenéticos que quedan marcados en la siguiente generación [214]. Además recientemente se ha descrito que los microRNAs (miRNAs), pequeños

RNA de cadena simple que no codifican proteínas, pueden estar implicados a través de la regulación génica en mecanismos de apoptosis, crecimiento celular y diferenciación en varios tejidos, cómo angiogénesis, cardiogénesis, nefrogénesis y enfermedades relacionadas. Condiciones de hipoxemia inducen cambios en la expresión de las células endoteliales humanas y en la regulación de las células endoteliales y angiogénicas [215]. Aunque los niños PEG presentan un funcionalismo cardíaco ya alterado al nacer, se ha postulado que el *catch-up* durante los primeros años de vida sería determinante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. Barker et al. describieron las trayectorias del crecimiento en adultos que habían tenido enfermedad coronaria y llegaron a la conclusión que el bajo peso al nacer y el aumento del IMC entre los 2 y 11 años de edad tenía relación directa con la resistencia a la insulina y la enfermedad cardiovascular [216]. Leunissen et al. apuntan que los problemas cardiovasculares se deben a un crecimiento rápido más precoz en los primeros meses de vida postnatal. Encuentran una asociación positiva entre el *catch-up* durante los 3 primeros meses de vida en PEG nacidos con más de 36 semanas de gestación y aumento de grasa abdominal, resistencia a la insulina, aumento de la ratio colesterol total/colesterol HDL y de los niveles de triglicéridos en la adolescencia [217]. Otro estudio reciente encuentra una asociación entre el *catch-up* durante los 3 primeros meses de vida en PEG nacidos a término y aumento de los niveles de triglicéridos, colesterol LDL y presión sistólica ya en la adolescencia [218]. La exposición a la hipoxia durante la vida fetal aumentaría la muerte celular en el corazón fetal llevando a una hipertrofia cardíaca, que en modelos animales resultaría en un alargamiento asimétrico del corazón y en la destrucción del desarrollo de los cardiomiocitos que llevaría el corazón a ser más vulnerable en situaciones en que se requiere aumento de trabajo debido a un crecimiento rápido postnatal [219].

La resistencia a la insulina secundaria a *catch-up* exagerado tiene un papel fundamental en la patogénesis del SM y de la disfunción endotelial conllevando un mayor riesgo cardiovascular en niños PEG [60]. El hiperinsulinismo compensatorio estimularía la proliferación y migración de las células espumosas produciendo disfunción endotelial y por tanto favorecería una condición pro-aterogénica [220].

El grosor de la íntima media carotídea (cIMT) que mide ecográficamente la distancia entre la interfaz en el lumen de la íntima arterial hasta la interfaz media-adventicia detectaría cambios precoces a nivel vascular que llevarían al desarrollo de arterioesclerosis, por lo cual ha sido descrita recientemente cómo un marcador fiable y precoz del riesgo de arteriosclerosis subclínica en adultos asintomáticos [221] y como predictor independiente del riesgo cardiovascular [222]. Estudios recientes han demostrado que la IMT de la aorta abdominal distal (aIMT) es un marcador ecográfico de la arterosclerosis pre-clínica en la infancia, ya que la enfermedad arteriosclerótica se desarrollaría primero en la aIMT que en la cIMT [223,224]. Existe una progresión natural en el tamaño y la estructura de la pared arterial desde la infancia hasta la adolescencia. Estos cambios longitudinales están relacionados con el crecimiento, sexo, edad, índice de masa corporal (IMC) y presión arterial [225].

La precocidad de las lesiones propias del proceso arteriosclerótico se desconoce. Los depósitos de lípidos y el aumento del grosor de la IMT arterial, que son las lesiones iniciales de la arteriosclerosis, están ya presentes en las arterias coronarias de niños en base a resultados de autopsias realizadas [226]. Además estas lesiones precoces se han encontrado en la aorta y en las coronarias de recién nacidos de madres con hipercolesterolemia sugiriendo un papel del ambiente intrauterino en la patogénesis de la arterosclerosis [227]. Los estudios sobre el grosor de la pared arterial en niños son

escasos. La determinación de la cIMT se ha realizado en niños y adolescentes con riesgo para enfermedad vascular encontrándose aumentada en estos pacientes [228].

Estudios realizados sobre la IMT en niños PEG han llevado a resultados contradictorios probablemente por la heterogeneidad de los grupos estudiados, que incluyen también niños prematuros. La aIMT se encuentra ya aumentada en recién nacidos PEG [229,230] y este incremento se mantiene durante la edad pre-escolar [231,232] comparando con niños AEG. Stergiotou et al. encontraron un aumento de la cIMT y de la aIMT en recién nacidos a término PEG comparados con niños AEG independientemente de las alteraciones en las ecografía prenatales [233]. El ambiente intrauterino desfavorable llevaría a un mecanismo adaptativo cardiovascular del feto con consecuente disfunción subclínica cardíaca y vascular, evidente ya entre los 3-6 años de vida [234]. Por el contrario Trevisanuto et al. no encuentran diferencias en la cIMT ni en la aIMT entre niños PEG y AEG entre los 3 y 5 años aunque encuentran una correlación entre los marcadores de inflamación (proteína C-reactiva ultrasensible) en sangre de cordón y presión arterial sistólica a los 5 años en PEG sugiriendo un proceso inflamatorio durante la vida fetal que condicionaría alteración vascular en la primera infancia. Igualmente la población es heterogénea comprendiendo también niños prematuros y definen la condición PEG como peso al nacer < p10 [235]. Todavía no está clara la precocidad de las alteraciones cardiovasculares en niños PEG que llevarían al desarrollo de enfermedad coronaria en la edad adulta.

2. HIPÓTESIS

2.1. Los recién nacidos de bajo peso (PEG) a término de gestaciones no complicadas presentarán al nacer una composición corporal caracterizada por un déficit de tejido adiposo comparados con recién nacidos de peso adecuado para la edad gestacional (AEG), una menor concentración de insulina e IGF-1 en sangre de cordón sugestivos de mayor sensibilidad a la insulina y de un déficit en el número de adipocitos al nacimiento. Este perfil insulino-sensible se relacionará con concentraciones elevadas de folistatina en sangre de cordón. Los mecanismos de adipogénesis estarán alterados en niños PEG, por lo cual los valores de Pref-1 en sangre de cordón se encontrarán elevados, hecho relacionado con la disminución en la diferenciación de los adipocitos en estos pacientes.

2.2. Durante los primeros meses de vida post-natal los niños PEG priorizarán la recuperación de masa magra agravando el déficit de tejido adiposo. Este patrón de composición corporal podría estar influenciado por el tipo de nutrición recibida durante los primeros meses de vida. Los niños PEG que reciban lactancia materna tendrán durante el primer año de vida, una composición corporal más favorable y un perfil endocrino-metabólico caracterizado por una mayor sensibilidad a la insulina, comparados con niños PEG que reciban una fórmula enriquecida en proteínas, que presentarán mayor resistencia a la insulina y disfunción del tejido adiposo.

2.3. Los niños PEG que realicen un *catch-up* rápido durante los primeros meses de vida presentarán un perfil cardiometabólico más desfavorable entre los 3 y los 6 años de edad, caracterizado por niveles circulantes elevados de IGF-1 y bajos de adiponectina-APM, aumento del índice HOMA, aumento de grasa visceral y del contenido de lípidos hepático y aumento del grosor de la íntima-media arterial, marcador precoz del proceso de arteriosclerosis.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Determinar los niveles de IGF-1, adiponectina-APM, folistatina y Pref-1 en sangre de cordón además de la composición corporal [por absorciometría (DXA)] a los 15 días de vida en niños PEG y AEG de gestaciones a término no complicadas.
- 3.2. Estudiar los efectos de la alimentación (lactancia materna vs artificial estándar y artificial enriquecida en proteínas) durante el primer año de vida sobre el perfil endocrino-metabólico (determinado por los valores de insulina, IGF-1 y Adiponectina-APM) y la composición corporal en niños PEG comparados con niños AEG.
- 3.3. Determinar en niños PEG que realizaron *catch-up* recuperador la distribución de grasa abdominal por ecografía, el perfil endocrino-metabólico (valores de IGF-1, insulina y adiponectina-APM) y el grosor de la íntima media arterial (carótida y/o aorta abdominal, por ecografía) a los 3 y 6 años de edad. Determinar en estos niños a los 6 años de edad la grasa visceral y el contenido de lípidos intrahepático mediante resonancia magnética abdominal y compararlos con un grupo control de niños AEG. Determinar cual es la variable que predice el aumento del grosor de la íntima-media arterial entre los 3 y 6 años.

4. RESULTADOS

Los cinco artículos de esta Tesis forman parte de un estudio longitudinal prospectivo realizado en una población de neonatos nacidos entre enero de 2007 y septiembre de 2009, de los cuales el 50% se ha controlado hasta los 2 años y el 30% ha hecho el seguimiento hasta los 6 años. Los estudios se focalizan en periodos críticos de la vida post-natal, como se describirá a continuación.

Los criterios de inclusión fueron:

- 1) Gestación única controlada, a término (37-42 semanas) no complicada (sin diabetes gestacional, pre-eclampsia, alcohol o drogas, excepto tabaquismo).
- 2) AEG definidos como peso al nacer entre -1 y +1 DE.
- 3) PEG definido como peso al nacer menor o igual a -2 DE, pero mayor a 1800g.
- 4) Sangre de cordón disponible y realización de composición corporal a los 15 días de vida.
- 5) Población catalana o española.

Criterios de exclusión:

- 1) malformaciones mayores definidas como aquéllas (defectos anatómicos o anomalías cromosómicas) que causan problemas funcionales o que requieren corrección quirúrgica
- 2) dismorfias: alteraciones estructurales del desarrollo producidas durante la gestación, por causas genéticas o por lesiones durante la vida fetal
- 3) sufrimiento fetal intraparto, necesidad de nutrición parenteral, o ingreso en neonatología.

4.1 Primer Artículo

Circulating follistatin in the human foetus at term birth.

Giorgia Sebastiani, Marta Díaz, Abel López-Bermejo, Ángela Arranz,
Francis de Zegher, Lourdes Ibáñez.

Pediatric Obesity. 2012 Feb; 7(1):39-43.

Impact Factor: 2,276

Circulating follistatin in the human foetus at term birth

G. Sebastiani^{1,2}, M. Díaz^{1,2}, A. López-Bermejo^{3,4}, A. Arranz⁵, F. de Zegher⁶ and L. Ibáñez^{1,2}

¹Endocrinology Unit, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Esplugues, Barcelona, Spain; ²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, ISCIII, Madrid, Spain; ³Department of Pediatrics, Dr Josep Trueta Hospital, Girona, Spain; ⁴Girona Institute for Biomedical Research, Girona, Spain; ⁵Department of Maternal-Fetal Medicine, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Department of Woman & Child, University of Leuven, Leuven, Belgium

Received 18 March 2011; revised 16 July and 28 July 2011; accepted 11 August 2011

What is already known about this subject

- Infants born small-for-gestational-age (SGA) have a lower fat mass and a lower fat-free mass than infants born appropriate-for-gestational age (AGA).
- Follistatin is a glycoprotein that augments adipogenesis.
- Follistatin levels are elevated in short SGA children.

What this study adds

- This is the first study evaluating follistatin concentrations at term birth in AGA and SGA girls and boys.
- Follistatin is detectable in the circulation at term birth.
- The circulating levels of follistatin are higher in SGA than in AGA infants, especially in those SGA infants with a lower fat mass.

Summary

Background: Prenatal weight partitioning is gender specific, and infants born small for gestational age (SGA) have a lower fat mass and a lower fat-free mass than infants born appropriate for gestational age (AGA). Follistatin is an adipokine with adipogenic properties.

Objectives: We examined whether follistatin circulates in the human foetus at term birth and, if so, whether cord blood follistatin relates to birthweight and neonatal body composition.

Methods: The study population was comprised of 248 term newborns (128 girls, 120 boys; 133 AGA, 115 SGA). The main outcome measures used for the study were birthweight, follistatin and insulin in umbilical cord serum, and neonatal body composition by absorptiometry.

Results: Follistatin was detectable in all cord serum samples. Cord follistatin concentrations were similar in girls and boys, being about 25% higher ($P < 0.001$) in SGA than AGA infants. In SGA infants, higher follistatin concentrations related to lower fat mass.

Conclusion: Follistatin is detectable in the circulation of the human foetus at term birth. The circulating levels of follistatin, an adipogenic adipokine, are higher in SGA than AGA infants, particularly so in SGA infants with a lower fat mass.

Keywords: Follistatin, adipogenesis, body composition, birthweight.

Introduction

Prenatal weight gain is gender specific so that body composition is by term birth more adipose in

appropriate for gestational age (AGA) girls than AGA boys (1–3). Newborns born small for gestational age (SGA) are characterized by reductions in both fat mass and fat-free mass, and by lower

Address for correspondence: Lourdes Ibáñez, MD, PhD, Endocrinology Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig de Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: libanez@hsjdbcn.org

© 2011 The Authors

Pediatric Obesity © 2011 International Association for the Study of Obesity. **Pediatric Obesity** 7, 39–43

Statement of financial support: no financial assistance was received in support of the study.

levels of circulating insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) (3).

Follistatin is an extracellular glycoprotein that was originally identified as an inhibitor of pituitary follicle-stimulating hormone release (4). Follistatin is expressed by most human tissues and acts as an antagonistic-binding protein of transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily members, such as activin, myostatin and bone morphogenetic proteins (4–6). Recent evidence suggests that follistatin augments adipogenesis in part by attenuating the inhibitory actions of activin A on pre-adipocyte differentiation (7,8). Mice homozygous for loss-of-function mutations in the follistatin gene have a reduced amount of muscle tissue, suggesting that follistatin also participates in myogenesis (9). Circulating follistatin levels are elevated in short SGA children, who have a low amount of subcutaneous fat and a high sensitivity to insulin (10).

We examined whether follistatin circulates in the human foetus at term birth and, if so, whether cord blood follistatin relates to birthweight and neonatal body composition.

Subjects and Methods

Study population

The study population consisted of 248 newborns (128 girls and 120 boys; Fig. 1) recruited into a study that was initiated in 2007 and that assesses the endocrine-metabolic state and the body composition of AGA and SGA infants across the first postnatal years (3,11).

Inclusion criteria were (i) maternally uncomplicated, singleton pregnancy (no gestational diabetes, no preeclampsia, no alcohol or drug abuse) with delivery at term (37–42 weeks) either at Sant Joan de Déu Hospital or at Hospital Clínic, Barcelona; (ii) birthweight strictly AGA (between ± 1 standard deviation [SD]) or SGA (below -2.0 SD but above 1.8 Kg) (12); (iii) cord blood sample and neonatal body composition available (dependent on logistic restraints, especially at night-time for cord blood); (iv) ethnically Catalan background, allowing for written consent in Catalan language. Exclusion criteria were: dysmorphic features; major congenital malformations; 10-min Apgar score < 7 .

Gestational age was calculated from the last menses, and confirmed by first-trimester ultrasound (~ 10 weeks). Prevalence of birth by caesarean section was 25%.

Endocrine and body-composition results of 20 (out of 133) AGA and 16 (out of 115) SGA newborns were

included in an earlier report (11); no follistatin results have previously been reported.

Assessments

All infants were measured at birth by the same investigator (GS). Length was measured with a standardized length board, the mean of three measurements being used for analysis. Weight was measured to the nearest 10 g with a standard beam balance (Seca, Hamburg, Germany).

Cord blood was collected at birth, before placental separation, for measurement of insulin, IGF-I and follistatin. Blood samples were centrifuged and serum frozen at -80°C until assay.

Neonatal body composition was assessed by dual X-ray absorptiometry (DXA) at the age of 16 ± 0.3 d (mean \pm standard error of the mean) with a Lunar Prodigy, coupled to Lunar software (version 3.4/3.5, Lunar Corp, Madison, WI, USA), adapted for assessment of infants, as described (3,11). The DXA instrument underwent daily quality control and weekly calibration against a water phantom. Total-body and abdominal fat, lean mass and bone mineral content (BMC) were assessed. Coefficients of variation (CVs) were less than 3% for fat and lean mass (3,11).

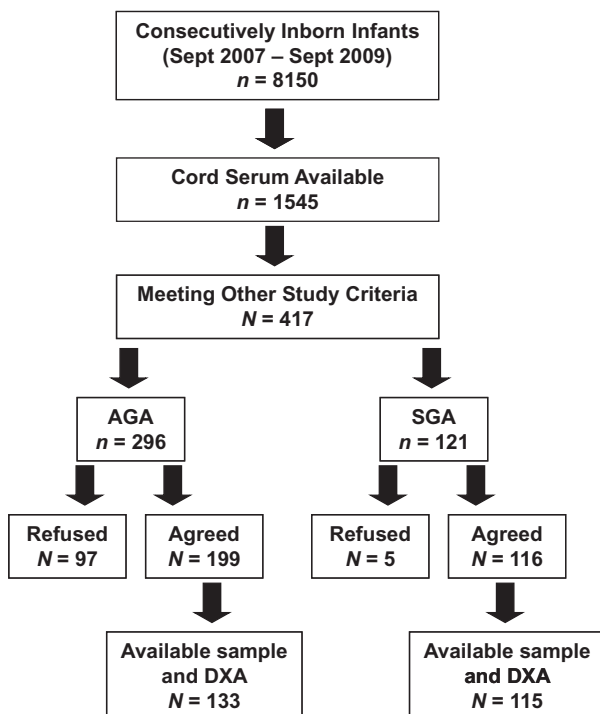


Figure 1 Recruitment of the study population. AGA, appropriate for gestational age; DXA, dual X-ray absorptiometry; SGA, small for gestational age.

Assays

Insulin and IGF-I were measured by immunochemiluminiscence (IMMULITE 2000, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) with detection limits of $0.4 \mu\text{U mL}^{-1}$ for insulin and 25 ng mL^{-1} for IGF-1, and intra- and inter-assay CVs below $<10\%$. Total follistatin was measured from blood collected in non-heparinized vacutainers using an enzyme-linked immunosorbent assay with a detection limit of 0.25 ng mL^{-1} (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and intra- and inter-assay CVs of 2.4% and 8%.

Statistics and ethics

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Girls–boys and AGA–SGA differences were tested by unpaired *t*-test. Linear regression and multiple regression analysis were used to study the association between circulating follistatin

and body composition and biochemical parameters. Skewed data were log-transformed before comparison. $P < 0.05$ was considered significant.

The study was approved by the Institutional Review Board of Barcelona University, Hospital of Sant Joan de Déu; written consent of parents was obtained before enrolment of infants.

Results

Table 1 shows the auxological, endocrine and body-composition results by gender. BMC, fat and lean mass, and circulating insulin and IGF-I were lower in SGA infants, as expected (3).

Follistatin was detectable in all cord serum samples. Cord follistatin concentrations were similar in girls and boys, being higher in SGA than AGA infants (Table 2; results of both genders pooled).

In SGA infants, higher follistatin concentrations related to lower fat mass (Table 3). These associations were independent from gestational age, birth-

Table 1 Auxological, endocrine and body-composition results in AGA and SGA girls and boys

At birth	Girls			Boys		
	AGA (<i>n</i> = 64)	SGA (<i>n</i> = 64)	<i>P</i> -value	AGA (<i>n</i> = 69)	SGA (<i>n</i> = 51)	<i>P</i> -value
Gestational age (week)	39.8 ± 0.2	38.5 ± 0.2	<0.0001	39.6 ± 0.1	38.5 ± 0.2	<0.0001
Birth weight (kg)	3.3 ± 0.05	2.3 ± 0.03	<0.0001	3.4 ± 0.04	2.3 ± 0.03	<0.0001
Birth weight Z-score	0.0 ± 0.1	-2.2 ± 0.1	<0.0001	0.1 ± 0.1	-2.3 ± 0.1	<0.0001
Birth length (cm)	49.4 ± 0.2	45.4 ± 0.3	<0.0001	50.1 ± 0.2	46.0 ± 0.2	<0.0001
Birth length Z-score	-0.2 ± 0.1	-1.8 ± 0.2	<0.0001	0.0 ± 0.1	-1.7 ± 0.1	<0.0001
Insulin (pmol L ⁻¹)	47.3 ± 5	33.7 ± 4.3	<0.05	38.7 ± 3.6	20 ± 2.9	<0.0001
IGF-I (ng mL ⁻¹)	65 ± 4	54 ± 5	<0.05	55 ± 3	35 ± 2	<0.0001
Follistatin (ng mL ⁻¹)	0.40 ± 0.02	0.54 ± 0.03	<0.005	0.43 ± 0.03	0.54 ± 0.04	<0.05
At age 2 weeks						
Bone mineral content (g)	111 ± 2	81 ± 2	<0.0001	111 ± 2	81 ± 2	<0.0001
Fat mass (g)	827 ± 37	477 ± 28	<0.0001	733 ± 30	413 ± 31	<0.0001
Abdominal fat (g)	48 ± 2	28 ± 2	<0.0001	39 ± 2	22 ± 2	<0.0001
Lean mass (g)	2823 ± 52	2356 ± 36	<0.0001	3107 ± 39	2470 ± 49	<0.0001
Fat-to-lean mass ratio	0.30 ± 0.01	0.20 ± 0.01	<0.0001	0.24 ± 0.01	0.17 ± 0.01	<0.0001

Values are mean ± standard error of the mean.

AGA, appropriate for gestational age; SGA, small for gestational age.

Total (<i>n</i> = 248)	AGA (<i>n</i> = 133)	SGA (<i>n</i> = 115)	<i>P</i> -value
Gestational Age (week)	39.7 ± 0.1	38.5 ± 0.1	<0.001
Birthweight Z-score	0.1 ± 0.1	-2.2 ± 0.1	<0.001 (by definition)
Birthlength Z-score	-0.1 ± 0.1	-1.7 ± 0.1	<0.001 (by definition)
Cord follistatin (ng mL ⁻¹)	0.42 ± 0.02	0.54 ± 0.03	<0.001
Cord follistatin (ng mL ⁻¹)*	0.43 ± 0.02	0.52 ± 0.03	<0.01

*Adjusted for difference in gestational age.

Results of both genders are pooled

Values are mean ± standard error of the mean.

AGA, appropriate for gestational age; SGA, small for gestational age.

Table 2 Auxological measurements and circulating follistatin in AGA and SGA newborns

Table 3 Correlations of cord-blood follistatin with selected variables in AGA and SGA girls and boys

At birth	Girls		Boys	
	AGA (n = 64)	SGA (n = 64)	AGA (n = 69)	SGA (n = 51)
Gestational age (week)	-0.087	-0.192	0.064	-0.240
Birth weight Z-score	-0.234	0.149	-0.139	0.155
Insulin (pmol L ⁻¹)	-0.113	-0.255*	-0.062	-0.054
Insulin-like growth factor I (ng mL ⁻¹)	-0.209	-0.212	-0.115	-0.111
At age 2 weeks				
Fat mass (g)	-0.172	-0.315**	-0.082	-0.336**
Lean mass (g)	0.008	-0.102	-0.087	-0.139
Fat-to-lean mass ratio	-0.203	-0.291*	-0.034	-0.334**

P* < 0.05 and *P* < 0.01.

Pearson correlation coefficients are shown.

AGA, appropriate for gestational age; SGA, small for gestational age.

weight and age at assessment of body composition ($\beta = -0.35$, $P < 0.01$; $R^2 = 0.10$, in SGA boys; and $\beta = -0.31$, $P < 0.01$; $R^2 = 0.08$, in SGA girls).

In SGA girls, higher follistatin concentrations also associated to lower cord insulin (Table 3). This association was independent from gestational age, birth-weight and fat mass ($\beta = -0.26$, $P < 0.05$; $R^2 = 0.05$).

In AGA infants, cord follistatin was unrelated to either fat mass or insulin (Table 3).

Discussion

Follistatin was found to be readily detectable in cord serum of infants at term birth. Follistatin concentrations were higher in SGA infants and were in these subjects inversely related to their neonatal fat mass. In SGA girls, cord follistatin was also inversely associated to cord serum insulin. Circulating follistatin levels in prepubertal girls and boys are about fivefold higher than those in foetuses at term birth (10). In pregnant women, circulating follistatin levels are presumably up-regulated by estrogens (13), peak at 38–39 weeks of gestation and are by term delivery more than 10-fold higher than those documented here in foetuses at term birth, indicating that the placenta is a barrier partitioning follistatin between the maternal and foetal compartments (14).

At term birth, cord serum follistatin levels in SGA infants were about 25% higher than in AGA infants, also after correcting for differences in gestational age. The pathophysiological relevance of this observation is currently a matter of conjecture. Both follistatin and follistatin-like 3 (FSL-3, which shares structural and functional homology with follistatin) are thought to influence carbohydrate and lipid homeostasis through inhibition of the autocrine/paracrine effects of activin and myostatin in multiple tissues (5,15–17). For example, follistatin is not only capable of increasing adipogenesis by reversing myostatin's

effect on pre-adipocytes, but is also capable of inducing muscle growth by counteracting myostatin and activin via satellite cell activation in muscles (5,8). SGA newborns have a lower fat mass, a lower lean mass and a lower fat-to-lean mass ratio (3), as confirmed here. The higher follistatin concentrations in SGA newborns may reflect the foetal activation of a homeostatic mechanism that facilitates the postnatal recovery of both lean and fat mass. During the first months of post-natal catch-up growth, SGA infants prioritize the recovery of lean mass over that of fat mass (11). If an early increase in circulating follistatin levels is involved in this recovery process – perhaps along with an early increase in circulating leptin (11) – then follistatin's effects on muscle prevail in this phase over those on adipose tissue. Follow-up of the present cohort will clarify whether higher circulating levels of follistatin in early life associate with greater fat accumulation in later life.

The present study seems to be the first to have evaluated follistatin concentrations at term birth in AGA and SGA girls and boys, along with neonatal body composition. Limitations of our study include the time lag between endocrine and body-composition assessments, and the absence of concomitant measurements of follistatin in the mothers or of other circulating members of the TGF- β superfamily such as activins, myostatin and FSL-3 in the foetuses.

In conclusion, follistatin is detectable in the circulation of the human foetus at term birth. The circulating levels of follistatin, an adipogenic adipokine, are higher in SGA than AGA infants, particularly so in SGA infants with a lower fat mass.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Prof Francesc Botet and Prof Eduard Gratacós for facilitating the recruitment of newborns at the Department of Maternal-Fetal Medicine, Hospital Clínic. This study was supported by the Social Security Research Fund, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (PI08/0443). GS is a Predoctoral Investigator of FIS, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (FI06/00425). LI and MD are Clinical Investigators of CIBERDEM CB07/08/0044 (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain). ALB is an Investigator of the Fund for Scientific Research I3 (Ministry of Science and Innovation, Spain). FdZ is an Investigator of the Clinical Research Fund, Leuven University Hospital, Belgium.

References

1. Hammami M, Koo WW, Hockman EM. Body composition of neonates from fan beam dual energy X-ray absorptiometry measurement. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27: 423–426.
2. Shields BM, Knight B, Hopper H, 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: 2661–2666.
3. Ibáñez L, Sebastiani G, Diaz M, López-Bermejo A, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin and IGF-I at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2774–2778.
4. Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35 000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8282–8286.
5. Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E157–E164.
6. Gajos-Michniewicz A, Piastowska AW, Russell JA, Ochedalski T. Follistatin as a potent regulator of bone metabolism. *Biomarkers* 2010; 15: 563–574.
7. Kawabata N, Kamiya N, Suzuki N, Matsumoto M, Takagi M. Changes in extracellular activin A: follistatin ratio during differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 into osteoblasts and adipocytes. *Life Sci* 2007; 81: 8–18.
8. Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, et al. Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3003–3009.
9. Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, et al. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1998–2008.
10. Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Jaramillo A, Marín S, de Zegher F. Growth hormone therapy in short children born small-for-gestational-age: effects on abdominal fat partitioning and on circulating follistatin and high-molecular-weight adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2234–2239.
11. Ibáñez L, Sebastiani G, Diaz M, Gómez-Roig MD, López-Bermejo A, de Zegher F. Low body adiposity and high leptinemia in breast-fed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr* 2010; 156: 145–147.
12. Ferrández-Longás A, Mayayo E, Labarta JI, et al. Estudio longitudinal de crecimiento y desarrollo. Centro Andrea Prader. Zaragoza 1980–2002. In: ERGON (ed.). *Patrones de crecimiento y desarrollo en España*. Atlas de gráficas y tablas: Madrid, Spain, 2004, 61–115.
13. Ibáñez L, Díaz M, López-Bermejo A, de Zegher F. Divergent effects of ethinyl-estradiol-drospirenone and flutamide-metformin on follistatin in adolescents and women with hyperinsulinemic androgen excess. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27: 197–198.
14. O'Connor AE, McFarlane JR, Hayward S, Yokkaichiya T, Groome NP, de Kretser DM. Serum activin A and follistatin concentrations during human pregnancy: a cross-sectional and longitudinal study. *Hum Reprod* 1999; 14: 827–832.
15. 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: 3586–3597.
16. Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A. 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: 1348–1353.
17. Szabat M, Johnson JD, Piret JM. Reciprocal modulation of adult beta cell maturity by activin and follistatin. *Diabetologia* 2010; 53: 1680–1689.

Objetivo

Determinar los niveles de folistatina en sangre de cordón de fetos a término AEG y PEG y estudiar su relación con el peso al nacer y la composición corporal neonatal.

Sujetos y Métodos

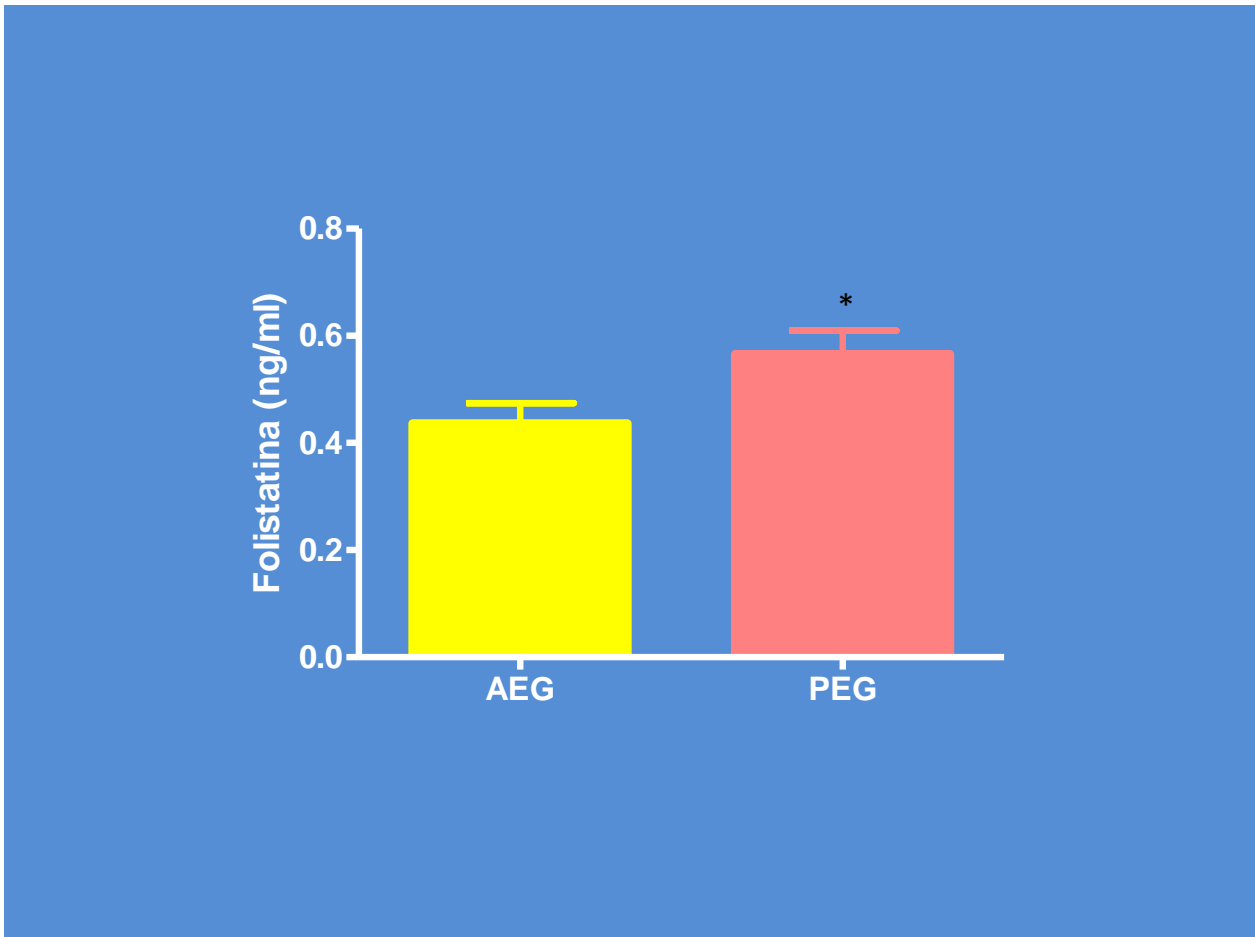
La población estudiada comprende 133 AEG (69 niños, 64 niñas) y 115 PEG (51 niños, 64 niñas) nacidos entre septiembre 2007 y septiembre 2009, de los cuales se recogió sangre de cordón para determinar las concentraciones de IGF-1, insulina y folistatina. A los 15 días se realizó densitometría (DXA), para determinar el contenido mineral óseo (CMO), la proporción de grasa total y abdominal y la proporción de masa magra.

Resultados:

- 1) El CMO, la masa magra y la masa grasa ($p < 0.0001$), la insulina circulante y los niveles de IGF-1 ($p < 0.05$ en niñas y $p < 0.0001$ en niños) fueron más bajos en los PEG.
- 2) La folistatina fue detectable en sangre de cordón, y sus concentraciones fueron similares en ambos sexos siendo sus niveles más elevados en PEG comparados con recién nacidos AEG ($p < 0.01$).
- 3) En el grupo PEG los niveles elevados de folistatina se relacionaron con menor masa grasa y esta asociación fue independiente de la edad gestacional, del peso al nacer, y de la edad de realización de la DXA ($\beta = -0.35$; $p < 0.01$; $R^2 = 0.10$, en niños; $\beta = -0.31$, $p < 0.01$; $R^2 = 0.08$, en niñas).
- 4) En niñas PEG las concentraciones elevadas de folistatina se asociaron también a niveles bajos de insulina; estas asociaciones fueron independientes de la edad gestacional, del peso al nacer y de la masa grasa ($\beta = -0.26$; $p < 0.05$; $R^2 = 0.05$).

5) En recién nacidos AEG las concentraciones de folistatina en sangre de cordón no se relacionaron con la masa grasa o la insulina.

Fig. 16 Valores de folistatina en sangre de cordón: AEG vs PEG.



AEG: adecuado para la edad gestacional; PEG: pequeño para la edad gestacional

*p<0.01 vs AEG

4.2 Segundo artículo

Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life.

Francis de Zegher, Marta Díaz, Giorgia Sebastiani, Ana Martín-Ancel,
David Sánchez-Infantes, Abel López-Bermejo, Lourdes Ibáñez.

Diabetes Care. 2012 Apr; 35(4):848-9.

Impact Factor: 7,735.

Abundance of Circulating Preadipocyte Factor 1 in Early Life

FRANCIS DE ZEGHER, PHD¹
MARTA DÍAZ, PHD^{2,3}
GIORGIA SEBASTIANI, MD^{2,3}
ANA MARTIN-ANCEL, MD⁴

DAVID SÁNCHEZ-INFANTES, PHD^{2,3}
ABEL LÓPEZ-BERMEJO, PHD⁵
LOURDES IBÁÑEZ, PHD^{2,3}

OBJECTIVE—Soluble preadipocyte factor 1 (Pref-1) inhibits adipocyte differentiation. We tested whether circulating levels of soluble Pref-1 are higher in smaller fetuses.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—We performed longitudinal assessments of circulating Pref-1 in infants born appropriate for gestational age (AGA) or small for gestational age (SGA) and also in late-gestational women and in newborns on days 2 and 3.

RESULTS—At birth, Pref-1 levels were ~100-fold higher than in adults, being in SGA fetuses ~50% higher than in AGA fetuses. By age 4 months, Pref-1 had reached near-adult levels and the original AGA versus SGA difference had disappeared. Pref-1 levels were low in late-gestational women and were still elevated in newborns.

CONCLUSIONS—Pref-1 is abundantly present in the fetus, is higher in SGA than in AGA fetuses, and is likely to be of fetal origin. We speculate that Pref-1 in early life contributes to variation in postnatal adipocyte numbers, in the subsequent expandability of adipose tissue, and thus in the susceptibility to diabetes in later life.

Diabetes Care 35:848–849, 2012

The number of subcutaneous adipocytes wherein fat can be stored during adulthood is essentially determined in two windows of adipogenesis, namely, fetal life and puberty (1,2). For example, in monozygotic twins discordant for growth before birth, the smaller twin continues to have a lower number of subcutaneous adipocytes after birth (3). It is still poorly understood how a transient restraint of fetal growth can be linked to a persistent lowering of adipocyte number. We propounded that one of the potential links is a downregulation of adipogenesis in a critical window of growth restraint before birth. In a first test of this concept, we studied at birth whether circulating preadipocyte factor 1 (Pref-1) is higher in smaller fetuses. Pref-1 is a transmembrane protein that is encoded by an imprinted (paternally expressed) gene on chromosome 14q32 and that contains an extracellular domain with epidermal growth factor-like

repeats; juxtamembrane cleavage generates a soluble 50-kDa form, which is the Pref-1 form that inhibits adipocyte differentiation by upregulating Sox9 in preadipocytes (4,5). Thus far, the circulating levels of Pref-1 have not been studied in human fetuses, newborns, infants, or pregnant women.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Pref-1 was measured longitudinally (at birth and at 4 months) in serum from 72 infants (42 born appropriate for gestational age [AGA] [19 girls and 23 boys] and 30 born small for gestational age [SGA] [16 girls and 14 boys]) who had been recruited into a study that was initiated in 2007 and that assesses longitudinally the endocrine-metabolic state and the body composition of SGA infants compared with breastfed AGA control subjects across the first postnatal years (6,7). For the present substudy focusing on Pref-1, specific

inclusion criteria were as follows: 1) birth at Hospital Sant Joan de Déu after an uncomplicated, term (38–40 weeks), and singleton pregnancy (no maternal hypertension and no gestational diabetes); 2) birth weight between 3.0 and 3.8 kg for AGA control subjects (birth weight range between -1 and $+1$ SD), and birth weight <2.6 kg for SGA infants (below -2 SD); 3) cord serum available to measure Pref-1; and 4) written informed consent in the Catalan language. Specific exclusion criteria were complications at birth (need for resuscitation or for parenteral nutrition), congenital malformations, or an extremely low birth weight (below -3.0 SD).

Gestational age was calculated according to the last menses and confirmed by first-trimester ultrasound. The prevalence of delivery by caesarean section was 12%. A total of 17 mothers smoked during pregnancy; they delivered 7 AGA and 10 SGA infants.

Pref-1 was also measured in 11 healthy AGA newborns (mean birth weight 3.3 kg) sampled on postnatal day 2 or 3 (mean age 44 h [range 30–57]) and from 18 women in late gestation (mean 35 weeks [32–38]) who subsequently delivered healthy infants (mean birth weight 3.3 kg [2.7–4.0]) after uncomplicated singleton pregnancies (mean duration 39 weeks [37–41]).

Body weight was measured at birth with a beam balance (Seca, Hamburg, Germany). Blood from the longitudinally studied infants was sampled at birth (from the umbilical cord before placental separation) and in the prefeeding state at age 4 months. All samples were centrifuged and frozen at -80°C until analysis. Body composition was assessed by absorptiometry at age 2 weeks (mean \pm SEM 17 ± 1 days) with a Lunar Prodigy, coupled to Lunar software (version 3.4/3.5; Lunar, Madison, WI) adapted for infants (6,7). Soluble 50-kDa Pref-1 was assessed by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) (intra- and inter-assay coefficients of variation 3.6 and 6.2%, respectively; detection limit $0.01 \mu\text{g/L}$).

Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL). Results are expressed as means \pm SEM. Comparisons between groups were performed by *t* test. Skewed data were log transformed prior to comparison. $P < 0.05$ was considered significant.

From the ¹Department of Woman and Child, University of Leuven, Leuven, Belgium; the ²Endocrinology Unit, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; the ⁴Department of Neonatology, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and the ⁵Department of Pediatrics, Girona Institute for Biomedical Research, Dr. Josep Trueta Hospital, Girona, Spain.

Corresponding author: Lourdes Ibáñez, libanez@hsjdbcn.org.
Received 12 October 2011 and accepted 19 December 2011.

DOI: 10.2337/dc11-1990

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Table 1—Results from AGA versus SGA infants

	AGA	SGA*	P**
N (% female)	42 (45)	30 (53)	
At birth			
Weight (kg)	3.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	(<0.0001)
Weight Z score	0.0 ± 0.1	-2.2 ± 0.1	(<0.0001)
Pref-1 (μg/L)	19 ± 1	27 ± 3	0.004
Lean plus fat plus bone (kg)#	4.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1	<0.0001
Lean mass (kg)#	3.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1	<0.0001
Fat mass (kg)#	0.88 ± 0.04	0.53 ± 0.05	<0.0001
Bone mineral content (kg)#	0.11 ± 0.00	0.09 ± 0.00	<0.0001
At age 4 months			
Pref-1 (μg/L)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	NS
Lean plus fat plus bone (kg)	7.5 ± 0.2	6.6 ± 0.2	0.003
Lean mass (kg)	4.3 ± 0.1	4.0 ± 0.1	NS
Fat mass (kg)	3.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.001
Bone mineral content (kg)	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.002

Data are means ± SEM unless otherwise indicated. **P values are for comparisons between AGA and SGA infants and are adjusted for sex and maternal smoking. #Absorptiometry was performed at age 2 weeks. *All results were comparable in breastfed (N = 16) and formula-fed (N = 14) SGA infants. All AGA control subjects were breastfed (see RESEARCH DESIGN AND METHODS).

All assessments were approved by the institutional review board of Barcelona University Hospital. Written (parental) consent was an inclusion criterion.

RESULTS—Pref-1 levels in late-gestational women were 0.7 ± 0.1 μg/L (range 0.02–1.6), which were comparable with those reported in nonpregnant women (8). Circulating Pref-1 was readily detectable in all infants. Pref-1 levels were comparable in girls and boys, and the results of both sexes were therefore pooled (Table 1).

At birth, Pref-1 levels ranged from 6 to 100 μg/L and were thus one to two orders of magnitude higher than in the maternal circulation. Pref-1 levels were ~50% higher in SGA than in AGA fetuses. By age 4 months, Pref-1 concentrations had reached a near-adult level and the original AGA versus SGA difference in Pref-1 levels had disappeared. No close associations were observed between Pref-1 concentrations and body composition either at birth or at age 4 months. On day 2 or 3, serum concentrations of Pref-1 in AGA newborns were still 14 ± 2 μg/L (range 8–26), suggesting that prenatal Pref-1 has a fetal rather than a placental or maternal origin.

CONCLUSIONS—In the first months after birth, SGA infants prioritize the recovery of lean mass to that of fat mass and of bone mineral content. Soluble Pref-1 is thought to reduce adipogenesis as well as bone formation by inhibiting the differentiation of multipotent mesenchymal cells into adipocytes, chondrocytes, and

osteoblasts (5,9,10). Here, we show that Pref-1 is abundantly present in the circulation of the human fetus and that SGA fetuses have higher Pref-1 levels than do AGA control subjects.

Growth restraint in early life is a major risk factor for diabetes in later life (11,12). Our finding that fetal growth restraint is associated with markedly high Pref-1 levels suggests that Pref-1 may be among the mediators of a reduced adipocyte differentiation in growth-restrained fetuses, and thus of a reduction in their life-long lipid-storage capacity and also of their adult vulnerability to metabolic disease, once lipid storage becomes an issue.

In conclusion, Pref-1 is abundantly present in the circulation of the human fetus and is likely to be of fetal rather than maternal or placental origin. Circulating Pref-1 levels are higher in SGA than in AGA fetuses.

Acknowledgments—This study was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (PI08/0443). F.d.Z. is a clinical investigator supported by the Clinical Research Council of the Leuven University Hospitals and by the University of Leuven (OT-04-35). G.S. is a predoctoral investigator of Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (FI06/00425). A.L.-B. is a clinical investigator of the I3 Fund for Scientific Research (Ministry of Science and Innovation, Madrid, Spain).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

F.d.Z. wrote the manuscript. M.D. researched data and reviewed and edited the manuscript.

G.S. researched data and contributed to discussion. A.M.-A. and D.S.-I. researched data. A.L.-B. and L.I. contributed to discussion and reviewed and edited the manuscript. L.I. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors thank Luis del Río, MD, and Silvana di Gregorio, MD, from Centro Médico CETIR, Barcelona, Spain, for performing the absorptiometry measurements.

References

- Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 1979;63:239–246
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783–787
- Ginsberg-Fellner F. Growth of adipose tissue in infants, children and adolescents: variations in growth disorders. *Int J Obes* 1981;5:605–611
- Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993;73:725–734
- Wang Y, Sul HS. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* 2009;9:287–302
- López-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, et al. The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1501–1505
- Ibáñez L, Sebastiani G, López-Bermejo A, Diaz M, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2774–2778
- Aronis KN, Kilim H, Chamberland JP, Breggia A, Rosen C, Mantzoros CS. Pre-adipocyte factor-1 levels are higher in women with hypothalamic amenorrhea and are associated with bone mineral content and bone mineral density through a mechanism independent of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1634–E1639
- Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr* 2006;136:2953–2956
- Lee K, Villena JA, Moon YS, et al. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 2003;111:453–461
- Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2010;10:306–315
- Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA* 2008;300:2886–2897

Objetivo

Determinar los niveles de Pref-1 en sangre de cordón y a los 4 meses en niños a término AEG y PEG y su relación con la composición corporal. Medir además los niveles de Pref-1 en el periodo post-natal y en sangre materno al final de la gestación.

Sujetos y Métodos

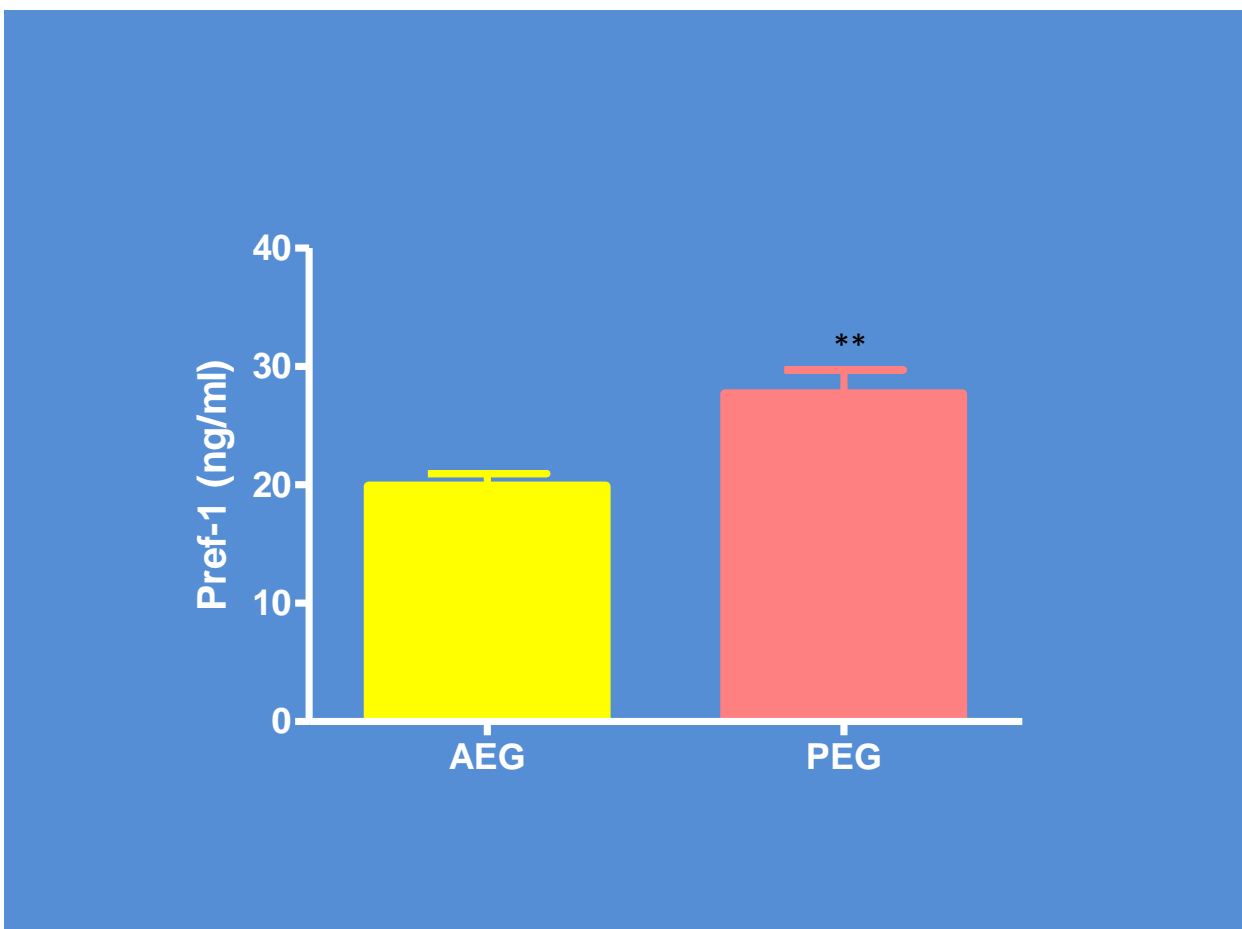
Se trata de un estudio longitudinal (0-4 meses) en recién nacidos AEG y PEG. La población estudiada comprende 42 AEG (19 niñas, 23 niños) y 30 PEG (16 niñas, 14 niños), de los cuales se recogió sangre de cordón y muestra de sangre a los 4 meses para determinar los niveles Pref-1. A los 15 días y a los 4 meses se realizó DXA, para establecer el CMO, la proporción de masa grasa total y abdominal y la proporción de masa magra. También se determinó Pref-1 en 11 recién nacidos AEG sanos a los 2-3 días de vida y en 18 madres al final de la gestación que tuvieron recién nacidos sanos y embarazos no complicados.

Resultados

- 1) Los niveles de Pref-1 en las madres al final de la gestación fueron $0,7 \pm 0,1$ mcg/L (rango 0,02-1,6) comparables con los niveles descritos en mujeres no embarazadas.
- 2) Pref-1 se detectó en todos los pacientes siendo los niveles iguales en niños y niñas por lo cual se analizaron los valores agrupados de ambos sexos.
- 3) Al nacer los valores de Pref-1 se encontraron en rango de 6-100 mcg/L siendo mucho más altos que en la circulación materna.
- 4) Al nacer los valores de Pref-1 fueron un 50% más altos en recién nacidos PEG que en AEG ($p= 0.004$).

- 5) Al nacer los niños PEG presentaron menos masa grasa, menos masa magra y menor CMO ($p < 0.0001$).
- 6) A los 4 meses los niveles de Pref-1 alcanzaron los valores descritos en adultos sin diferencias entre AEG y PEG.
- 7) No se encontró relación entre los valores de Pref-1 y la composición corporal ni a los 15 días ni los 4 meses.
- 8) A los 2-3 días los valores de Pref-1 en niños AEG fueron 14 ± 2 mcg/L (rango 8-26) sugiriendo que los niveles de Pref-1 tienen un origen fetal más que un origen placentario.

Fig. 17 Valores de Pref-1 en sangre de cordón: AEG vs PEG.



AEG: adecuado para la edad gestacional; PEG, pequeño para la edad gestacional

** $p=0.004$ vs AEG

4.3 Tercer artículo

Body composition and circulating high-molecular-weight adiponectin and IGF-1 in infants born small for gestational age: breast- versus formula-feeding.

Francis de Zegher, Giorgia Sebastiani, Marta Díaz, David Sánchez-Infantes,
Abel Lopez-Bermejo, Lourdes Ibáñez.

Diabetes. 2012 Aug; 61(8):1969-73.

Impact Factor: 7,895.

Body Composition and Circulating High-Molecular-Weight Adiponectin and IGF-I in Infants Born Small for Gestational Age

Breast- Versus Formula-Feeding

Francis de Zegher,¹ Giorgia Sebastiani,^{2,3} Marta Diaz,^{2,3} David Sánchez-Infantes,^{2,3} Abel Lopez-Bermejo,^{4,5} and Lourdes Ibáñez^{2,3}

Prenatal growth restraint, if followed by postnatal overweight, confers risk for adult disease including diabetes. The mechanisms whereby neonatal nutrition may modulate such risk are poorly understood. We studied the effects of nutrition (breast-feeding [BRF] vs. formula-feeding [FOF]) on weight partitioning and endocrine state (as judged by high-molecular-weight [HMW] adiponectin and IGF-I) of infants born small for gestational age (SGA). Body composition (by absorptiometry), HMW adiponectin, and IGF-I were assessed at birth and 4 months in BRF infants born appropriate for gestational age (AGA; $n = 72$) and SGA infants receiving BRF ($n = 46$) or FOF ($n = 56$), the latter being randomized to receive a standard (FOF1) or protein-rich formula (FOF2). Compared with AGA-BRF infants, the catchup growth of SGA infants was confined to lean mass, independently of nutrition. Compared with AGA-BRF infants, SGA-BRF infants had normal HMW adiponectin and IGF-I levels at 4 months, whereas SGA-FOF infants had elevated levels of HMW adiponectin (particularly SGA-FOF1) and IGF-I (particularly SGA-FOF2). In conclusion, neonatal nutrition seems to influence endocrinology more readily than body composition of SGA infants. Follow-up will disclose whether the endocrine abnormalities in SGA-FOF infants can serve as early markers of an unfavorable metabolic course and whether they may contribute to design early interventions that prevent subsequent disease, including diabetes. *Diabetes* 61:1969–1973, 2012

Yearly, millions of human infants are born small for gestational age (SGA), and these infants are at higher risk for later diseases such as diabetes and hypertension (1), particularly if their weight gain is excessive in early infancy (2,3) and if they receive protein-enriched formula-feeding (FOF) instead of breast-feeding (BRF) (4–6). The mechanisms underpinning this risk are poorly understood, but evidence starts to indicate that fetal-neonatal anomalies in adipogenesis and circulating adipokines and hormones are among the contributors (7–9).

From the ¹Department of Pediatrics, University of Leuven, Leuven, Belgium; the ²Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; the ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; the ⁴Department of Pediatrics, Dr. Josep Trueta Hospital, Girona, Spain; and the ⁵Girona Institute for Biomedical Research, Girona, Spain.

Corresponding author: Lourdes Ibáñez, libanez@hsjdbcn.org.

Received 20 December 2011 and accepted 9 March 2012.

DOI: 10.2337/db11-1797

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db11-1797/-/DC1>.

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

In 2005 to 2006, we designed a study that aimed to yield evidence that could point toward mechanisms whereby nutrition in early infancy may modulate the long-term course of SGA children. Between birth and 4 months, we studied how SGA-BRF and SGA-FOF infants distribute their weight gain as compared with BRF controls born appropriate for gestational age (AGA). SGA-FOF infants were randomized to receive a standard formula or a protein-enriched formula that is still recommended for low-birth-weight infants. In parallel, we assessed circulating IGF-I, a prime endocrine marker for which levels are known to be lower in AGA infants receiving BRF than in those receiving FOF (10–12). Finally, we measured the circulating levels of high-molecular-weight (HMW) adiponectin, an adipokine that is abundantly present in the fetus (13,14) and is a sensitive marker of SGA-related features from early childhood onwards (15–17).

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Study population. The study cohort consists of 174 infants (88 girls and 86 boys) recruited (Fig. 1) into a longitudinal study that assesses the body composition and endocrine-metabolic state of SGA infants, as compared with AGA-BRF controls, in the first years after birth (9,13,18). The present substudy focused on weight partitioning and circulating HMW adiponectin and IGF-I between birth and age 4 months. Accordingly, the specific inclusion criteria were

- Birth at Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, after an uncomplicated, term (37–42 weeks), singleton pregnancy (no maternal hypertension, gestational diabetes, alcohol abuse, or drug addiction)
- Birth weight between 2.9 and 3.9 kg for AGA and between 1.9 and 2.6 kg for SGA infants
- Exclusive breastfeeding for 4 months in AGA controls; either exclusive breastfeeding for 4 months or exclusive feeding with the randomly assigned formula in SGA infants (see below)
- Body composition assessment at ages 2 weeks and 4 months
- Enough cord serum available (at birth) and enough serum available in pre-feeding state (at age 4 months) to enable measurement of circulating HMW adiponectin and IGF-I (there were logistic restraints, mainly for nighttime collection of cord blood; see Step 1 in Fig. 1)
- Written, informed consent in Spanish/Catalan language (as expected, the parental consent rate was higher for SGA than for AGA infants; see Step 2 in Fig. 1)

Exclusion criteria were complications at birth (need for resuscitation or for parenteral nutrition) and congenital malformations.

The fraction of infants with complete follow-up was higher in the SGA than in the AGA subpopulation (68 vs. 26%; see Step 3 in Fig. 1). No differences were detected in the baseline features of infants who completed versus those who did not complete the 4-month follow-up (data not shown).

Mothers of SGA infants were recommended to give BRF, but a substantial fraction preferred nevertheless to give FOF. Among the 102 SGA infants with complete follow-up, 46 infants were exclusively BRF, and 56 were exclusively FOF (see Step 4 in Fig. 1).

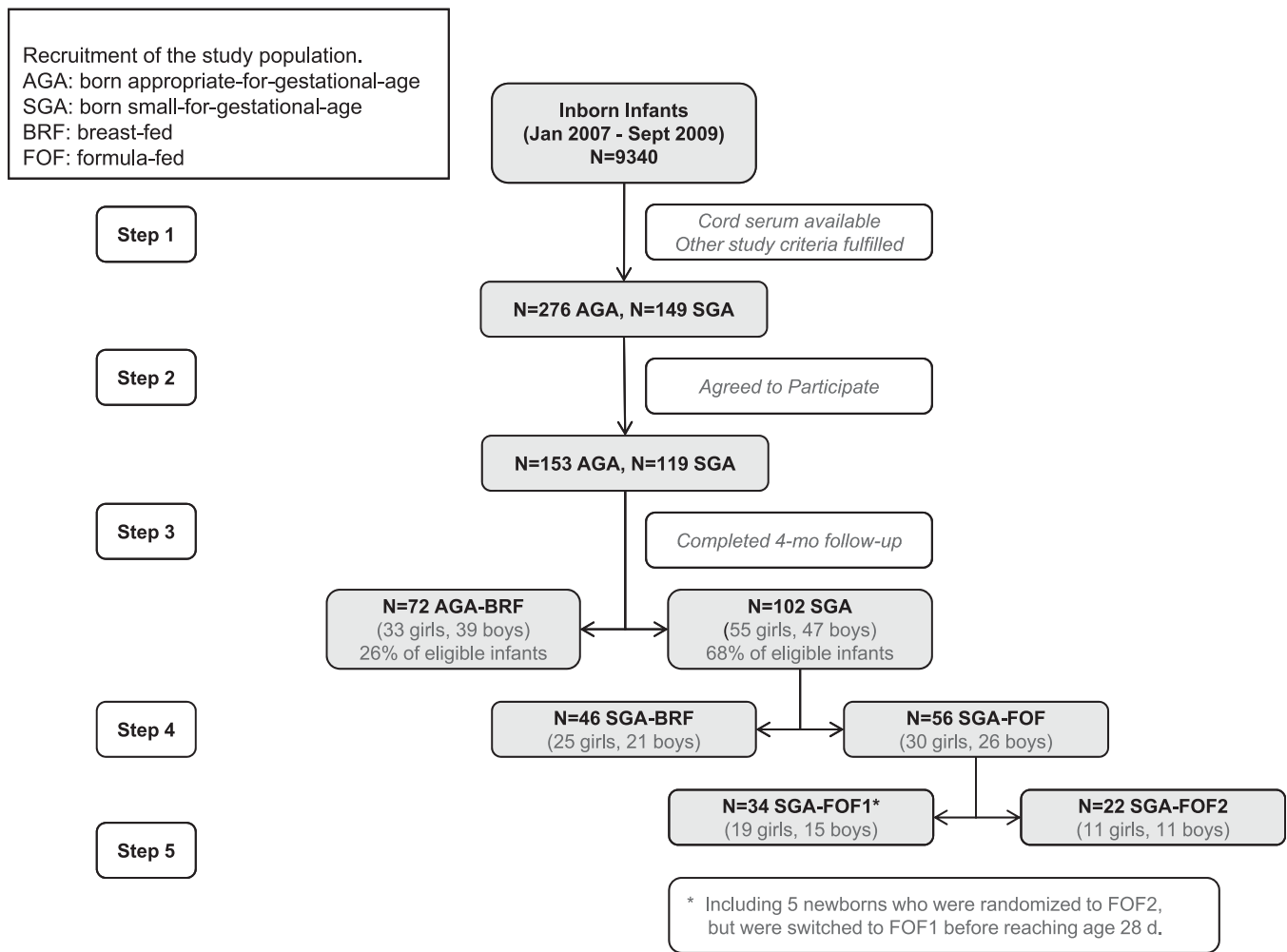


FIG. 1. Recruitment of the study population.

Shortly after birth, SGA-FOF infants were randomly assigned (1:1) to receive either FOF1 (Enfalac 1; Mead Johnson) or FOF2 (Enfalac Premature for premature and low-birth-weight infants; Mead Johnson). The milk concentration was 12.9%, and the recommended volume was 150 mL/kg/day. FOF2 contains less fat and more protein than human milk; FOF1 has an intermediate composition and is rich in energy (Supplementary Table 1). Five newborns (two girls and three boys), who were originally randomized to receive FOF2, did not seem to tolerate this formula well and were switched to FOF1 prior to age 28 days (see Step 5 in Fig. 1); their results were pooled with those of FOF1 infants.

Gestational age was calculated according to the last menses and confirmed by first-trimester ultrasound (~10 weeks). The delivery rate by caesarean section was 22%. A total of 39 mothers reported smoking during pregnancy; they delivered 9 AGA and 30 SGA infants. Endocrine and body-composition results from 21 out of 72 AGA-BRF infants and 18 out of 46 SGA-BRF infants were part of earlier reports (9,18); no results from the 56 SGA-FOF infants have hitherto been reported.

Assessments. Weight and length were measured by the same investigator (G.S.) at birth and 4 months (132 ± 1 day [mean ± SEM]). Weight was measured with a beam balance (Seca, Hamburg, Germany) and length with a length board, the mean of three measurements being used for analysis.

Body composition was assessed by absorptiometry at ages 2 weeks and 4 months with a Lunar Prodigy, coupled to Lunar software (version 3.4/3.5; Lunar Corp, Madison, WI), adapted for assessment of infants (9,13). All body-composition studies were performed during spontaneous sleep prior to feeding. Body fat, lean mass, and bone mineral content (BMC) were assessed. Coefficients of variation (CVs) were <3% for fat and lean mass (9,13).

Circulating levels of HMW adiponectin and IGF-I were measured in cord serum and prefeeding/morning serum samples obtained at age 4 months. HMW adiponectin was assessed with an ELISA kit (Linco Research, St. Charles, MO) with intra- and interassay CVs <9%. IGF-I was measured by immunochemiluminiscence (IMMULITE 2000; Diagnostic Products,

Los Angeles, CA), the detection limit being 25 ng/mL; intra- and interassay CVs were <10%.

Statistics. Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Skewed data were log-transformed before comparison. General linear models for repeated measurements were used to detect differences in baseline and 4-month data and in 4-month increments between groups.

The study had 80% power to detect a difference of 0.6 SD between SGA-BRF and SGA-FOF infants for the major variables in the study (fat and lean mass, IGF-I, and HMW adiponectin). The detectable difference was 0.8 SD for comparisons of the same variables between SGA-FOF1 and SGA-FOF2.

A *P* value <0.05 was considered significant for nominal associations. A Bonferroni correction by a factor of 10 (product of five independent outcomes and two independent groups) is recommended to account for multiple comparisons of major variables, so that only conventional *P* values <0.005 yield Bonferroni-corrected *P* values <0.05.

The study was approved by the Institutional Review Board of Barcelona University, Hospital of Sant Joan de Déu; informed written consent was an inclusion criterion.

RESULTS

Body composition. SGA infants receiving FOF1 or FOF2 developed similar gains of weight, length, lean mass, fat mass, and BMC (Table 1), and their results were therefore pooled into an SGA-FOF group. In turn, SGA-FOF and SGA-BRF infants developed similar gains of weight, length, lean mass, fat mass, and BMC (Table 2 shows data at 2 weeks and 4 months; Table 3, right, shows the gains), and their results were also pooled into a total SGA group. Compared with

TABLE 2
Results in infants born either AGA or SGA

	At age 2 weeks*					At age 4 months†				
	AGA	SGA	<i>P</i> value‡	SGA-BRF§	SGA-FOF§	AGA	SGA	<i>P</i> value‡	SGA-BRF	SGA-FOF
<i>n</i>	72	102		46	56	72	102		46	56
Weight (kg)	3.9 (3.0-4.0)	2.9 (2.8-3.0)	<0.0001	2.9 (2.8-3.1)	2.9 (2.8-3.0)	7.2 (7.0-7.4)	6.4 (6.2-6.5)	<0.0001	6.3 (6.1-6.6)	6.4 (6.2-6.6)
Weight Z-score	0.0 (-0.1 to 0.2)	-2.2 (-2.3 to -2.1)	<0.0001	-2.2 (-2.4 to -2.2)	-2.1 (-2.3 to -2.0)	0.5 (0.3-0.8)	-1.2 (-1.4 to -1.0)	<0.0001	-1.2 (-1.5 to -1.0)	-1.1 (-1.4 to -0.9)
Length (cm)	51 (51-52)	47 (47-48)	<0.0001	47 (47-48)	47 (47-48)	63 (63-64)	60 (60-61)	<0.0001	60 (60-61)	60 (60-61)
Length Z-score	-0.1 (-0.2 to 0.1)	-1.7 (-1.9 to -1.6)	<0.0001	-1.7 (-1.9 to -1.5)	-1.8 (-1.9 to -1.6)	0.1 (-0.1 to 0.4)	-0.8 (-1.0 to -0.6)	<0.0001	-0.9 (-1.1 to -0.6)	-0.8 (-1.0 to -0.5)
BMC (kg)	0.11 (0.11-0.12)	0.08 (0.07-0.08)	<0.0001	0.08 (0.08-0.09)	0.08 (0.07-0.08)	0.19 (0.18-0.21)	0.17 (0.17-0.18)	<0.0001	0.17 (0.16-0.17)	0.18 (0.17-0.19) ^a
Fat mass (kg)	0.79 (0.73-0.85)	0.43 (0.39-0.47)	<0.0001	0.46 (0.41-0.53)	0.40 (0.35-0.45)	2.8 (2.7-3.0)	2.3 (2.2-2.4)	<0.0001	2.3 (2.2-2.5)	2.3 (2.2-2.4)
Lean mass (kg)	3.0 (2.9-3.1)	2.4 (2.3-2.5)	<0.0001	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	4.2 (4.0-4.3)	3.9 (3.8-4.0)	0.003	3.8 (3.7-4.0)	3.9 (3.8-4.1)
IGF-I (ng/mL)	55 (49-62)	46 (40-52)	0.04	48 (37-60)	44 (38-50)	51 (45-56)	69 (61-76)	<0.0001	54 (46-61)	81 (69-93) ^b
HMW adiponectin (µg/mL)	33 (30-36)	26 (23-29)	0.001	27 (23-32)	25 (21-28)	27 (25-30)	34 (31-37)	0.001	29 (26-33)	38 (34-43) ^c

Data are mean (95% CI) unless otherwise indicated. All AGA infants were BRF, whereas SGA infants were either BRF or FOF. Differences remaining significant after Bonferroni correction are those with a *P* value <0.005 (see STATISTICS). *Age: AGA, 16 ± 1 day; SGA, 17 ± 1 day. †Age: AGA, 129 ± 1 day; SGA, 128 ± 1 day. ‡*P* values for comparisons between AGA and SGA infants. §No significant differences between SGA-BRF and SGA-FOF at age 2 weeks. ||At birth instead of at age 2 weeks. ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.001, and ^c*P* < 0.005 vs. SGA-BRF at age 4 months.

TABLE 1
Results in infants born SGA and receiving FOF1 or FOF2

	At age 2 weeks			At age 4 months			0- to 4-month change		
	FOF1	FOF2	<i>P</i> value	FOF1	FOF2	<i>P</i> value	FOF1	FOF2	<i>P</i> value
<i>n</i>	31	25		31	25		31	25	
Weight (kg)	2.9 (2.7-3.1)	2.8 (2.8-3.0)	ns	6.4 (6.1-6.6)	6.4 (6.1-6.7)	ns	3.5 (3.2-3.7)	3.5 (3.2-3.8)	ns
Length (cm)	47 (46-48)	47 (47-48)	ns	60 (59-61)	61 (60-62)	ns	15 (14-16)	15 (14-16)	ns
BMC (kg)	0.08 (0.07-0.08)	0.08 (0.07-0.09)	ns	0.18 (0.17-0.19)	0.18 (0.16-0.20)	ns	0.10 (0.09-0.12)	0.10 (0.09-0.11)	ns
Fat mass (kg)	0.39 (0.32-0.46)	0.41 (0.35-0.48)	ns	2.3 (2.1-2.4)	2.3 (2.2-2.5)	ns	1.9 (1.7-2.0)	1.9 (1.8-2.0)	ns
Lean mass (kg)	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	ns	3.9 (3.7-4.2)	3.9 (3.7-4.2)	ns	1.5 (1.2-1.8)	1.5 (1.3-1.8)	ns
IGF-I (ng/mL)*	44 (35-52)	44 (37-52)	ns	71 (63-79)	94 (70-119)	<0.05	27 (18-37)	50 (26-74)	<0.05
HMW adiponectin (µg/mL)*	23 (18-28)	27 (21-33)	ns	42 (36-48)	33 (27-39)	<0.05	20 (12-27)	6 (-1 to 14)	<0.05

Data are mean (95% CI) unless otherwise indicated. For formula composition, see Supplementary Table 1. None of the differences in this table remained significant after Bonferroni correction (see STATISTICS). *Values at birth instead of at age 2 weeks.

TABLE 3
Changes (0–4 months) in weight, length, and body composition in infants born either AGA or SGA

	0- to 4-month change				
	AGA	SGA	<i>P</i> value*	SGA-BRF†	SGA-FOF†
<i>n</i>	72	102		46	56
Δ Weight (kg)	3.3 (3.1–3.5)	3.4 (3.3–3.6)	ns	3.4 (3.2–3.6)	3.5 (3.3–3.7)
Δ Length (cm)	13 (13–14)	15 (14–15)	<0.0005	14 (14–15)	15 (14–16)
Δ BMC (kg)	0.09 (0.08–0.10)	0.09 (0.09–0.10)	ns	0.09 (0.08–0.09)	0.10 (0.09–0.11)
Δ Fat mass (kg)	2.0 (1.9–2.2)	1.9 (1.8–2.0)	<0.05	1.9 (1.7–2.0)	1.9 (1.8–2.0)
Δ Lean mass (kg)	1.2 (1.1–1.3)	1.5 (1.4–1.6)	<0.0005	1.5 (1.3–1.6)	1.5 (1.3–1.7)
Δ Fat mass – Δ Lean mass (kg)	0.9 (0.7–1.0)	0.4 (0.2–0.6)	<0.0001	0.4 (0.2–0.7)	0.4 (0.1–0.6)

Data are mean (95% CI) unless otherwise indicated. All AGA infants were BRF, whereas SGA were either BRF or FOF. Differences remaining significant after Bonferroni correction are those with a *P* value <0.005 (see STATISTICS). Δ, change. **P* values for comparisons between AGA and pooled SGA infants (adjusted for sex). †No significant differences between BRF-SGA and FOF-SGA.

AGA controls, the SGA infants caught up in length but confined their weight catchup to lean mass, thereby aggravating their low adiposity versus AGA controls (Table 3, left). All of the differences between AGA and SGA infants were independent of sex, gestational age, and maternal smoking.

HMW adiponectin and IGF-I. In cord serum, the levels of HMW adiponectin and IGF-I were lower in SGA than AGA infants (Table 2). At 4 months, circulating HMW adiponectin and IGF-I seemed to be influenced by nutrition, the levels in SGA-FOF being higher than in SGA-BRF infants (Table 2); in addition, HMW adiponectin levels were higher in SGA-FOF1 than in -FOF2 infants, whereas IGF-I levels were higher in SGA-FOF2 than in -FOF1 infants (Table 1 and Fig. 2, left). Accordingly, the longitudinal dynamics of HMW adiponectin and IGF-I differed markedly among the study subgroups (Fig. 2, right); these differences were independent of sex, gestational age, and maternal smoking.

Correlation analyses. Across the study population (but not within SGA subgroups), 4-month changes in HMW adiponectin and IGF-I associated to each other ($r = 0.316$; $P < 0.0001$), and both predicted percent lean mass at 4 months ($r = 0.231$; $P < 0.001$ and $r = 0.223$; $P < 0.005$, respectively).

DISCUSSION

In the first months after birth, SGA infants prioritize the recovery of lean mass above that of fat mass, thereby further lowering their body-fat fraction relative to AGA controls. This prioritization does not appear to be readily influenced by nutrition in early infancy. In contrast, circulating HMW adiponectin and IGF-I seem sensitive to nutritional influences in SGA infants, because FOF was associated with higher HMW adiponectin and IGF-I levels than BRF, and protein enrichment of FOF had opposite effects on HMW adiponectin and IGF-I levels. Therefore,

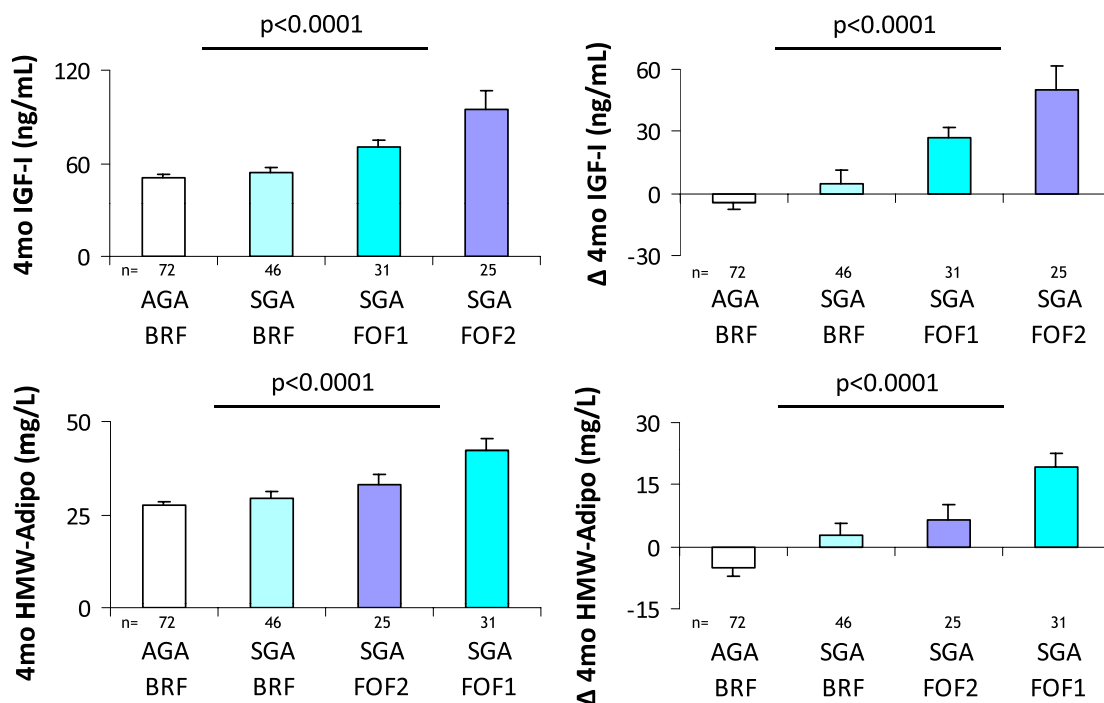


FIG. 2. Results of circulating IGF-I and HMW adiponectin at age 4 months (left) and changes thereof between birth and age 4 months (right) in BRF infants born AGA and in infants born SGA who were either BRF or FOF with FOF1 or FOF2. Mean and SEM are shown. *P* values are from general lineal models.

the swift recovery of lean mass in SGA infants is unlikely to be mediated by circulating HMW adiponectin or IGF-I.

In the first 4 months after birth, AGA and SGA infants gain more fat than lean mass, and both groups thus increase their body fat fraction. However, the surplus in fat increment is more than twice higher in AGA than in SGA infants (Table 3, bottom row). If it is correct that less energy is required to gain 1 kg of lean mass than to gain 1 kg of fat mass (19), then SGA infants need fewer calories than AGA infants to gain the same amount of body weight. One of the implications of this reasoning is that there may be no strict need to give a calorie-enriched formula to SGA infants.

At age 4 months, the circulating levels of HMW adiponectin and IGF-I in SGA-BRF infants compared with those in AGA-BRF controls, but they were elevated in SGA-FOF infants, with the highest levels of HMW adiponectin and IGF-I being observed, respectively, in SGA-FOF1 and SGA-FOF2 infants. Our longitudinal results of HMW adiponectin confirm that the circulating levels of this adipokine are essentially stable in AGA-BRF infants (20), and they seem to be the first indication that HMW adiponectinemia may rise markedly in SGA-FOF infants. Our IGF-I results align well with the reports that AGA-FOF infants have higher IGF-I levels than AGA-BRF infants, particularly when receiving protein-enriched FOF (10–12).

The weaknesses of our study include that neither visceral fat nor hepatic lipid content was assessed; the strengths include the presence of two parallel and longitudinal control groups for SGA-FOF infants, namely the AGA-BRF (golden standard) and SGA-BRF infants.

In conclusion, SGA infants receiving protein-enriched FOF are known to be at higher risk for later cardiovascular and metabolic disease (4–6) and are in this study shown to have elevated serum concentrations of HMW adiponectin and IGF-I in early infancy. Breastfeeding is known to attenuate the risk of SGA infants for subsequent disease (4–6) and is shown to be accompanied by normal serum concentrations of HMW adiponectin and IGF-I in SGA infants. Follow-up will disclose whether endocrine anomalies in SGA-FOF infants can serve as early markers of an unfavorable metabolic course and whether they may thus contribute to design fetal-neonatal interventions that prevent adult disease. Such interventions would be of particular relevance for public health in countries like India, where the sequence from fetal growth restraint to adult diabetes is highly prevalent.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (PI08/0443). F.d.Z. is a Clinical Investigator supported by the Clinical Research Council of the University Hospital Leuven. G.S., M.D., D.S.-I., and L.I. are Clinical Investigators of Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. A.L.-B. is an Investigator of the I3 Fund for Scientific Research (Ministry of Education and Science, Spain).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

F.d.Z. contributed to study design, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. G.S., M.D., and D.S.-I. researched data. A.L.-B. contributed to study design

and discussion and reviewed/edited the manuscript. L.I. contributed to study design, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. L.I. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

REFERENCES

- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62–67
- Leunissen RW, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken-Koelega A. Timing and tempo of first-year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood. *JAMA* 2009;301:2234–2242
- Fabricius-Bjerre S, Jensen RB, Færch K, et al. Impact of birth weight and early infant weight gain on insulin resistance and associated cardiovascular risk factors in adolescence. *PLoS ONE* 2011;6:e20595
- Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, et al. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? *Circulation* 2007;115:213–220
- Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, et al. Nutrition in infancy and long-term risk of obesity: evidence from 2 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1133–1144
- Vaag A. Low birth weight and early weight gain in the metabolic syndrome: consequences for infant nutrition. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;104(Suppl. 1): S32–S34
- Ginsberg-Fellner F. Growth of adipose tissue in infants, children and adolescents: variations in growth disorders. *Int J Obes* 1981;5:605–611
- Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005;146:4211–4216
- Ibáñez L, Sebastiani G, Diaz M, Gómez-Roig MD, Lopez-Bermejo A, de Zegher F. Low body adiposity and high leptinemia in breast-fed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr* 2010;156:145–147
- Chellakooty M, Juul A, Boisen KA, et al. A prospective study of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in 942 healthy infants: associations with birth weight, gender, growth velocity, and breastfeeding. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:820–826
- Ong KK, Langkamp M, Ranke MB, et al. Insulin-like growth factor I concentrations in infancy predict differential gains in body length and adiposity: the Cambridge Baby Growth Study. *Am J Clin Nutr* 2009;90: 156–161
- Socha P, Grote V, Gruszfeld D, et al.; European Childhood Obesity Trial Study Group. Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2011;94(Suppl):1776S–1784S
- Ibáñez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2774–2778
- Pinar H, Basu S, Hotmire K, et al. High molecular mass multimer complexes and vascular expression contribute to high adiponectin in the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2885–2890
- Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Angulo M, Sebastiani G, de Zegher F. High-molecular-weight adiponectin in children born small- or appropriate-for-gestational-age. *J Pediatr* 2009;155:740–742
- Ibáñez L, López-Bermejo A, Diaz M, Marcos MV, Casano P, de Zegher F. Abdominal fat partitioning and high-molecular-weight adiponectin in short children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94: 1049–1052
- Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, de Zegher F. Catch-up growth in girls born small for gestational age precedes childhood progression to high adiposity. *Fertil Steril* 2011;96:220–223
- Sebastiani G, Diaz M, López-Bermejo A, Arranz A, de Zegher F, Ibáñez L. Circulating follistatin in the human fetus at term birth. *Int J Pediatr Ob* 2012;7:39–43
- Pencharz PB. Protein and energy requirements for 'optimal' catch-up growth. *Eur J Clin Nutr* 2010;64(Suppl. 1):S5–S7
- Hibino S, Itabashi K, Nakano Y, Inoue M, Tanaka D, Maruyama T. Longitudinal changes in high molecular weight serum adiponectin levels in healthy infants. *Pediatr Res* 2009;65:363–366

Objetivo

Estudiar la influencia de la alimentación sobre la composición corporal y los parámetros endocrino-metabólicos (IGF-1 y adiponectina-APM) entre los 0 y 4 meses en una población de niños PEG de los cuales los que no recibieron LM fueron aleatorizados para recibir LA estándar o LA hipercalórica y compararlos con un grupo de niños AEG alimentados con LM.

Sujetos y Métodos

Estudio longitudinal en niños AEG y PEG realizado entre los 0 y 4 meses. La población estudiada comprende 72 AEG (33 niñas, 39 niños) y 102 PEG (55 niñas, 47 niños). Todos los AEG recibieron lactancia materna (LM) exclusiva. De los PEG 46 (25 niñas, 21 niños) recibieron LM exclusiva durante 4 meses y los que recibieron LA por decisión de la familia se aleatorizaron en dos grupos: un grupo de 34 PEG (19 niñas, 15 niños) que recibió LA estándar (LA1) y otro grupo de 22 PEG (11 niñas, 11 niños) que recibió LA enriquecida en proteínas (LA2). La concentración de LA fue 12,9% y el volumen recomendado para ambas fórmulas fue 150ml/kg/día. Se recogieron sangre de cordón y muestra de sangre a los 4 meses para determinar los niveles insulina, IGF-1 y adiponectina-APM. A los 15 días y a los 4 meses se realizó DXA, para establecer el CMO, la proporción de grasa total y abdominal y la proporción de masa magra.

Resultados

- 1) Los niños PEG presentaron en sangre de cordón concentraciones más bajas de adiponectina-APM ($p= 0.001$) e IGF-1 ($p= 0.04$) comparados con los AEG.
- 2) A los 15 días los niños PEG presentaron menos masa grasa, magra y menor CMO que los AEG ($p<0.0001$).

- 3) Los niños PEG que recibieron LA1 y LA2 a los 4 meses ganaron el mismo peso, longitud, masa magra, masa grasa y CMO que niños PEG que recibieron LM.
- 4) Comparados con los AEG, los PEG a los 4 meses ganaron más masa magra agravando su déficit de masa grasa ($p < 0.0005$). Todas estas diferencias fueron independientes del sexo, edad gestacional y tabaquismo materno.
- 5) A los 4 meses los PEG alimentados con LA, presentaron valores elevados de IGF-1 ($p < 0.001$) y adiponectina-APM ($p < 0.005$) con respecto a los PEG alimentados con LM. Además, los niveles de adiponectina-APM eran más altos en los PEG que recibieron LA1 ($p < 0.05$) y los niveles de IGF-1 eran más altos en PEG que recibieron LA2 ($p < 0.05$).
- 6) En el análisis de correlación en el conjunto de la población estudiada los cambios 0-4 meses de los valores de adiponectina-APM e IGF-1 se correlacionan entre ellos ($r = 0.316$; $p < 0.0001$); y ambos predicen el porcentaje de masa magra a los 4 meses ($r = 0.231$; $p < 0.001$ y $r = 0.223$; $p < 0.005$, respectivamente).

Tablas 2-3. Valores de composición corporal y parámetros endocrino-metabólicos entre 0-4 meses en AEG alimentados con LM, PEG alimentados con LM, LA1 o LA2

	2 semanas			4 meses			Δ 0-4 meses		
	LA1	LA2	p	LA1	LA2	p	LA1	LA2	p
N	31	25		31	25		31	25	
Peso (Kg)	2.9 (2.7 3.1)	2.8 (2.8 3.0)	ns	6.4 (6.1 6.6)	6.4 (6.1 6.7)	ns	3.5 (3.2 3.7)	3.5 (3.2 3.8)	ns
Longitud (cm)	47(46 48)	47(47 48)	ns	60 (59 61)	61 (60 62)	ns	15 (14 16)	15 (14 16)	ns
CMO (kg)	0.08 (0.07 0.08)	0.08 (0.07 0.09)	ns	0.18 (0.17 0.19)	0.18 (0.16 0.20)	ns	0.10 (0.09 0.12)	0.10 (0.09 0.11)	ns
Masa grasa (kg)	0.39 (0.32 0.46)	0.41 (0.35 0.48)	ns	2.3 (2.1 2.4)	2.3 (2.2 2.5)	ns	1.9 (1.7 2.0)	1.9 (1.8 2.0)	ns
Masa magra (kg)	2.4 (2.3 2.5)	2.4 (2.3 2.5)	ns	3.9 (3.7 4.2)	3.9 (3.7 4.2)	ns	1.5 (1.2 1.8)	1.5 (1.3 1.8)	ns
IGF-1 (ng/ml)*	44 (35 52)	44 (37 52)	ns	71 (63 79)	94 (70 119)	<0.05	27 (18 37)	50 (26 74)	<0.05
Adiponectina_APM (mg/L)*	23 (18 28)	27 (21 33)	ns	42 (36 48)	33 (27 39)	<0.05	20 (12 27)	6 (-1 14)	<0.05

	15 días					4 meses				
	AEG	PEG	p	PEG-LM ^a	PEG-LA ^a	AEG	PEG	p	PEG-LM ^a	PEG-LA ^a
N	72	102		46	56	72	102		46	56
Peso (Kg)	3.9 (3.0 4.0)	2.9 (2.8 3.0)	<0.0001	2.9 (2.8 3.1)	2.9 (2.8 3.0)	7.2 (7.0 7.4)	6.4 (6.2 6.5)	<0.0001	6.3 (6.1 6.6)	6.4 (6.2 6.6)
Peso Z-score*	0.0 (-0.1 0.2)	-2.2 (-2.3 2.1)	<0.0001	-2.2 (-2.4 -2.2)	-2.1 (-2.3 2.0)	0.5 (0.3 0.8)	-1.2 (-1.4 -1.0)	<0.0001	-1.2 (-1.5 -1.0)	-1.1 (-1.4 -0.9)
Longitud (cm)	51 (51 52)	47 (47 48)	<0.0001	47 (47 48)	47 (47 48)	63 (63 64)	60 (60 61)	<0.0001	60 (60 61)	60 (60 61)
Longitud Z-score*	-0.1 (-0.2 0.1)	-1.7 (-1.9 -1.6)	<0.0001	-1.7 (-1.9 -1.5)	-1.8 (-1.9 -1.6)	0.1 (-0.1 0.4)	-0.8 (-1.0 -0.6)	<0.0001	-0.9 (-1.1 -0.6)	-0.8 (-1.0 -0.5)
CMO (kg)	0.11 (0.11 0.12)	0.08 (0.07 0.08)	<0.0001	0.08 (0.08 0.09)	0.08 (0.07 0.08)	0.19 (0.18 0.21)	0.17 (0.17 0.18)	<0.0001	0.17 (0.16 0.17)	0.18 (0.17 0.19) ^b
Masa grasa (kg)	0.79 (0.73 0.85)	0.43 (0.39 0.47)	<0.0001	0.46 (0.41 0.53)	0.40 (0.35 0.45)	2.8 (2.7 3.0)	2.3 (2.2 2.4)	<0.0001	2.3 (2.2 2.5)	2.3 (2.2 2.4)
Masa magra (kg)	3.0 (2.9 3.1)	2.4 (2.3 2.5)	<0.0001	2.4 (2.3 2.5)	2.4 (2.3 2.5)	4.2 (4.0 4.3)	3.9 (3.8 4.0)	<0.003	3.8 (3.7 4.0)	3.9 (3.8 4.1)
IGF-1 (ng/ml)*	55 (49 62)	46 (40 52)	0.04	44 (38 50)	44 (38 50)	51 (45 56)	69 (61 76)	<0.0001	54 (46 61)	81 (69 93) ^c
Adiponectina_APM (mg/L)*	33 (30 36)	26 (23 29)	0.001	27 (23 32)	25 (21 28)	27 (25 30)	34 (31 37)	0.001	29 (26 33)	38 (34 43) ^d

*al nacer; ^a no diferencias significativas entre PEG con LM y PEG con LA

^b p<0.05, ^c p<0.001, ^d p<0.005 vs PEG con LM a los 4 meses

Fig. 18 Valores de IGF-1 a los 4 meses. AEG con LM vs PEG con LM, LA1 o LA2

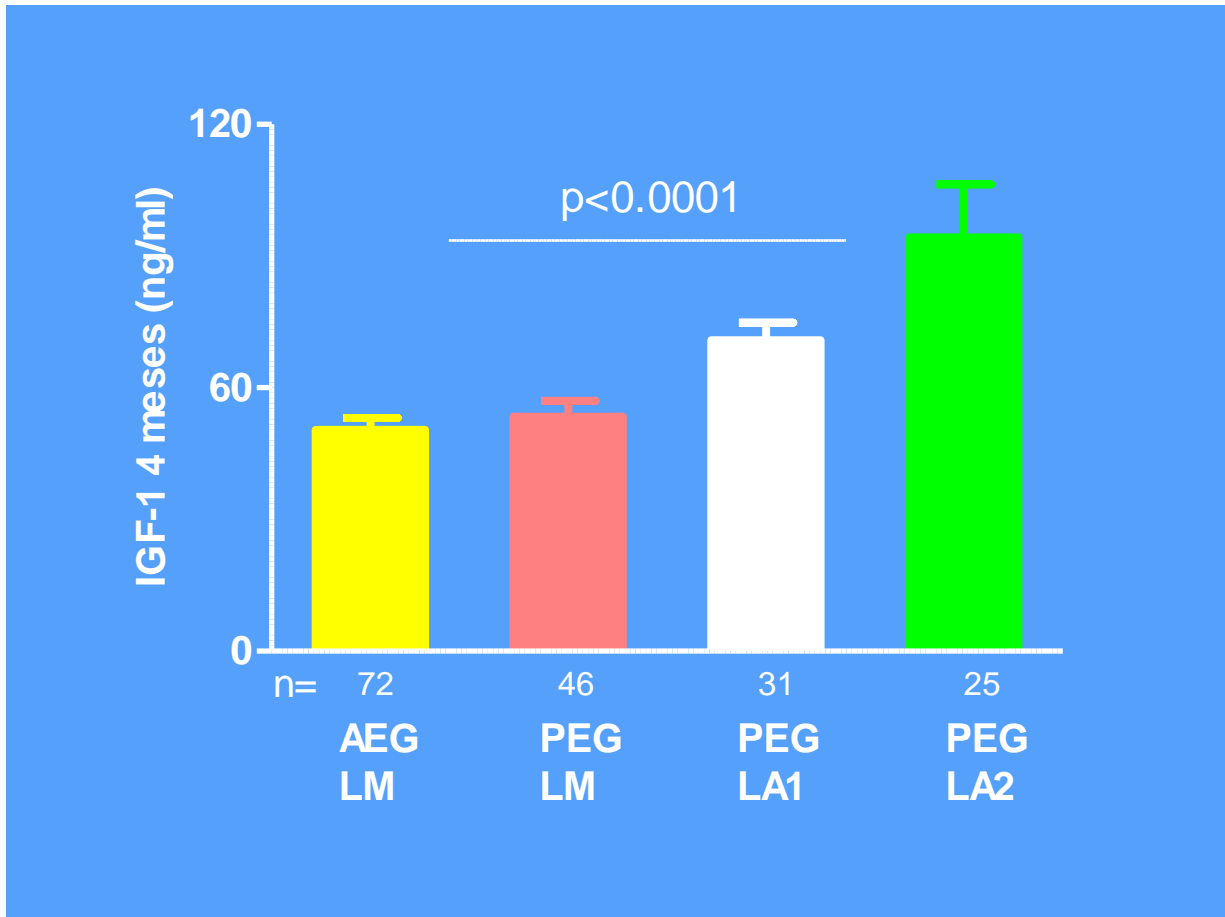


Fig. 19 Valores de Adiponectina-APM a los 4 meses. AEG con LM vs PEG con LM, LA1 o LA2

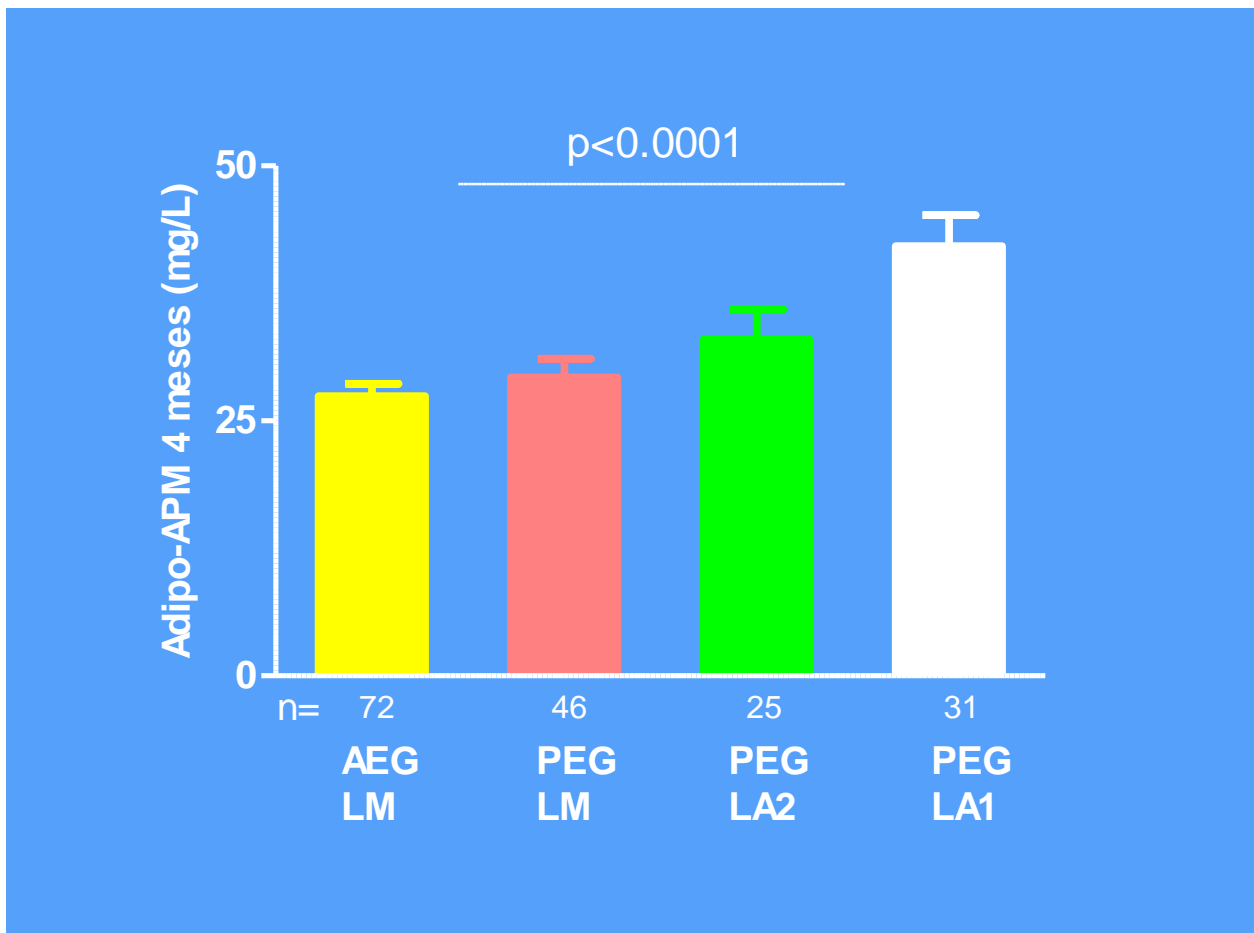


Fig. 20 Cambios de los valores de IGF-1 entre 0 y 4 meses. AEG con LM vs PEG con LM, LA1 o LA2

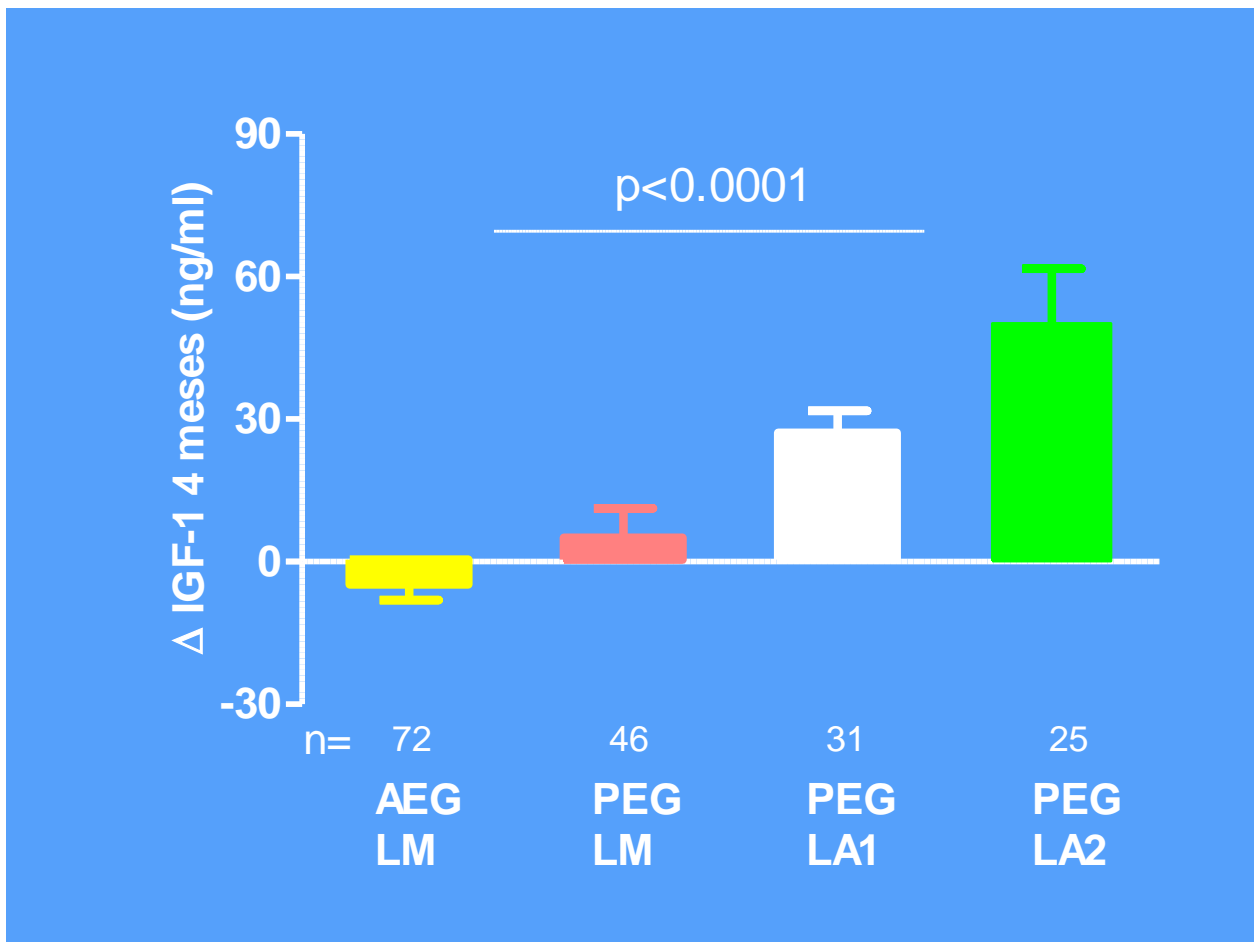
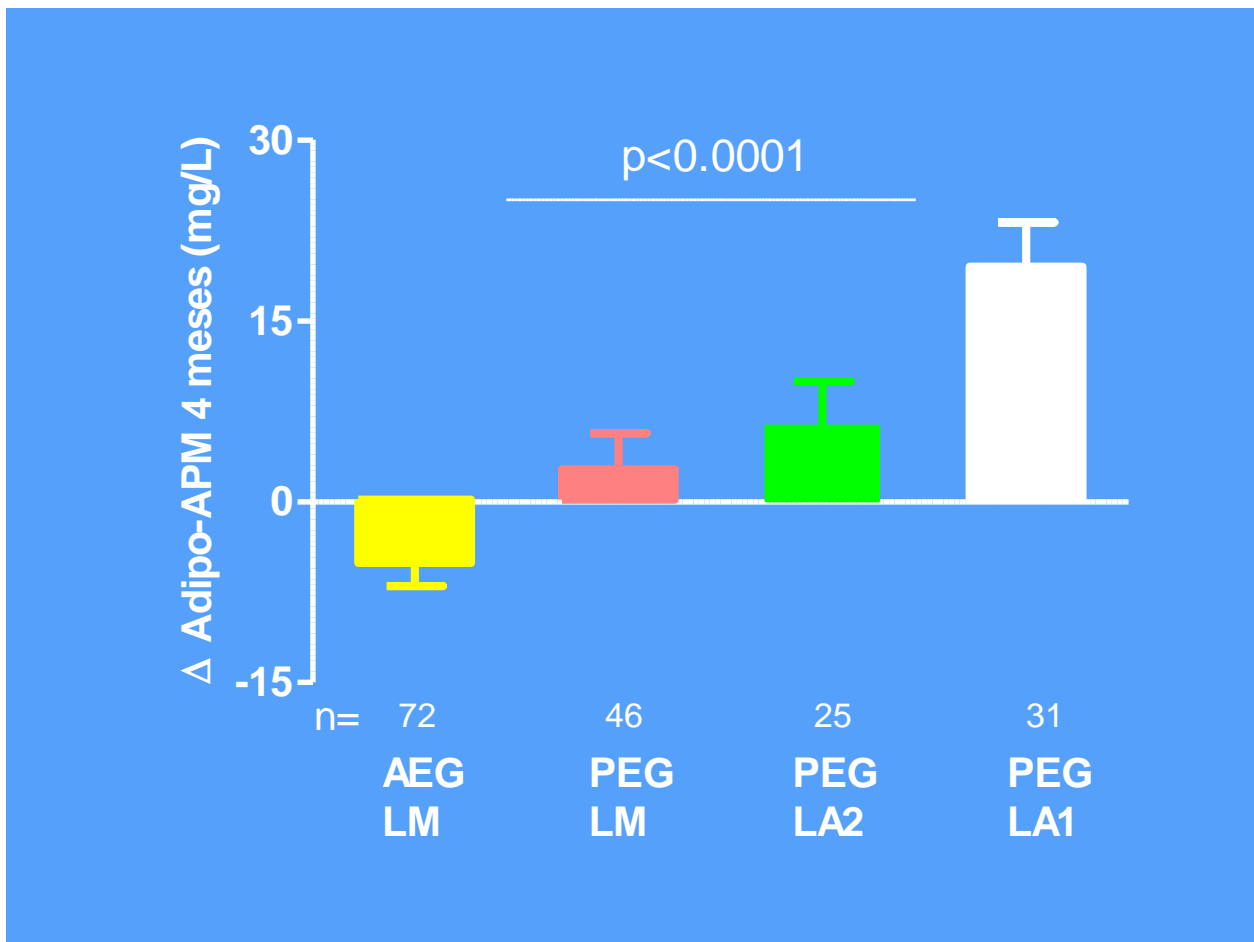


Fig. 21 Cambios de los valores de Adiponectina-APM entre 0 y 4 meses. AEG con LM vs PEG con LM, LA1 o LA2



4.4 Cuarto artículo

**Breast-feeding vs formula-feeding for infants born small-for-gestational-age:
divergent effects on fat mass and on circulating IGF-1 and high-molecular-weight
adiponectin in late infancy.**

Francis de Zegher, Giorgia Sebastiani, Marta Díaz, Maria Dolores Gómez-Roig,
Abel López-Bermejo A, Lourdes Ibáñez.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2013 Mar; 98(3):1242-7.

Impact Factor: 6,430.

Breast-feeding vs Formula-feeding for Infants Born Small-for-Gestational-Age: Divergent Effects on Fat Mass and on Circulating IGF-I and High-Molecular-Weight Adiponectin in Late Infancy

Francis de Zegher, Giorgia Sebastiani, Marta Diaz, María Dolores Gómez-Roig, Abel López-Bermejo, and Lourdes Ibáñez

Department of Reproduction, Development, and Regeneration (F.d.Z.), University of Leuven, 3000 Leuven, Belgium; Hospital Sant Joan de Déu (G.S., M.D., M.D.G.-R., L.I.), University of Barcelona, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) (G.S., M.D.), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; and Department of Pediatrics (A.L.-B.), Dr Josep Trueta Hospital, 17007 Girona, and Girona Institute for Biomedical Research, 17007 Girona, Spain

Context: Fetal growth restraint, if followed by rapid weight gain, confers risk for adult disease including diabetes. How breast-feeding may lower such risk is poorly understood.

Objective, Study Participants, Intervention, Outcomes: In infants born small-for-gestational-age (SGA), we studied the effects of nutrition in early infancy (breast-feeding vs formula-feeding; BRF vs FOF) on weight partitioning and endocrine markers in late infancy. Body composition (by absorptiometry), fasting glycemia, insulin, IGF-I, and high-molecular-weight (HMW) adiponectin were assessed at 4 and 12 months in BRF controls born appropriate-for-GA (N = 31) and in SGA infants receiving BRF (N = 48) or FOF (N = 51), the latter being randomized to receive a standard formula (FOF1) or a protein-rich formula (FOF2).

Setting: The study was conducted in a University Hospital.

Results: SGA-BRF infants maintained a low fat mass and normal levels of IGF-I and HMW adiponectin. In contrast, SGA-FOF infants normalized their body composition by gaining more fat; this normalization was accompanied by a marked fall in HMW adiponectinemia and, in FOF2 infants, by elevated IGF-I levels. In late infancy, SGA-BRF infants were most sensitive to insulin, even more sensitive than appropriate-for-GA-BRF controls.

Conclusions: Because the health perspectives are better for SGA-BRF than for SGA-FOF infants, the present results suggest that FOF for SGA infants should aim at maintaining normal IGF-I and HMW-adiponectin levels rather than at normalizing body composition. Nutriceutical research for SGA infants may thus have to be redirected. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 1242–1247, 2013)

Infants born small-for-gestational-age (SGA) are at higher risk for adult diseases such as diabetes and hypertension (1). Long-term studies have shown that such metabolic and cardiovascular risk is modulated by nutrition in early infancy, breast-feeding (BRF) being followed by a relatively low risk, and protein-rich formula-feeding (FOF) by a relatively high risk (2, 3).

In 2005–2006 (thus before the risk conferred by protein-rich FOF was established), we designed a study aiming to disclose early divergences in the endocrine state and body composition of SGA infants receiving either BRF or FOF (standard or protein-rich formula) across early infancy (0–4 months). This study disclosed that catch-up growth of SGA infants in early infancy prioritizes the re-

covery of lean mass, and it identified circulating IGF-I and high-molecular-weight (HMW) adiponectin at age 4 months as early markers of divergence between SGA-BRF and SGA-FOF infants (4). Herein we report the longitudinal findings in late infancy (4–12 months).

Subjects and Methods

Study population

The study cohort consisted of 130 infants (Table 1) recruited (Supplemental Figure 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>) into a longitudinal study that assesses the body composition and endocrine-metabolic state of SGA infants, as compared to appropriate-for-gestational-age (AGA)-BRF controls, in the first years after birth (4–7). This follow-up study focused on length gain, weight partitioning, and fasting glycemia and circulating insulin, IGF-I, and HMW adiponectin between 4 and 12 months.

Specific inclusion criteria were as follows:

- Birth at Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, after an uncomplicated, term (37–42 weeks), singleton pregnancy (no maternal hypertension; no gestational diabetes; no alcohol abuse; no drug addiction);
- Birth weight between 2.9 and 3.9 kg for AGA and between 1.9 and 2.6 kg for SGA infants; cord serum available at

enrollment (there were logistic restraints; step 1 in Supplemental Figure 1);

- Exclusive breastfeeding for 4 months in AGA controls; either exclusive breastfeeding for 4 months, or exclusive feeding with assigned formula in SGA infants (see below);
- At 4 and 12 months, auxological, body composition, and endocrine assessments (see below);
- Written, informed consent by at least one of the parents, in Spanish/Catalan language, at birth (as expected, the parental consent rate was higher for SGA than for AGA infants; step 2 in Supplemental Figure 1).

The exclusion criteria were complications at birth (need for resuscitation or parenteral nutrition) and congenital malformations.

The fraction of infants with complete follow-up between 4 and 12 months was higher in the SGA than in the AGA subpopulation (80% vs 30% of eligible infants; step 3 in Supplemental Figure 1). No differences were detected in the baseline features of infants who completed vs those who did not complete the follow-up.

Mothers of SGA infants were recommended to give BRF but many preferred nevertheless to give FOF (step 4 in Supplemental Figure 1). After birth, SGA-FOF infants were randomly assigned (1:1) to receive FOF1 (Enfalac 1; Mead Johnson, Madrid, Spain) or FOF2 (Enfalac for Prematures and Low-Birthweight Infants; Mead Johnson) (4). The milk concentration was 12.9% and the recommended volume was 150 mL/kg/d. FOF2 contains less fat and more protein than human milk; FOF1 has a composition

Table 1. Characteristics of Infants Born AGA or SGA and Receiving Exclusively BRF or FOF With Either FOF1 or FOF2 Across Early Infancy (0–4 mo)

	AGA-BRF	All SGA	SGA-BRF ^a	SGA-FOF1 ^a	SGA-FOF2 ^a	SGA-FOF
N (girls, n)	31 (14)	99 (53)	48 (26)	28 (16)	23 (11)	51 (27)
Primigravida (n, %)	21 (68)	67 (68)	36 (75)	20 (71)	11 (48)	31 (60)
Maternal smoking (n, %)	4 (13)	32 (32)	12 (25)	14 (50)	6 (26)	20 (39)
Cesarean section (n, %)	1 (3)	35 (35)	15 (31)	13 (46)	10 (43)	20 (39)
Gestational age (wk)	39.6 ± 0.2	38.5 ± 0.1 ^e	38.7 ± 0.2 ^c	38.5 ± 0.3 ^d	38.1 ± 0.3 ^e	38.3 ± 0.2 ^e
At birth						
Birth weight (kg)	3.3 ± 0.04	2.3 ± 0.02 ^e	2.3 ± 0.03 ^e	2.3 ± 0.04 ^e	2.3 ± 0.04 ^e	2.3 ± 0.03 ^e
Birth length (cm)	49.8 ± 0.2	45.8 ± 0.2 ^e	46.0 ± 0.3 ^e	45.7 ± 0.3 ^e	45.4 ± 0.3 ^e	45.6 ± 0.2 ^e
Birth weight Z-score	0.0 ± 0.1	−2.2 ± 0.0 ^e	−2.3 ± 0.1 ^e	−2.3 ± 0.1 ^e	−2.1 ± 0.1 ^e	−2.2 ± 0.1 ^e
Birth length Z-score	−0.1 ± 0.1	−1.7 ± 0.1 ^e	−1.7 ± 0.1 ^e	−1.8 ± 0.1 ^e	−1.8 ± 0.1 ^e	−1.8 ± 0.1 ^e
Ponderal index (kg/m ³)	26.8 ± 0.3	24.0 ± 0.3 ^e	24.0 ± 0.4 ^e	23.8 ± 0.6 ^e	24.3 ± 0.5 ^e	24.0 ± 0.4 ^e
At 4 mo						
Age (d)	126 ± 2	128 ± 1	130 ± 1 ^b	127 ± 1	126 ± 2	126 ± 1
Weight (kg)	6.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1 ^e	5.9 ± 0.1 ^e	5.9 ± 0.1 ^e	5.9 ± 0.1 ^e	5.9 ± 0.1 ^e
Length (cm)	63.5 ± 0.4	60.4 ± 0.2 ^e	60.3 ± 0.3 ^e	60.2 ± 0.5 ^e	60.9 ± 0.5 ^e	60.5 ± 0.3 ^e
Weight Z-score	0.3 ± 0.2	−0.9 ± 0.1 ^e	−0.9 ± 0.1 ^e	−0.9 ± 0.1 ^e	−0.9 ± 0.1 ^e	−0.9 ± 0.1 ^e
Length Z-score	0.1 ± 0.2	−1.0 ± 0.1 ^e	−1.0 ± 0.1 ^e	−1.0 ± 0.1 ^e	−0.8 ± 0.1 ^d	−0.9 ± 0.1 ^e
Ponderal index (kg/m ³)	27.1 ± 0.6	27.3 ± 0.4	27.7 ± 0.8	27.4 ± 0.5	26.6 ± 0.4	27.0 ± 0.3
At 12 mo						
Age (d)	385 ± 4	383 ± 2	384 ± 2	383 ± 3	382 ± 3	382 ± 2
Weight (kg)	10.1 ± 0.2	9.1 ± 0.1 ^e	9.0 ± 0.1 ^e	9.0 ± 0.2 ^e	9.4 ± 0.2 ^b	9.2 ± 0.1 ^e
Length (cm)	74.4 ± 0.5	73.6 ± 0.3	73.5 ± 0.5	73.0 ± 0.4 ^b	74.4 ± 0.7	73.6 ± 0.4
Weight Z-score	0.1 ± 0.2	−0.8 ± 0.1	−0.9 ± 0.1 ^e	−0.9 ± 0.2 ^d	−0.5 ± 0.2 ^b	−0.7 ± 0.1 ^e
Length Z-score	−0.3 ± 0.2	−0.8 ± 0.1 ^b	−0.9 ± 0.2 ^b	−1.0 ± 0.2 ^b	−0.5 ± 0.2	−0.7 ± 0.1
Ponderal index (kg/m ³)	24.6 ± 0.5	23.1 ± 0.2 ^c	23.0 ± 0.3 ^c	23.4 ± 0.5	22.8 ± 0.5 ^b	23.1 ± 0.4 ^b

Values are mean ± SEM.

^a No significant differences among SGA subgroups.

^b $P < .05$; ^c $P < .01$; ^d $P < .001$; and ^e $P < .0001$ vs AGA-BRF.

intermediate between human milk and FOF2 and is rich in energy (4).

All 130 infants ended up remaining exclusively on BRF, FOF1, or FOF2 for a minimum of 5 months. Thereafter, solid foods (5–7 months) and follow-on formula (>6 months) were gradually introduced. Most of the original BRF cohort (61% of AGA; 56% of SGA) had stopped receiving BRF at age 8 months, and most of them (81% of AGA; 81% of SGA) had stopped receiving BRF at age 12 months.

Assessments

Weight and length were measured by the same investigator (GS) at birth, 4 months, and 12 months. Weight was measured with a beam balance (Seca, Hamburg, Germany) and length was measured with a board (Seca 207; Seca), the mean of 3 measurements being used for analysis.

Body composition was assessed by absorptiometry at 4 and 12 months with a Lunar Prodigy, coupled to Lunar software (version 3.4/3.5; Lunar Corp, Madison, Wisconsin), adapted for assessment of infants (4–6). Body fat, lean mass, and bone mineral content (BMC) were assessed during natural sleep. Coefficients of variation (CVs) were <3% for fat and lean mass (4–6).

Prefeeding levels of circulating glucose, insulin, IGF-I, and HMW adiponectin were measured in serum samples obtained, in the morning, at ages 4 and 12 months.

Serum glucose was measured by glucose oxidase method, and circulating insulin and IGF-I were measured by immunochemiluminescence (IMMULITE 2000; Diagnostic Products, Los Angeles, California). The detection limit for IGF-I was 25 ng/mL; intra-assay and interassay CVs were <10%. Insulin resistance was estimated from fasting insulin and glucose levels using the homeostasis model assessment. HMW adiponectin was assessed by ELISA (Linco Research, St Charles, Missouri) with intra-assay and interassay CVs <9%.

Statistics and ethics

Analyses were performed with SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, Illinois). Age-adjusted and gender-adjusted Z-scores were calculated using mean and SD values from AGA-BRF girls and boys as reference (Supplemental Table 1). Skewed data were log-transformed before comparison. General linear models for repeated measurements were used to detect differences in 4-month and 12-month data and in changes thereof. The level of significance was set at $P < .05$. The study had 80% power to detect a difference of 0.6 SD between SGA-BRF and SGA-FOF infants. The detectable difference was 0.9 SD for comparisons between SGA-FOF1 and SGA-FOF2.

A previous report (4) focused on the interventional phase of this study (0–4 months). The present report focuses on the non-interventional follow-up (4–12 months) that was approved by the Institutional Review Board of Barcelona University, Hospital of Sant Joan de Déu.

Results

Table 2 provides the results in SGA infants, expressed in age-adjusted and gender-adjusted Z-scores, using the values in AGA-BRF controls (Supplemental Table 1) as reference; Supplemental Table 2 shows the same results, but expressed in absolute values, along with the pooled results of AGA-BRF girls and boys.

BRF infants: AGA vs SGA

The parallel control group of AGA-BRF infants disclosed that catch-up growth in SGA-BRF infants occurs in

Table 2. Results in SGA Infants

Column		SGA-BRF ^a n = 48 1	SGA-FOF1 ^a n = 28 2	SGA-FOF2 ^a n = 23 3	P Values Among SGA		P Values vs AGA-BRF Reference (n = 31)		
					BRF vs FOF2 4	FOF1 vs FOF2 5	SGA-BRF 6	SGA-FOF1 7	SGA-FOF2 8
Length	4 mo	−1.28 (−1.52 –1.04)	−1.35 (−1.78 –0.92)	−1.14 (−1.61 –0.66)	.54	.50	<.0001	<.0001	<.001
	12 mo	−.26 ^d (−.62 –0.10)	−.40 ^c (−.68 –0.12)	0.03 ^d (−0.52 0.58)	.37	.14	.33	.08	.93
Lean mass	4 mo	−0.39 (−0.78 –0.01)	−0.02 (−0.60 0.56)	−0.34 (−0.76 0.07)	.89	.38	.17	.95	.21
	12 mo	−0.52 (−0.99 0.06)	−0.61 (−0.99 –0.23)	−0.42 (−0.79 0.05)	.78	.48	.11	.02	.11
Fat mass	4 mo	−0.98 (−1.27 –0.69)	−1.27 (−1.77 –0.79)	−1.21 (−1.63 –0.80)	.35	.85	<.0001	<.0001	<.0001
	12 mo	−0.83 (−1.07 –0.59)	−0.58 ^c (−0.98 –0.19)	−0.37 ^d (−0.69 –0.05)	.03	.40	<.0001	.03	.14
Lean-to-fat ratio	4 mo	0.93 (0.40 1.45)	1.82 (0.80 2.84)	1.16 (0.58 1.73)	.59	.28	.004	.002	.001
	12 mo	0.66 (0.12 1.20)	0.58 ^c (−0.35 1.50)	0.19 ^c (−0.28 0.65)	.26	.47	.04	.22	.51
BMC	4 mo	−0.81 (−0.62 –0.10)	−0.35 (−0.83 0.14)	−0.39 (−0.92 0.14)	.12	.90	<.001	.24	.20
	12 mo	−0.40 (−0.76 –0.03)	−0.23 (−0.75 0.29)	0.02 (−0.32 0.36)	.10	.45	.14	.46	.94
IGF-I	4 mo	0.17 (−0.15 0.49)	1.12 (0.65 1.58)	2.38 (1.10 3.66)	<.0001	<.05	.50	<.0001	<.0001
	12 mo	0.37 (−0.12 0.85)	0.52 (−0.07 1.11)	1.28 (0.28 2.28)	.10	.18	.27	.13	.008
HMW adiponectin	4 mo	0.37 (0.01 0.73)	1.47 (0.70 2.24)	0.59 (0.12 1.29)	.53	.09	.17	.001	.11
	12 mo	−0.41 ^b (−0.80 –0.01)	−0.25 ^d (−0.90 0.40)	−0.88 ^d (−1.41 –0.35)	.16	.14	.16	.48	.005
Insulin	4 mo	−0.25 (−0.50 –0.01)	0.38 (−0.28 1.05)	0.33 (−0.15 0.81)	.02	.89	.24	.29	.26
	12 mo	−0.41 (−0.59 –0.23)	−0.10 (−0.46 0.26)	−0.16 (−0.59 0.27)	.29	.81	.09	.69	.55
Glycemia	4 mo	−0.16 (−0.57 0.24)	−0.37 (−1.00 0.26)	0.14 (−0.33 0.60)	.36	.20	.57	.29	.63
	12 mo	−0.43 (−0.62 –0.23)	−0.32 (−0.61 –0.03)	−0.49 (−0.82 –0.15)	.75	.45	.09	.17	.06
HOMA-IR	4 mo	−0.28 (−0.51 –0.05)	0.43 (−0.32 1.18)	0.39 (−0.16 0.94)	.03	.94	.17	.28	.21
	12 mo	−0.43 (−0.60 –0.26)	−0.10 (−0.46 0.27)	−0.21 (−0.61 0.18)	.31	.65	.04	.70	.42

Significant differences are highlighted in bold.

^a Values are Z-scores (mean and [confidence interval]) using age-specific and gender-specific norms from AGA-BRF controls.

^b $P \leq .05$, ^c $P \leq .01$, ^d $P \leq .005$ vs 4- to 12-month change in AGA-BRF controls.

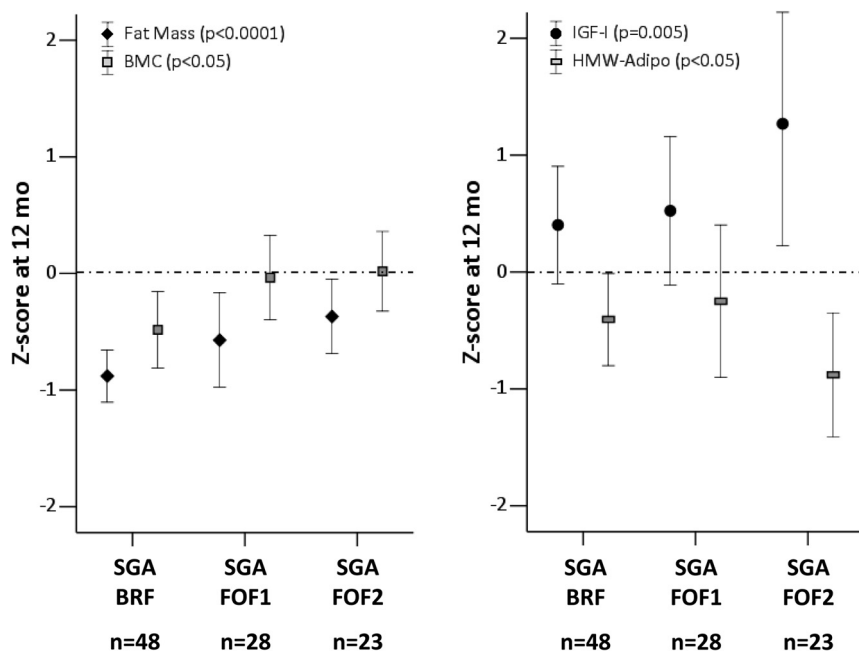


Figure 1. Z-scores of fat mass and bone mineral content (BMC) (left panel) and of circulating IGF-I and high-molecular-weight (HMW) adiponectin (right panel) at age 12 months in 99 small-for-gestational-age (SGA) infants, 48 of whom received breast-feeding (BRF) and 51 of whom received formula-feeding (FOF), either with a standard formula (FOF1; N = 28) or with a protein-rich formula (FOF2; N = 23) across early infancy. Confidence intervals are plotted. *P* values are from general linear models.

a sequence: the normalization of lean mass was mostly completed in early infancy (<4 months), whereas the normalization of bone mass (as judged by body length and BMC) continued into late infancy (4–12 months). Fat mass was still reduced and lean-to-fat ratio was still elevated at age 12 months, and this relatively hypo-adipose state was accompanied by a relative hypersensitivity to insulin and also by persistently normal levels of circulating IGF-I and HMW adiponectin (Table 2, columns 1 and 6).

SGA infants: BRF vs FOF

Catch-up in length continued into late infancy in all 3 SGA subgroups (Table 2, upper rows).

Between 4 and 12 months, SGA-FOF2 infants were characterized by catch-up of fat mass, by persistently elevated levels of circulating IGF-I, and by a striking fall of HMW adiponectin toward relatively low levels (Table 2, columns 3, 4, and 8).

The course of SGA-FOF1 infants was intermediate, their fat gain and HMW-adiponectin fall being comparable to those in SGA-FOF2 infants, but their IGF-I levels at 12 months being closer to those in SGA-BRF infants (Table 2, columns 2 and 7).

Figure 1 shows that, at age 12 months, SGA-BRF infants have a low fat mass and BMC but normal levels of IGF-I and HMW adiponectin, that SGA-FOF2 infants have a more normal fat mass and BMC but high IGF-I and

low HMW adiponectin levels, and that SGA-FOF1 infants have intermediate outcomes.

Discussion

In late infancy, SGA-BRF infants combine a low adiposity and a high insulin sensitivity with normal IGF-I and HMW adiponectin levels. In contrast, SGA-FOF2 infants combine a normalized adiposity and insulin sensitivity with high IGF-I and low HMW-adiponectin levels. Results of SGA-FOF1 infants were intermediate. Given that the metabolic and cardiovascular perspectives are better for SGA-BRF than for SGA-FOF2 infants (2, 3), the present findings suggest that nutraceutical research for SGA infants (8, 9) may have to be redirected as to aim for a high insulin sensitivity and for normal IGF-I and HMW adiponectin levels rather than for a normal body

adiposity in late infancy.

Our study appears to be the first with fully longitudinal data (including absorptiometric evaluations and endocrine assessments in fasting blood) over up to 12 months in AGA-BRF controls and in nutritionally divergent SGA subgroups, all of whom were assessed by the same investigators and methods in a single center. Given the virtual absence of similar studies, it is difficult to embed our integrated observations into previously reported evidence. Our insulin, IGF-I, and HMW adiponectin results, for example, are difficult to compare—but not incompatible—with the 12-month results from pioneering studies (10–12) wherein the duration of exclusive BRF varied widely among SGA infants (range 0–8 months), yet the results of those SGA infants were pooled.

A weakness of our study is the relatively low number of participants. Another weakness is that the nutritional patterns among the SGA subgroups continued to differ into late infancy, due to prolonged BRF in a minority of infants. Therefore, we are unable to infer to which extent the different outcomes between 4 and 12 months are attributable to nutritional differences in early infancy and/or to those persisting into late infancy.

Our IGF-I results at 4 months align well with the reports that AGA-FOF infants have higher IGF-I levels than AGA-BRF infants, particularly when receiving protein-

enriched FOF (13–16). In AGA infants, higher IGF-I levels in early infancy associate to more length gain—and not to more fat gain—in late infancy (14). This association may not apply to SGA infants, because SGA-FOF infants had higher 4-month IGF-I levels than SGA-BRF infants, but gained more fat—and not more length or more lean mass—in late infancy (Table 2). Therefore, we propose that IGF-I levels in SGA infants—and perhaps also in AGA infants—reflect not only somatotrophic drive but also adipose-tissue expansion, just as they do in hyperphagic-obese children (with or without growth-hormone deficiency) after craniopharyngioma surgery (17).

Compared to AGA-BRF infants, the AGA-FOF infants gain more fat-free mass in early infancy and gain more fat mass in late infancy (18). Compared to SGA-BRF infants, the SGA-FOF infants gain a similar amount of fat-free mass in early infancy (4, 6) but are here shown to gain more fat mass in late infancy, so that their fat mass at 12 months is less reduced than that of SGA-BRF infants. The catch-up of fat in SGA-FOF infants may partly be driven by adiponectin, because this adipokine can enhance early lipogenesis (19) and because SGA-FOF infants have elevated levels of circulating HMW adiponectin at 4 months (4). Further studies in SGA-FOF infants will have to clarify the mechanisms underpinning the apparent parallelism between their late-infantile gain of fat mass and their late-infantile fall of HMW adiponectinemia.

None of the available nutrition options seems able to normalize the endocrine state as well as the body composition of SGA infants. Early adipogenesis may have been irreversibly reduced in SGA infants (20) by an interplay of factors that inhibit the prenatal differentiation of adipocytes, such as Pref-1 (21), and of factors that favor the postnatal recovery of fat-free mass. This view offers a rationale for aiming at the combination of a low adiposity and a normal endocrinology in SGA infants, as achieved with BRF but not with FOF2. In many countries, the prevailing opinion is still to promote rapid growth in SGA infants, also in a country like India where a third of all babies (thus about 8 million babies per year) are born with a low weight and where the sequence from fetal growth restraint to adult diabetes is highly prevalent (9). We anticipate that, in such countries, early BRF and/or acceptance of a low adiposity across infancy will prove to be the most cost-effective way of preventing diabetes in the next generation.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Lourdes Ibáñez, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Pas-

seig de Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: libanez@hsjdbcn.org.

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (PI08/0443).

F.d.Z. is a Clinical Investigator supported by the Clinical Research Council of the University Hospital Leuven. G.S., M.D., and L.I. are Clinical Investigators of CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Spain). A.L.B. is an Investigator of the I3 Fund for Scientific Research (Ministry of Education and Science, Spain).

Disclosure Summary: F.d.Z., G.S., M.D., M.D.G.-R., A.L.-B., and L.I. have nothing to declare.

References

- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36:62–67.
- Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, et al. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? *Circulation*. 2007;115:213–220.
- Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, et al. Nutrition in infancy and long-term risk of obesity: evidence from 2 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2010;92:1133–1144.
- de Zegher F, Sebastiani G, Diaz M, Sánchez-Infantes D, Lopez-Bermejo A, Ibáñez L. Body composition and circulating high-molecular-weight adiponectin and IGF-I in infants born small for gestational age: breast- versus formula-feeding. *Diabetes*. 2012;61:1969–1973.
- Ibáñez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, Díaz M, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2774–2778.
- Ibáñez L, Sebastiani G, Diaz M, Gómez-Roig MD, Lopez-Bermejo A, de Zegher F. Low body adiposity and high leptinemia in breast-fed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr*. 2010;156:145–147.
- Sebastiani G, Díaz M, López-Bermejo A, Arranz A, de Zegher F, Ibáñez L. Circulating follistatin in the human fetus at term birth. *Pediatr Obes*. 2012;7:39–43.
- Vaag A. Low birth weight and early weight gain in the metabolic syndrome: consequences for infant nutrition. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104(suppl 1):S32–S34.
- Jain V, Singhal A. Catch up growth in low birth weight infants: striking a healthy balance. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;13:141–147.
- Soto N, Bazaes RA, Peña V, et al. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3645–3650.
- Iñiguez G, Soto N, Avila A, et al. Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:5500–5503.
- Iñiguez G, Ong K, Bazaes R, et al. Longitudinal changes in insulin-like growth factor-I, insulin sensitivity, and secretion from birth to age three years in small-for-gestational-age children. *Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4645–4649.
- Chellakootty M, Juul A, Boisen KA, et al. A prospective study of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3

- in 942 healthy infants: associations with birth weight, gender, growth velocity, and breastfeeding. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:820–826.
14. Ong KK, Langkamp M, Ranke MB, et al. Insulin-like growth factor I concentrations in infancy predict differential gains in body length and adiposity: the Cambridge Baby Growth Study. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:156–161.
 15. Socha P, Grote V, Gruszfeld D, et al. for the European Childhood Obesity Trial Study Group. Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2011;94:1776S–1784S.
 16. Closa-Monasterolo R, Ferré N, Luque V, et al. Childhood Obesity Project Study Group. Sex differences in the endocrine system in response to protein intake early in life. *Am J Clin Nutr.* 2011;94:1920S–1927S.
 17. Bucher H, Zapf J, Torresani T, Prader A, Froesch ER, Illig R. Insulin-like growth factors I and II, prolactin, and insulin in 19 growth hormone-deficient children with excessive, normal, or decreased longitudinal growth after operation for craniopharyngioma. *N Engl J Med.* 1983;309:1142–1146.
 18. Gale C, Logan KM, Santhakumaran S, Parkinson JR, Hyde MJ, Modi N. Effect of breastfeeding compared with formula feeding on infant body composition: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:656–669.
 19. Qiao L, Yoo HS, Madon A, Kinney B, Hay WW Jr, Shao J. Adiponectin enhances mouse fetal fat deposition. *Diabetes.* 2012;61:3199–3207.
 20. Ginsberg-Fellner F. Growth of adipose tissue in infants, children and adolescents: variations in growth disorders. *Int J Obes.* 1981;5:605–611.
 21. de Zegher F, Diaz M, Sebastiani G, et al. Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life. *Diabetes Care.* 2012;35:848–849.



Save the Date for **Clinical Endocrinology Update (CEU)**,
September 26–28, 2013, Hyatt Regency New Orleans New Orleans, LA

www.endo-society.org/CEU2013

Objetivo

Estudiar la influencia de la alimentación sobre la composición corporal y los parámetros endocrino-metabólicos (IGF-1 y adiponectina-APM) entre los 4 y 12 meses de la misma población de niños PEG del tercer artículo, de los cuales los que no recibieron LM fueron aleatorizados a recibir LA estándar o LA enriquecida en proteínas y compararlos con el mismo grupo de niños AEG alimentados con LM.

Sujetos y métodos

Se trata de la misma cohorte longitudinal descrita en el tercer artículo donde se presentan los resultados del seguimiento de niños AEG y PEG realizado entre los 4 y 12 meses. La población comprendía 31 AEG (14 niñas, 17 niños) y 99 PEG (53 niñas, 46 niños). Todos los niños AEG habían recibido LM exclusiva. De los PEG que acabaron el seguimiento hasta los 12 meses, 48 (26 niñas, 22 niños) habían recibido LM exclusiva durante 5 meses, 28 (16 niñas, 12 niños) había recibido LA estándar (LA1) y 23 (11 niñas, 12 niños) habían recibido LA enriquecida en proteínas (LA2) durante un mínimo de 5 meses, la misma leche descrita en el tercer artículo. La alimentación sólida y otros tipos de leche se introdujeron a partir de los 5 meses. Se recogió muestra de sangre a los 12 meses para determinar los niveles insulina, IGF-1 y adiponectina-APM. A los 12 meses se realizó también DXA para composición corporal (CMO, proporción de masa grasa total y abdominal y proporción de masa magra).

Resultados (ajustados por edad y sexo) :

- Niños alimentados con LM (AEG vs PEG)

- 1) A los 12 meses los PEG tenían menos peso que los AEG pero igual longitud.

- 2) La normalización de la masa magra se completó en su mayoría a los 4 meses mientras que la del CMO no ocurrió hasta los 12 meses.
- 3) La masa grasa seguía siendo más baja a los 12 meses ($p < 0.0001$) y la ratio masa magra/masa grasa estaba elevada ($p = 0.04$) en PEG.
- 4) Esta deficiencia relativa de tejido adiposo se acompañaba de mayor sensibilidad a la insulina ($p = 0.04$) y concentraciones normales de IGF-1 y adiponectina-APM.

- Niños PEG: LM vs LA

- 1) El crecimiento recuperador en longitud continuó hasta los 12 meses en los 3 subgrupos.
- 2) Entre los 4 y los 12 meses los PEG alimentados con LA2 se caracterizaron por un aumento de masa grasa ($p < 0.005$), y de IGF-1 ($p = 0.008$) y por un descenso de los niveles de adiponectina-APM ($p < 0.005$).
- 3) Los resultados en los PEG alimentados con LA1 fueron intermedios: la ganancia de masa grasa ($p < 0.01$) y el descenso de los niveles de adiponectina-APM ($p < 0.005$) fueron comparables con los PEG alimentados con LA2, mientras que las concentraciones de IGF-1 a los 12 meses fueron parecidas a los PEG alimentados con LM.
- 4) A los 12 meses los PEG alimentados con LM tenían menos masa grasa y CMO que los PEG alimentados con LA, y valores normales de IGF-1 y adiponectina-APM.

Fig. 22 Valores en Z-score de masa grasa y de CMO a los 12 meses. Comparación entre PEG con LM vs PEG con LA1 vs PEG con LA2

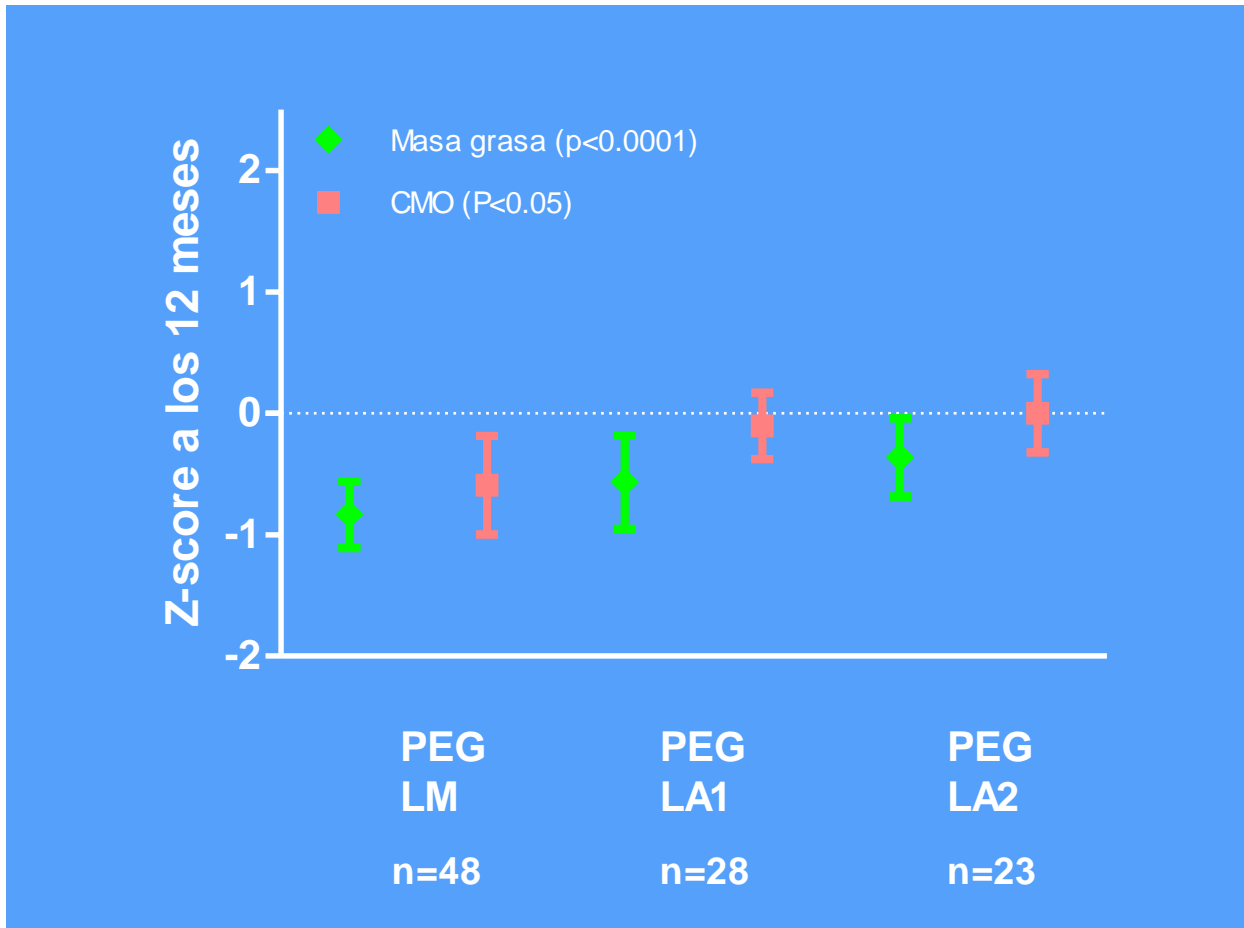
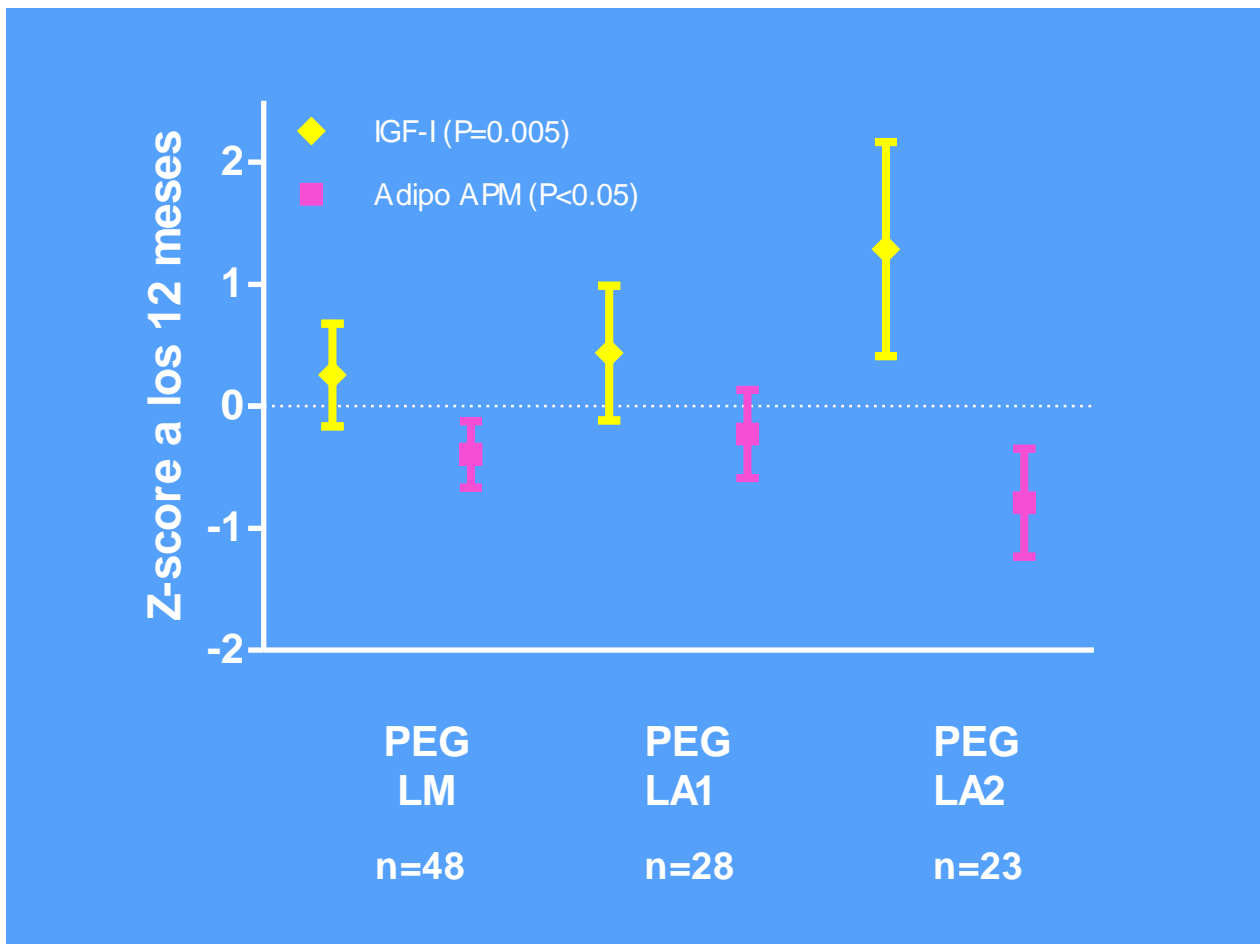


Fig. 23 Valores en Z-score de los niveles circulantes de IGF-1 y de Adiponectina-APM a los 12 meses. Comparación entre PEG con LM vs PEG con LA1 vs PEG con LA2



4.5 Quinto artículo

The sequence of prenatal growth restraint and postnatal catch-up growth leads to a thicker intima media and more pre-peritoneal and hepatic fat by age 3-6 years.

Giorgia Sebastiani, Marta Díaz, Judith Bassols, Gemma Aragonés,
Abel López-Bermejo, Francis de Zegher, Lourdes Ibañez.

Pediatric Obesity 2016; 11(4): 251-257

Impact Factor: 3,025

The sequence of prenatal growth restraint and post-natal catch-up growth leads to a thicker intima-media and more pre-peritoneal and hepatic fat by age 3–6 years

G. Sebastiani^{1,2}, M. Díaz^{1,2}, J. Bassols³, G. Aragonés⁴, A. López-Bermejo³, F. de Zegher⁵ and L. Ibáñez^{1,2}

¹Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid, Spain;

³Department of Pediatrics, Dr. Josep Trueta Hospital, Girona, Spain; ⁴Grupo de Estudio de Enfermedades Metabólicas Asociadas a Resistencia a la Insulina (GEMMAIR), Department of Medicine and Surgery, Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, Spain; ⁵Pediatric Endocrinology, University of Leuven, Leuven, Belgium

Address for correspondence: Dr L Ibáñez, Endocrinology Unit, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Passeig de Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: libanez@hsjdbcn.org

Received 11 January 2015; revised 4 May 2015; accepted 29 May 2015

Summary

Background: Infants born small-for-gestational-age (SGA) who develop post-natal weight catch-up are at risk for insulin resistance, central adiposity and cardiovascular disease in later life, even in the absence of overweight.

Objective: In young (age 3–6 years) non-obese SGA children, we assessed arterial health (as judged by intima-media thickness [IMT]) and abdominal fat distribution (subcutaneous, visceral, preperitoneal and hepatic components by magnetic resonance imaging [MRI] and/or ultrasound [US]) besides a selection of endocrine markers.

Methods: Comparisons of measures in SGA ($n = 27$) vs. appropriate-for-GA (AGA) children ($n = 19$) of similar height, weight and body mass index. Longitudinal outcomes (age 3–6 years) were carotid IMT (cIMT); fasting glucose, circulating insulin, IGF-I and high-molecular-weight (HMW) adiponectin; abdominal fat partitioning by US. Cross-sectional outcomes (age 6 years) were aortic IMT (aIMT) and abdominal fat partitioning by MRI.

Results: At 3 and 6 years, cIMT and IGF-I results were higher and HMW adiponectin lower in SGA than AGA children; at 6 years, SGA subjects had also a thicker aIMT and more pre-peritoneal and hepatic fat, and were less insulin sensitive (all P values between <0.05 and <0.0001). cIMT correlated positively with pre-peritoneal fat, particularly at 6 years. Post-SGA status and weight gain in early childhood (between 3 and 6 years) were independent predictors of cIMT at 6 years, explaining 48 % of its variance.

Conclusion: SGA children aged 3–6 years were found to have a thicker intima-media and more pre-peritoneal and hepatic fat than AGA children of comparable size.

Keywords: Insulin resistance, intima-media thickness, intra-hepatic fat, SGA.

Introduction

Children born small-for-gestational-age (SGA), especially those who experience a rapid catch-up in weight are at risk for insulin resistance and central adiposity from early childhood onward (1) and for cardiovascular dysfunction from adolescence onward (2). Insulin resistance (IR) seems to play a prime role in the pathogenesis of these abnormalities, including in the development of fatty liver, a condition recently linked to the SGA catch-up status and considered to be a hepatic component of metabolic syndrome (3,4).

Arterial wall thickening occurs spontaneously between birth and early adulthood and is mainly attributable to intima-media thickening (5). Longitudinal changes in arterial intima-media thickness (IMT) relate to age, gender, body mass index (BMI) and blood pressure (5). Carotid intima-media thickness (cIMT) is a marker for subclinical arterial disease in adults and can serve as a predictor of cardiovascular events (6); cIMT is already increased in children with cardiovascular risk factors (7). Likewise, wall thickening of the distal abdominal aorta (aIMT) is a sensitive marker of preclinical atherosclerosis in children, preceding the changes in cIMT (8,9).

In asymptomatic, prepubertal SGA children, the available data on arterial IMT are not so consistent. For example, aIMT has been reported to be increased in SGA vs. appropriate-for-gestational-age (AGA) children (10,11), or to be comparable (12). Similarly, cIMT has been shown to be either similar in SGA and AGA children or to be marginally augmented in SGA children and associated to higher blood pressure and to cardiac dysfunction (13). These apparent inconsistencies may be in part attributable to differences in SGA definitions and study designs, and to the inclusion of preterm children for comparisons.

In SGA children who had developed spontaneous catch-up growth, we assessed cIMT and abdominal fat distribution longitudinally (age 3 and 6 years) and aIMT and hepatic fat cross-sectionally (age 6 years).

Subjects and methods

Study population and design

A total of 46 children (26 girls, 20 boys) were studied longitudinally at age 3 and 6 years. Of those, 38 children were recruited at birth, studied in infancy (14) and assessed again at age 3 and 6 years; eight children were recruited at age 3 years – departing from the hospital's birth registry in the period of interest – and studied again at age 6 years (Supporting Information Fig. S1).

Specific inclusion criteria for the present subpopulations were (i) birth at Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, after an uncomplicated, term (37–42 weeks), singleton pregnancy (no gestational diabetes, no maternal hypertension, no alcohol abuse, no drug addiction); (ii) birth weight Z-score between -1 and $+1$ for gestational age (AGA birthweight range, 2.9–3.8 kg) or Z-score below -2 for gestational age (SGA birthweight range, 1.9–2.6 kg); (iii) either exclusive breastfeeding or exclusive formula feeding for 4 months in AGA and SGA infants; (iv) written, informed consent from at least one parent in Spanish or Catalan language. The exclusion criteria were clinical evidence for syndromic or infectious aetiology of SGA, urogenital tract anomalies, systemic disease or acute illness. In all 46 children, solid foods were introduced between 5–7 months and follow-on formula was started beyond 6 months, following the recommendations of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (<http://www.espgan.med.up.pt/>).

Longitudinal outcomes (age 3–6 years) were cIMT, fasting glucose, circulating insulin, IGF-I and high-molecular-weight (HMW) adiponectin; abdominal fat partitioning by ultrasound. Cross-sectional outcomes (age 6 years) were aIMT and abdominal fat partitioning by magnetic resonance imaging (MRI).

Clinical and endocrine-metabolic assessments

All anthropometric measurements were performed by the same investigator (GS), except for the data at birth from the eight children who were recruited at age 3 years; the latter data were retrieved from pediatric records. Weight and

height at 3 and 6 years were measured and their Z-scores were derived (1). Systolic and diastolic blood pressure were recorded on the right arm after a 5-min rest with the child supine, using an electronic sphygmomanometer (767 series, Welch Allyn Iberia, Barcelona, Spain), with cuff dimensions adapted to the size of the child's arm.

Blood samples were obtained in the morning between 07:30 and 08:00 after an overnight fast. Serum glucose was measured with glucose oxidase method. Insulin and IGF-I were measured by immuno-chemiluminescence (DPC IMMULITE 2500, Siemens, Erlangen, Germany), the detection limits being $0.4 \mu\text{U mL}^{-1}$ and 25 ng/mL , respectively; intra- and inter-assay coefficients of variation (CV's) were $<10\%$. IR was estimated by the homeostasis model assessment (HOMA). Circulating high-molecular-weight (HMW) adiponectin was measured with an ELISA kit (Millipore St. Louis, MO, USA); intra- and inter-assay CVs were $<9\%$. Samples were stored at -20°C until assay.

Carotid and aortic intima-media thickness

cIMT and aIMT were measured by high-resolution ultrasonography (MyLab™125, Esaote, Florence, Italy) by the same investigator (GS). For cIMT, end-diastolic images were obtained using a linear 12-MHz transducer at the level of the distal common carotid artery, 10 mm from its bifurcation. The values of five measurements on the left and five on the right were averaged; the intra-observer CV was $<10\%$ (15). For aIMT, the abdominal aorta was identified in the upper abdomen – at the level of the subxiphoid process – using a 7.5-MHz pediatric transducer, and was then followed caudally towards its bifurcation. Images of the most distal 15 mm of the abdominal aorta were focused on the dorsal wall and were digitally stored for subsequent off-line analysis. Between 4 and 6 end-diastolic measurements of the dorsal wall were made, and their average was used (9).

Abdominal fat partitioning

Abdominal fat distribution was assessed by ultrasound at 3 and 6 years (MyLab™125, Esaote, Florence, Italy). Visceral fat was measured with a convex 3.5-MHz transducer transversely positioned 1 cm above the umbilicus, as the distance between the posterior wall of the aorta and the internal face of the recto-abdominal muscle perpendicular to the aorta. The images were obtained in the supine position at the end of a normal exhalation; care was taken not to apply pressure on the abdominal wall in order to avoid compression of the tissue layer (16). The average of five measurements was used for analysis. Pre-peritoneal fat and subcutaneous fat thickness were assessed with a 7.5 MHz linear probe longitudinally below the xiphoid. Pre-peritoneal fat was measured as the distance between the posterior surface of the linea alba and the peritoneum on top of the liver (left lobe); subcutaneous fat was defined as the distance between the anterior surface of the linea alba and the fat–skin barrier (16). Measurements of visceral fat

by ultrasound correlate well with those measured by computed tomography (16). Intra-subject CV for all ultrasound measurements was <6%.

Subcutaneous and visceral adipose tissue areas in the abdominal region were also assessed by MRI at 6 years, using a multiple-slice MRI 1.5 Tesla scan (Signa LX Echo Speed Plus Excite, General Electric, Milwaukee, WI, USA) (15). The children were positioned within a torso-array device placed overlaying the abdomen; sedation was not required. Axial T1-weighted images were then obtained through the abdomen and pelvis, using a 400-cm field of view, with the following imaging parameters: 6-mm slice thickness, repetition time of 360 msec, time to echo 21 msec, two excitations, 90-degree flip angle, matrix 256 × 224, bandwidth 8.33. Images were imported into the ADW4.0 GE (General Electric, Milwaukee, WI, USA) software package. Subcutaneous and visceral adipose tissue areas were measured by fitting a spline curve to points on the border of the subcutaneous and visceral regions, selected by the same operator (blinded to the children's birth weight) (17). The same operator conducted all scans, and one radiologist processed all images.

MRI was also used to assess intra-hepatic lipid content (IHLC), by comparing the intensity of the liver to that of subcutaneous fat and spleen, assuming the latter organ as fat free (15). The formula used was $IHLC = 100 \times (AI_{liver} - AI_{spleen}) / (AI_{adipose} - AI_{spleen})$, wherein AI is average intensity. All MRI scans were performed and analysed by the same operator (blinded to the child's clinical history).

Statistics and ethics

Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Differences between the AGA and SGA subgroups were tested by unpaired *t*-test. Associations between continuous variables were studied by Pearson correlation analyses. General linear models were used to study independent associations after adjusting for potentially confounding variables, such as age, gender, type of delivery, breastfeeding and BMI. Before comparing subgroups, skewed data were log-transformed into normal distributions. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Barcelona University Hospital. As stated above, written consent was one of the inclusion criteria.

Results

There was no history of diabetes, stroke or cardiovascular disease in first-degree relatives; one grandparent in each subgroup reported hypercholesterolaemia.

Results in girls and boys were similar and were thus pooled. The fractions of breast- vs. formula-fed infants were similar in AGA and SGA subgroups (Table 1). All SGA children had a height Z-score above -2 at age 3 years, and had thus developed spontaneous catch-up growth. Participating AGA and SGA children had comparable BMIs at 3 and 6 years (Table 1).

At ages 3 and 6 years, cIMT and IGF-I results were higher and HMW adiponectin lower in SGA than AGA children; at 6 years, SGA subjects had also a thicker aIMT and more pre-peritoneal and hepatic fat, and were less insulin sensitive (Table 1 and Fig. 1).

cIMT correlated positively with pre-peritoneal fat at age 3 years ($r = 0.29$; $P = 0.04$) and 6 years ($r = 0.51$; $P = 0.0003$, respectively) in the combined AGA and SGA population. These associations remained significant after adjusting by age, gender, type of delivery, breastfeeding and BMI (data not shown). The significant association between cIMT and pre-peritoneal fat was detectable in SGA children but not in AGA children at age 6 years (Fig. 2).

Multivariate linear model of cIMT at age 6 years with selected variables at age 3 years (age, gender, type of delivery, breastfeeding and pre-peritoneal fat), showed that post-SGA status and weight gain in early childhood (between 3 and 6 years) were independent predictors of cIMT at 6 years, explaining 48% of its variance (beta: 0.636; $P < 0.0001$, and beta: 0.278; $P = 0.01$, respectively). No associations were detected between early weight gain (0–3 years) and IMT at either 3 or 6 years.

Discussion

Non-obese, catch-up SGA children – who had thus followed the 'optimal post-natal growth trajectory' (18) – were found to have a thicker IMT, more pre-peritoneal fat and more hepatic fat at age 3 and/or 6 years while their higher circulating insulin and IGF-I (1) and their lower HMW adiponectin concentrations (19) in this age range were confirmed.

SGA fetuses and newborns already have an augmented IMT (20–22). The present data indicate that, after spontaneous catch-up growth towards a normal length and weight, IMT remains augmented in SGA children aged 3–6 years. Previous data have indicated that more weight gain in early infancy leads to a thicker intima-media by late childhood (23,24) and the present data suggest that weight gain in early childhood (age 3–6 years) has comparable effects, perhaps even into young adulthood (25).

Augmented IMT has been associated to abdominal fat partitioning in children, adolescents, and adults (26–28). Our longitudinal observations in the youngest age range hitherto investigated (3–6 years) suggest that such associations emerge by early childhood and strengthen over time.

Fatty liver and increased pre-peritoneal fat have recently been linked to post-SGA catch-up conditions in older children (4,5,29). The present data suggest that the liver of SGA children with normal height and weight is relatively adipose by the age of 6 years, the youngest age hitherto studied. Prenatal reduction of subcutaneous adipogenesis, followed by hyperexpansion and subsequent overfilling of subcutaneous adipocytes after rapid post-natal catch-up, may be among the mechanisms predisposing SGA children to augmented or excessive lipid storage in other organs, including in the liver (30). These

Table 1 Clinical, endocrine, IMT and abdominal fat data from AGA and SGA children at birth and at ages 3 and 6 years

	AGA (n = 19; 42% girls)			SGA (n = 27; 62% girls)		
	Birth	3 years	6 years	Birth	3 years	6 years
At birth						
Birth weight (kg)	3.1 ± 0.1	-	-	2.2 ± 0.1	-	-
Birth weight Z-score	-0.3 ± 0.2	-	-	-2.1 ± 0.1	-	-
Cesarean section (n,%)	5 (26%)	-	-	11 (41%)	-	-
Breastfeeding (n,%)	12 (63%)	-	-	16 (60%)	-	-
Clinical features						
Age (year)	-	3.3 ± 0.1	6.0 ± 0.1*	-	3.2 ± 0.0	5.9 ± 0.1*
Height Z-score	-	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.3*	-	0.3 ± 0.2	-0.4 ± 0.2*
Weight Z-score	-	-0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.2	-	-0.2 ± 0.2	-0.0 ± 0.2
BMI (kg m ⁻²)	-	15.1 ± 0.2	15.9 ± 0.3*	-	15.3 ± 0.3	16.4 ± 0.4*
SBP (mmHg)	-	98 ± 3	105 ± 2*	-	103 ± 2	105 ± 2
Endocrinology						
Glucose (nmol L ⁻¹)	-	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1*	-	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1
HOMA-IR	-	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.1*	-	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.2 ^{ab}
IGF-I (ng mL ⁻¹)	-	78 ± 8	147 ± 9*	-	115 ± 11 ^b	175 ± 8 ^{ab}
HMW adiponectin (mg L ⁻¹)	-	31 ± 4	17 ± 2*	-	17 ± 1 ^d	12 ± 1 ^{ab}
IMT						
Carotid artery (cIMT) (mm)	-	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	-	0.35 ± 0.01 ^d	0.36 ± 0.02 ^{ab}
Aorta (aIMT) (mm)	-	-	0.72 ± 0.02	-	-	0.78 ± 0.01 ^b
Abd fat						
Subcutaneous by MRI (cm ²)	-	-	32 ± 4	-	-	37 ± 4
Subcutaneous by US (mm)	-	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.4*	-	3.9 ± 0.3	5.2 ± 0.3*
Visceral by MRI (cm ²)	-	-	21 ± 1	-	-	22 ± 1
Visceral by US (mm)	-	40 ± 2	39 ± 2	-	42 ± 1	43 ± 2
Visceral-to-subcutaneous ratio by MRI	-	-	0.8 ± 0.1	-	-	0.7 ± 0.1
Visceral-to-subcutaneous ratio by US	-	12.3 ± 1.0	10.1 ± 1.0	-	11.9 ± 0.9	8.6 ± 0.5
Hepatic (IHL) by MRI (%)	-	-	11.7 ± 1.0	-	-	14.5 ± 1.2 ^a
Pre-peritoneal by US (mm)	-	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	-	2.9 ± 0.2	4.0 ± 0.3 ^{ab}
Δ 3-6 years						
Birth						
Δ 3-6 years	-	-	2.7 ± 0.1	-	-	2.7 ± 0.1
Δ 3-6 years	-	-	-0.4 ± 0.2	-	-	-0.7 ± 0.1
Δ 3-6 years	-	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	-	-	0.2 ± 0.2
Δ 3-6 years	-	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	-	-	1.1 ± 0.3
Δ 3-6 years	-	7 ± 4	7 ± 4	-	-	2 ± 2
Δ 3-6 years	-	6.0 ± 0.1*	6.0 ± 0.1*	-	-	5.9 ± 0.1*
Δ 3-6 years	-	0.2 ± 0.3*	0.2 ± 0.3*	-	-	-0.4 ± 0.2*
Δ 3-6 years	-	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2	-	-	-0.0 ± 0.2
Δ 3-6 years	-	15.1 ± 0.2	15.9 ± 0.3*	-	-	16.4 ± 0.4*
Δ 3-6 years	-	98 ± 3	105 ± 2*	-	-	105 ± 2
Δ 3-6 years	-	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1*	-	-	4.8 ± 0.1
Δ 3-6 years	-	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.1*	-	-	1.0 ± 0.2 ^{ab}
Δ 3-6 years	-	78 ± 8	147 ± 9*	-	-	175 ± 8 ^{ab}
Δ 3-6 years	-	31 ± 4	17 ± 2*	-	-	12 ± 1 ^{ab}
Δ 3-6 years	-	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	-	-	0.36 ± 0.02 ^{ab}
Δ 3-6 years	-	-	0.72 ± 0.02	-	-	0.78 ± 0.01 ^b
Δ 3-6 years	-	-	32 ± 4	-	-	37 ± 4
Δ 3-6 years	-	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.4*	-	-	5.2 ± 0.3*
Δ 3-6 years	-	-	21 ± 1	-	-	22 ± 1
Δ 3-6 years	-	40 ± 2	39 ± 2	-	-	43 ± 2
Δ 3-6 years	-	-	0.8 ± 0.1	-	-	0.7 ± 0.1
Δ 3-6 years	-	12.3 ± 1.0	10.1 ± 1.0	-	-	8.6 ± 0.5
Δ 3-6 years	-	-	11.7 ± 1.0	-	-	14.5 ± 1.2 ^a
Δ 3-6 years	-	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	-	-	4.0 ± 0.3 ^{ab}

Values are mean ± SEM.

P values are adjusted for age, gender, type of delivery, breastfeeding and BMI.

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001 and ^dP < 0.0001 vs. AGA.^eP < 0.05 vs. 3 years.

Abd, abdominal; AGA, appropriate-for-gestational-age; aIMT, abdominal aorta intima-media thickness; BMI, body mass index; cIMT, carotid intima-media thickness; HMW adiponectin, high-molecular-weight adiponectin; HOMA-IR, HOMA-insulin resistance; IHL, intrahepatic lipid content; IMT, intima-media thickness; MRI, magnetic resonance imaging; SA, small-for-gestational-age; SBP, systolic blood pressure; US, ultrasound.

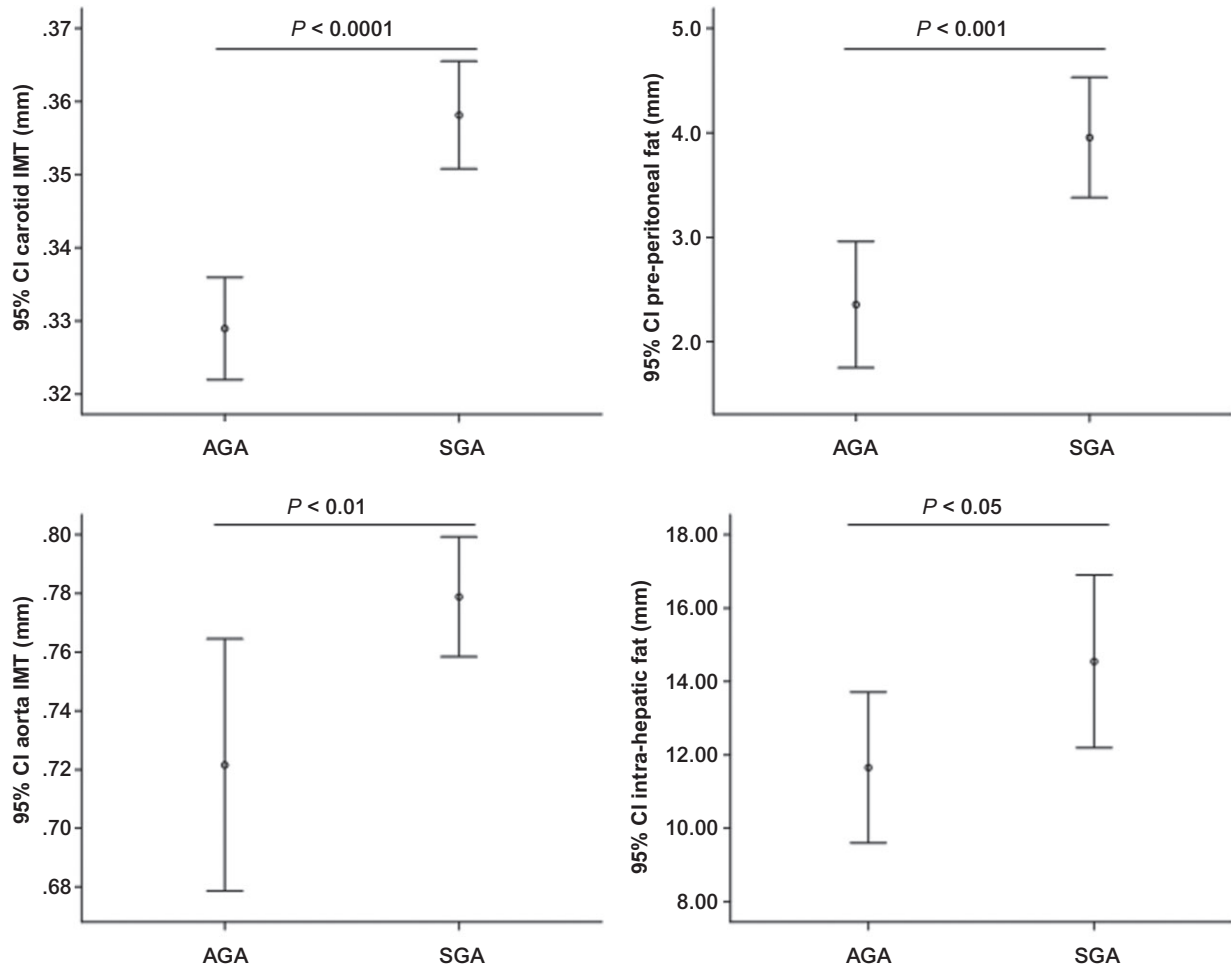


Figure 1 Differences between AGA and SGA children at age 6 years. Top-left, carotid intima-media thickness (IMT); bottom-left, aortic IMT; top-right, pre-peritoneal fat; bottom-right, intra-hepatic fat.

abnormalities are accompanied by insulin resistance and compensatory hyperinsulinaemia, and by lower HMW adiponectin concentrations, which in turn, may result in endothelial damage, augment IMT and accelerate the atherosclerotic process (31).

The amount of visceral fat (by MRI) was normal in the present SGA children, as well in absolute numbers as in relative terms (vs. subcutaneous fat in the abdominal region). These results are at variance with our observation of an augmented amount of visceral fat (also by MRI) in a previous cohort of SGA children aged 6 years (17). One of the potential explanations for this apparent inconsistency is that the fraction of SGA children, who were breastfed throughout early infancy, was higher in the present than in the previous cohort.

The limitations of the present study include the low number of study participants, the absence of MRI and aIMT assessments at age 3 years and the lack of evaluation of non-catch-up SGA children, precluding the applicability of the present results to this subpopulation. The strengths include the longitudinal design, the strict inclusion criteria, the narrow age ranges at consecutive assess-

ments, the use of the same methods over time and the absence of inter-observer variability, in particular for the ultrasound and MRI studies.

In conclusion, SGA children aged 3–6 years were found to have a thicker intima-media and more pre-peritoneal and hepatic fat than AGA children of comparable size.

Conflict of Interest Statement

No conflict of interest was declared.

Acknowledgements

GS, MD and LI are Clinical Investigators of CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain). JB is an Investigator of the Miguel Servet Fund from Carlos III National Institute of Health, Spain. ALB is a Clinical Investigator of the I3 Fund for Scientific Research (Ministry of Science and Innovation, Spain). FdZ is a Clinical Investigator supported by the Clinical Research Council of the Leuven University Hospitals.

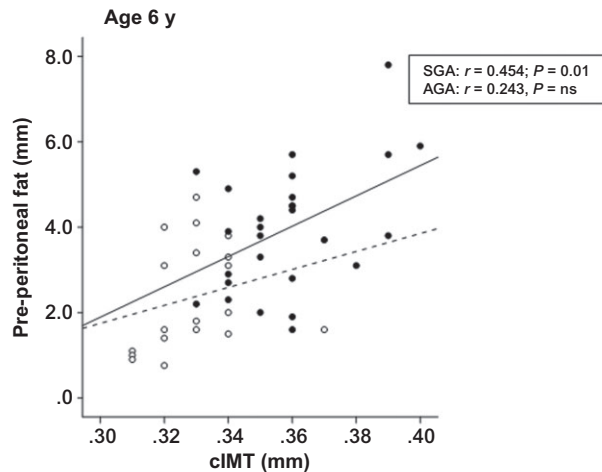


Figure 2 Relation between carotid intima-media thickness (cIMT) and pre-peritoneal fat at age 6 years in appropriate- (AGA; white circles, dotted line) and small-for-gestational-age (SGA; black circles, continuous line) children. r and P values were obtained from Pearson analysis and were adjusted for age, gender, type of delivery, breastfeeding and body mass index).

This study was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Madrid, Spain (PI08/0443 and PI11/02403) and by a Pfizer grant (W1176617).

Authors' contributions

G. Sebastiani and M. Díaz contributed to study design and wrote the first draft of the manuscript. G. Aragonés researched data. J. Bassols performed the statistical analysis and contributed to study design. A. López-Bermejo contributed to study design and reviewed/edited the manuscript. F. de Zegher contributed to study design and reviewed/edited the manuscript. L. Ibáñez contributed to study design, researched data and wrote/reviewed/edited the manuscript. Each author listed in the manuscript has seen and approved the submission of this version of the manuscript and takes full responsibility for the contents.

References

- Ibáñez L, Ong K, Dunger D, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2153–2158.
- Fabricius-Bjerre S, Jensen RB, Færch K, et al. Impact of birth weight and early infant weight gain on insulin resistance and associated cardiovascular risk factors in adolescence. *PLoS ONE* 2011; 6: e20595.
- Faienza MF, Brunetti G, Ventura A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in prepubertal children born small for

gestational age: influence of rapid weight catch-up growth. *Horm Res Paediatr* 2013; 79: 103–109.

- Alisi A, Panera N, Agostoni C, Nobili V. Intrauterine growth retardation and nonalcoholic fatty liver disease in children. *Int J Endocrinol* 2011; 2011: 269853.
- Sarkola T, Manlhiot C, Slorach C, et al. Evolution of the arterial structure and function from infancy to adolescence is related to anthropometric and blood pressure changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2516–2524.
- Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2011; 365: 213–221.
- Lamotte C, Iliescu C, Libersa C, Gottrand F. Increased intima-media thickness of the carotid artery in childhood: a systematic review of observational studies. *Eur J Pediatr* 2011; 170: 719–729.
- Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 2009; 54: 919–950.
- McCloskey K, Vuillermin P, Ponsonby AL, Cheung M, Skilton MR, Burgner D. Aortic intima-media thickness measured by trans-abdominal ultrasound as an early life marker of subclinical atherosclerosis. *Acta Paediatr* 2014; 103: 124–130.
- Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, et al. Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. *Kidney Int* 2011; 80: 119–123.
- Shimizu T, Fujii T, Iwasaki J, et al. Abdominal aortic intima-media thickness in preschool children born preterm. *Pediatr Cardiol* 2014; 35: 121–125.
- Trevisanuto D, Avezù F, Cavallin F, et al. Arterial wall thickness and blood pressure in children who were born small for gestational age: correlation with umbilical cord high-sensitivity C-reactive protein. *Arch Dis Child* 2010; 95: 31–34.
- Crispi F, Figueras F, Cruz-Lemini M, Bartrons J, Bijnens B, Gratacós E. Cardiovascular programming in children born small for gestational age and relationship with prenatal signs of severity. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207: 121.e1–e9.
- de Zegher F, Sebastiani G, Diaz M, Sánchez-Infantes D, López-Bermejo A, Ibáñez L. Body composition and circulating High-Molecular-Weight adiponectin and IGF-I in infants born small for gestational age: breast- versus formula-feeding. *Diabetes* 2012; 61: 1969–1973.
- Díaz M, Bassols J, López-Bermejo A, de Zegher F, Ibáñez L. Metformin treatment to reduce central adiposity after prenatal growth restraint: a placebo-controlled pilot study in prepubertal children. *Pediatr Diabetes* 2014. doi: 10.1111/pedi.12220.
- Mook-Kanamori DO, Holzhauer S, Hollestein LM, et al. Abdominal fat in children measured by ultrasound and computed tomography. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35: 1938–1946.

17. Ibáñez L, López-Bermejo A, Suárez L, Marcos MV, Díaz M, de Zegher F. Visceral adiposity without overweight in children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2079–2083.
18. Lei X, Chen Y, Ye J, Ouyang F, Jiang F, Zhang J. The optimal postnatal growth trajectory for term small for gestational age babies: a prospective cohort study. *J Pediatr* 2014; 166: 54–58.
19. Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Angulo M, Sebastiani G, de Zegher F. High-molecular-weight adiponectin in children born small- or appropriate-for-gestational-age. *J Pediatr* 2009; 155: 740–742.
20. Stergiotou I, Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Cruz-Lemini M, Bijmens B, Gratacos E. Aortic and carotid intima-media thickness in term small-for-gestational-age newborns and relationship with prenatal signs of severity. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 43: 625–631.
21. Sehgal A, Doctor T, Menahem S. Cardiac function and arterial biophysical properties in small for gestational age infants: postnatal manifestations of fetal programming. *J Pediatr* 2013; 163: 1296–1300.
22. Visentin S, Grumolato F, Nardelli GB, Di Camillo B, Grisan E, Cosmi E. Early origins of adult disease: low birth weight and vascular remodeling. *Atherosclerosis* 2014; 237: 391–399.
23. Skilton MR, Marks GB, Ayer JG, *et al.* Weight gain in infancy and vascular risk factors in later childhood. *Pediatrics* 2013; 131: e1821–e1828.
24. Evelein AM, Visseren FLJ, van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CSPM. Excess early postnatal weight gain leads to thicker and stiffer arteries in young children. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 794–801.
25. Leunissen RW, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken-Koelega AC. Effect of birth size and catch-up growth on adult blood pressure and carotid intima-media thickness. *Horm Res Paediatr* 2012; 77: 394–401.
26. Dencker M, Wollmer P, Karlsson MK, Lindén C, Andersen LB, Thorsson O. Body fat, abdominal fat and body fat distribution related to cardiovascular risk factors in prepubertal children. *Acta Paediatr* 2012; 101: 852–857.
27. Tadokoro N, Shinomiya M, Yoshinaga M, *et al.* Visceral fat accumulation in Japanese high school students and related atherosclerotic risk factors. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 546–557.
28. Geerts CC, Evelein AM, Bots ML, van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CS. Body fat distribution and early arterial changes in healthy 5-year-old children. *Ann Med* 2012; 44: 350–359.
29. Tanaka Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Ogawa Y, Uchiyama M. Lower birth weight and visceral fat accumulation are related to hyperinsulinemia and insulin resistance in obese Japanese children. *Hypertens Res* 2005; 28: 529–536.
30. de Zegher F, López-Bermejo A, Ibáñez L. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 418–423.
31. Jeffery AN, Murphy MJ, Metcalf BS, *et al.* Adiponectin in childhood. *Int J Pediatr Obes* 2008; 3: 130–140.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Recruitment of the longitudinal study population. AGA, appropriate-for-gestational-age; SGA, small-for-gestational-age.

Objetivo

Estudiar longitudinalmente en niños PEG que realizaron *catch-up* los parámetros endocrino-metabólicos (IGF-1, índice HOMA y adiponectina-APM), la distribución de grasa abdominal y la cIMT por ecografía entre los 3-6 años de edad. Además estudiar transversalmente la grasa hepática y la aIMT en la misma población de niños a los 6 años.

Sujetos y métodos

Estudio longitudinal en AEG y PEG que se siguieron prospectivamente entre los 3 y 6 años. La población que realizó seguimiento longitudinal hasta los 6 años comprendía 38 niños a los cuales se añadieron 8 niños reclutados a los 3 años del registro de partos del Hospital Sant Joan de Déu, para aumentar la potencia estadística. Fueron reclutados así 19 AEG (8 niñas, 11 niños) y 27 PEG (16 niñas, 11 niños).

A los 3 y 6 años se recogió muestra de sangre y se estudiaron prospectivamente los niveles de insulina, IGF-1 y adiponectina-APM. También se determinaron longitudinalmente la masa grasa abdominal mediante ecografía y la cIMT.

A los 6 años se determinaron transversalmente la aIMT por ecografía y la grasa visceral y hepática (contenido de lípidos hepático) por Resonancia Magnética abdominal.

Resultados:

- 1) No hubo diferencias entre sexos por lo cual se agruparon ambos grupos, el número de niños alimentados con LM y LA fue similar, todos los PEG realizaron *catch-up*. AEG y PEG a los 6 años tenían un IMC comparable.
- 2) A los 3 años los niños PEG presentaron valores más elevados de cIMT ($p < 0.0001$) y de IGF-1 ($p < 0.01$) y niveles más bajos de adiponectina-APM ($p < 0.0001$)

- 3) A los 6 años los niños PEG presentaron también valores más elevados de cIMT ($p<0.0001$) y de IGF-1 ($p<0.05$), concentraciones más bajas de adiponectina-APM ($p<0.05$) y menos sensibilidad a la insulina medida por el índice HOMA-IR ($p<0.05$). Además presentaron valores más elevados de aIMT ($p<0.01$), grasa pre-peritoneal ($p<0.001$) y hepática ($p<0.05$).
- 4) Se encontró una correlación positiva entre la cIMT y la grasa pre-peritoneal a los 3 ($r=0.29$; $p=0.04$) y 6 años ($r=0.51$; $p=0.0003$) en la población conjunta PEG y AEG. Después de ajustar por edad, sexo, tipo de parto, alimentación con LM e IMC, esta asociación se mantuvo significativa a los 6 años sólo en los PEG ($r=0.45$; $p=0.01$).
- 5) En la análisis multivariante resultó que la condición de PEG y el aumento de peso entre los 3 y 6 años fueron predictores independientes de la cIMT a los 6 años, explicando un 48% de su variabilidad (beta: 0.636; $p<0.0001$, y beta: 0.278; $p=0.01$ respectivamente). No encontramos asociación entre el aumento de peso precoz entre los 0-3 meses y la IMT a los 3 o 6 años.

Tabla 4. Valores endocrino-metabólicos, de grasa abdominal e IMT en PEG y AEG al nacer y entre los 3-6 años

P valor: ^a p<0.05, ^b p<0.01, ^c p<0.001 y ^d p<0.0001 vs AGA. *p<0.05 vs 3a.	AGA (N=19; 42% niñas)				PEG (N=27; 62% niñas)			
	RN	3 a	6 a	Δ 3-6 a	RN	3 a	6 a	Δ 3-6 a
Peso al nacer (Kg)	3.1 ± 0.1	-	-	-	2.2 ± 0.1	-	-	-
Peso al nacer Z-score	-0.3 ± 0.2	-	-	-	-2.1 ± 0.1	-	-	-
Lactancia materna (n,%)	12 (63%)	-	-	-	16 (60%)	-	-	-
Edad (años)	-	3.3 ± 0.1	6.0 ± 0.1*	2.7 ± 0.1	-	3.2 ± 0.0	5.9 ± 0.1*	2.7 ± 0.1
Talla Z-score	-	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.3*	-0.4 ± 0.2	-	0.3 ± 0.2	-0.4 ± 0.2*	-0.7 ± 0.1
Peso Z-score	-	-0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.2	0.1 ± 0.1	-	-0.2 ± 0.2	-0.0 ± 0.2	0.2 ± 0.2
IMC (Kg/m ²)	-	15.1 ± 0.2	15.9 ± 0.3*	0.8 ± 0.2	-	15.3 ± 0.3	16.4 ± 0.4*	1.1 ± 0.3
HOMA-IR	-	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.1*	0.4 ± 0.1	-	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.2 ^a *	0.7 ± 0.2
IGF-I (ng/mL)	-	78 ± 8	147 ± 9*	68 ± 9	-	115 ± 11 ^b	175 ± 8 ^a *	60 ± 10
HMW Adiponectina (mg/L)	-	31 ± 4	17 ± 2*	-14 ± 3	-	17 ± 1 ^d	12 ± 1 ^a *	-5.0 ± 1.5 ^b
Carotida (cIMT) (mm)	-	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.0 ± 0.0	-	0.35 ± 0.01 ^d	0.36 ± 0.02 ^d *	0.01 ± 0.0
Aorta (aIMT) (mm)	-	-	0.72 ± 0.02	-	-	-	0.78 ± 0.01 ^b	-
G. Hepatica (IHLC) RM (%)	-	-	11.7 ± 1.0	-	-	-	14.5 ± 1.2 ^a	-
G. Pre-Peritoneal ECO (mm)	-	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	0.0 ± 0.2	-	2.9 ± 0.2	4.0 ± 0.3 ^c *	1.1 ± 0.3 ^a

Fig. 24 Diferencias entre PEG y AEG a los 6 años: cIMT y aIMT

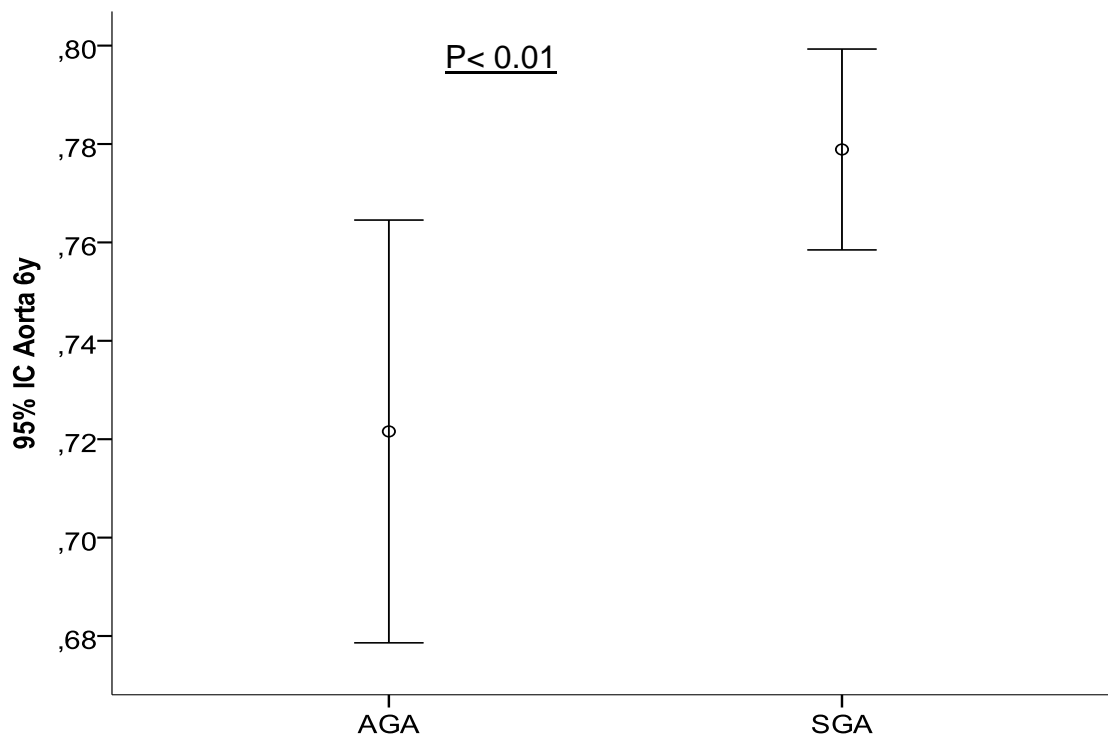
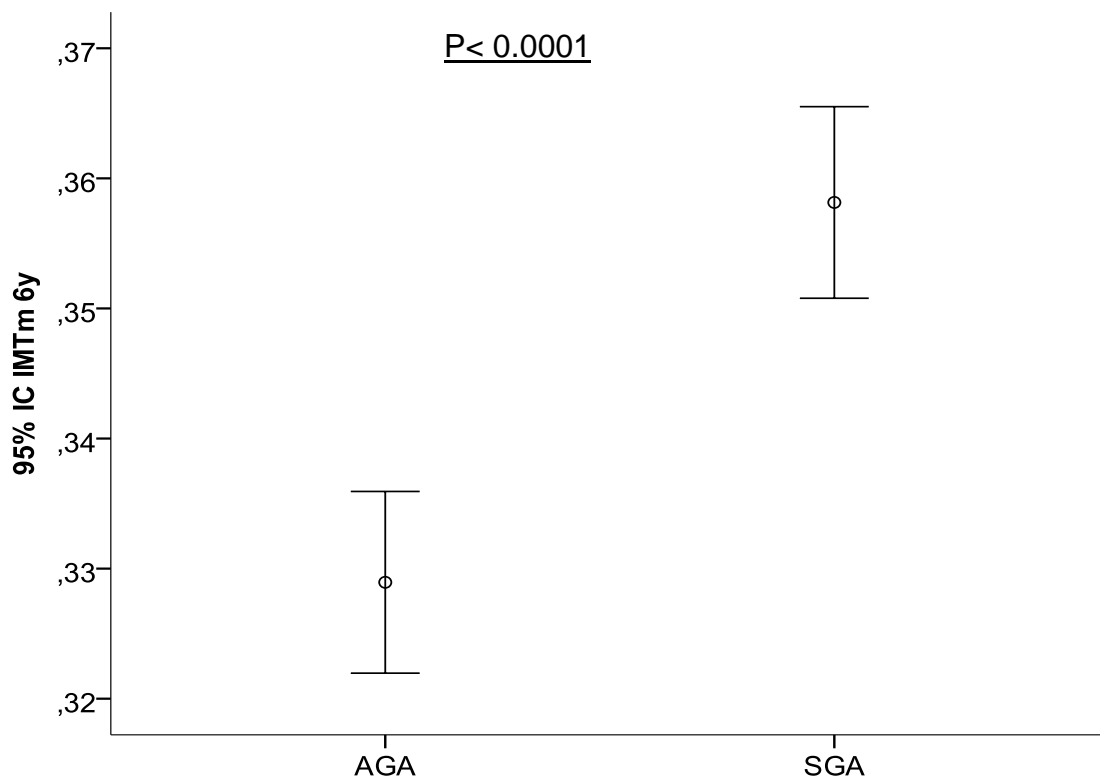


Fig. 25 Diferencias entre PEG y AEG a los 6 años. Grasa pre-peritoneal y contenido de lípidos hepático

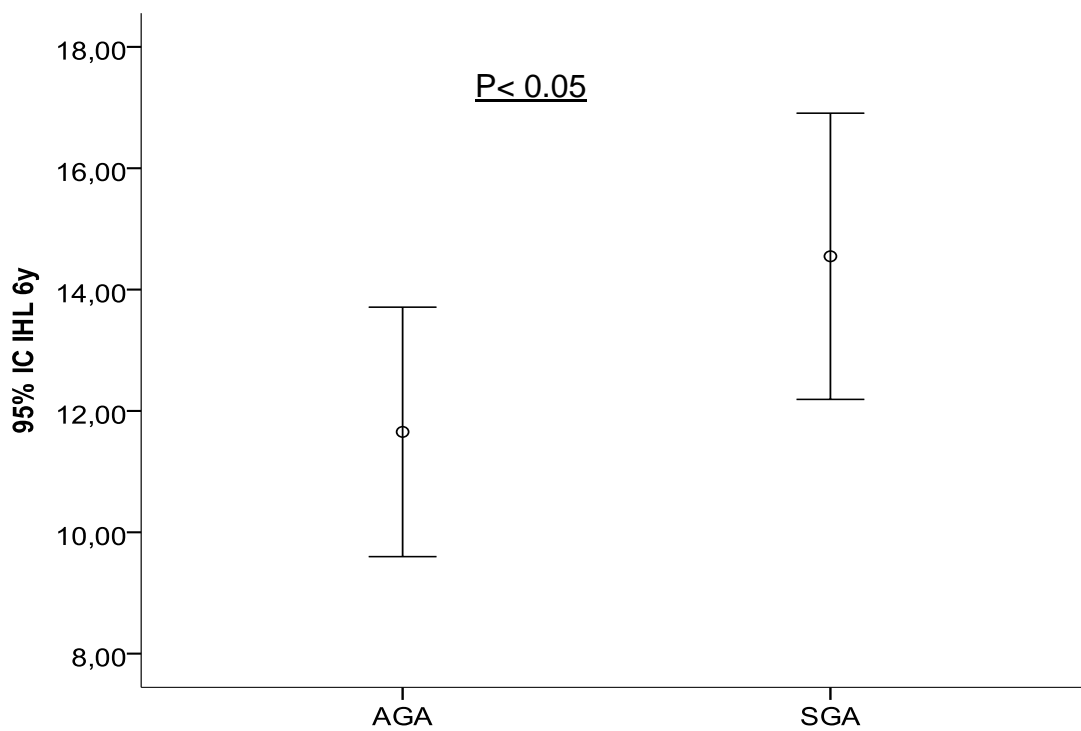
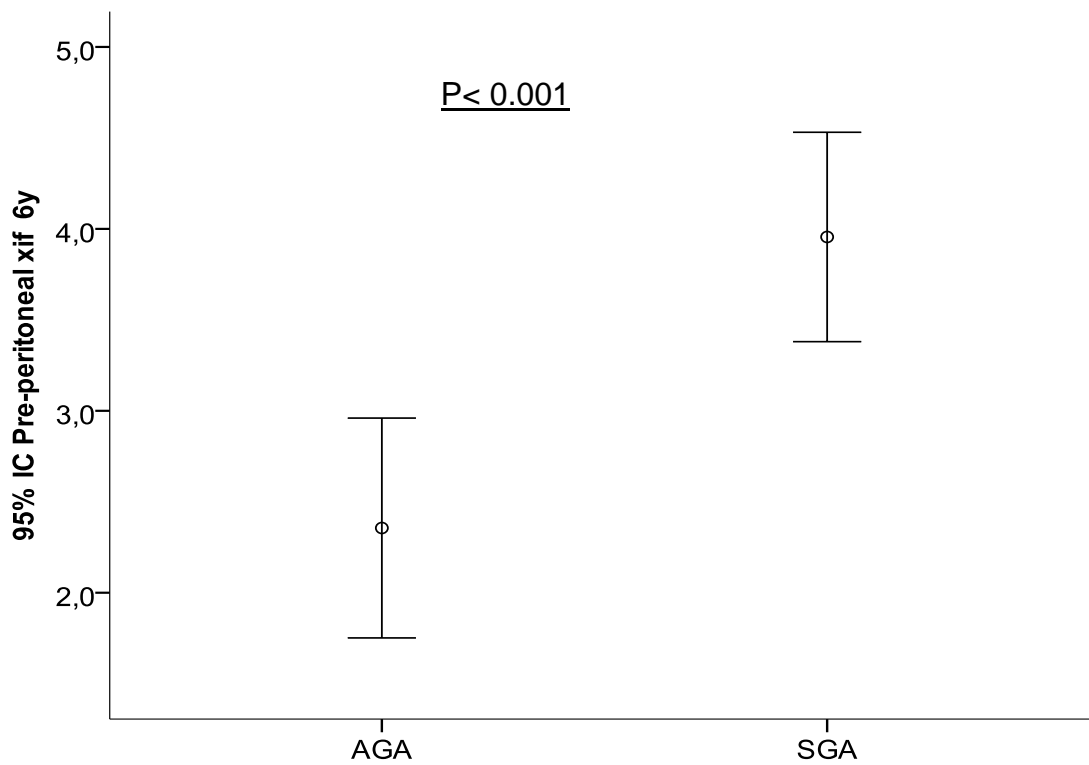
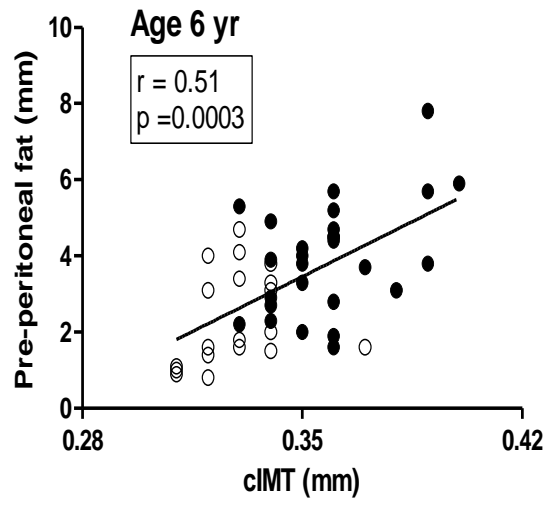
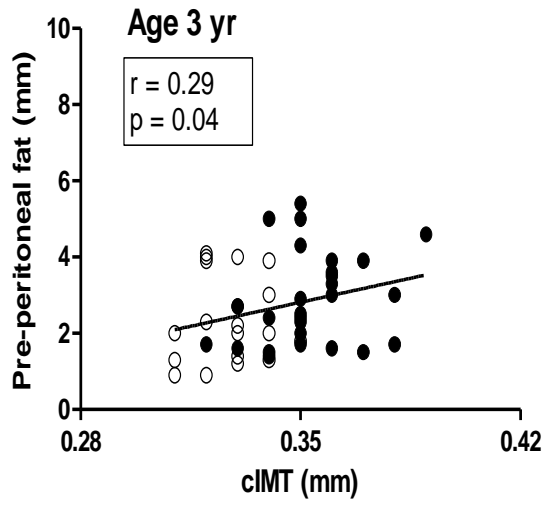


Fig. 26 Correlación entre grasa pre-peritoneal y cIMT a los 3 y 6 años



5. DISCUSIÓN

Los artículos presentados en esta Tesis forman parte de un estudio longitudinal de 6 años de duración que es pionero en el seguimiento prospectivo de niños PEG a término que realizan *catch-up* recuperador. Se describe por primera vez la relación entre evolución antropométrica, perfil endocrino-metabólico, composición corporal (por DXA), y factores de riesgo cardiovascular en etapas críticas de la vida post-natal.

5.1 CARACTERÍSTICAS NEONATALES DE LOS NIÑOS PEG: sensibilidad a la insulina y déficit de tejido adiposo

Previamente nuestro grupo ha reportado que los niños PEG nacen con menos masa grasa y masa magra, con bajo contenido mineral óseo y que presentan concentraciones bajas de insulina e IGF-1 en sangre de cordón comparados con niños AEG, hallazgos concordantes con los de otros estudios [236,237]. Existen además diferencias entre géneros: las niñas AEG y PEG tienen concentraciones más altas de insulina e IGF-1 que los niños AEG y PEG [236].

Los resultados de los tres primeros artículos confirman estos hallazgos; en el tercer artículo (de Zegher et al. Diabetes 2012), además se demuestra la existencia de concentraciones bajas de IGF-1 y de adiponectina-APM en PEG. En estudios precedentes se ha observado que los recién nacidos PEG tienen más sensibilidad a la insulina y niveles más bajos de IGF-1, el mejor marcador del crecimiento fetal [238], que los prepara para el crecimiento recuperador post-natal. Las concentraciones de IGF-1 en sangre de cordón se relacionan con la masa magra y con la masa grasa del recién nacido; la correlación con la masa grasa traduce el papel estimulador de IGF-1 sobre la adipogénesis que es escasa en los PEG [239]. La mayoría de estudios relacionan positivamente la adiponectina-APM en sangre de cordón con el peso al nacer [240,241] explicando las concentraciones más bajas en PEG; esta correlación no la confirman otros

investigadores [242]. Las concentraciones de adiponectina en sangre de cordón son tres veces más altas que en sangre materna; en gestaciones complicadas con restricción del crecimiento existe una reducción de la adiponectina materna y aumento de TNF- α , lo que sugiere un estado inflamatorio [243]. En sangre de cordón, los niveles de adiponectina-APM en PEG y AEG son más altos que en adultos, lo que se relacionaría con la escasa grasa visceral que caracteriza al recién nacido [122]. Las concentraciones más bajas de adiponectina-APM en sangre de cordón y placenta de niños PEG se relacionarían con el escaso número de adipocitos que tienen estos niños al nacer, y con el peso al nacimiento, sugiriendo que la adiponectina podría actuar como factor de crecimiento placentario [244]. En animales de experimentación se ha demostrado que la adiponectina aumenta el TA fetal y que la adiponectina fetal es más alta si la madre realiza una dieta hipercalórica. Este aumento de adiponectina estimularía el transporte de AGL a través de la placenta y la expresión de genes lipogénicos en el hígado fetal produciendo aumento de lipogénesis hepática [245]. Los niveles bajos de adiponectina-APM en neonatos PEG sugieren un mal funcionamiento de estos mecanismos de aumento de la adiposidad fetal. Está descrito además que niveles bajos de leptina en sangre de cordón directamente relacionados con la adiponectina, activarían los centros hipotalámicos del apetito y mecanismos neuroendocrinos en niños PEG, lo que favorecería la aceleración del crecimiento en los primeros 6 meses de vida [246].

Concorde con la mayor sensibilidad a la insulina en recién nacidos PEG, el primer artículo de esta tesis (Sebastiani et al. *Ped Obes*, 2012) demuestra que los niveles de folistatina en sangre de cordón son elevados y se relacionan inversamente con la escasa masa grasa que presentan al nacer. En niñas PEG además, se encontró una relación inversa de la folistatina con la insulina, lo que sugiere su acción en el metabolismo de la glucosa.

En mujeres embarazadas, los niveles de folistatina circulante son más elevados por efecto

de los estrógenos, con un pico a las 38–39 semanas de gestación; en el parto a término se elevan a niveles más de 10 veces superiores a los que se han detectado en este estudio en el feto a término, sugiriendo que la placenta es una barrera que separa la folistatina del compartimento materno y fetal, por lo cual las concentraciones en el feto son de origen fetal más que placentario o materno [247]. La Activina A, la inhibina A y la ratio activina/folistatina se encuentran elevadas en sangre materna en gestaciones con restricción de crecimiento fetal, lo que sugiere que los valores de folistatina no se elevan en sangre materna en estas gestaciones. Dado que la activina promueve la división celular del embrión y la invasión del trofoblasto, en casos de hipoxia por disfunción placentaria, los niveles de activina A aumentan como respuesta al estado inflamatorio en la madre [248]. Un estudio realizado en embarazadas con diabetes gestacional demostró concentraciones más bajas de folistatina en estas gestantes, una relación inversa con el índice HOMA y una asociación directa con la masa grasa y el crecimiento del feto, sugiriendo un papel de esta adipoquina en la homeostasis glucémica y en la adiposidad durante la gestación [249].

La folistatina y la Follistatina like-3 (FSL-3, que tiene analogías estructurales y funcionales con la folistatina), participan en el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos inhibiendo de manera autocrina/paracrina la activina y la miostatina en múltiples tejidos [157]. En animales de experimentación, la activina A ejerce un efecto supresor en la diferenciación, maduración y función de las células beta, favoreciendo la proliferación de células beta inmaduras, y aumentando la secreción de insulina. Estos efectos son revertidos por la folistatina que incrementa el fenotipo maduro de las células beta, mejora la sensibilidad a la insulina, y aumenta la sensibilidad al glucagón en el hígado durante el ayuno manteniendo la glucemia estable [250]. La miostatina disminuye la tolerancia a la glucosa en músculo e hígado, y la folistatina revierte este efecto [251]. En nuestro estudio,

el hallazgo de un aumento de folistatina en recién nacidos PEG indicaría una regulación de la producción de insulina por la folistatina, determinando un aumento de la sensibilidad a la insulina y una reducción de la acumulación de grasa si estos niños fueran expuestos a una dieta hipercalórica como ha sido descrito en ratas por Brandt et al. [166]. Además, como se ha mencionado anteriormente, la folistatina aumenta la masa muscular inhibiendo la miostatina que tiene como función principal impedir la diferenciación y el crecimiento del tejido muscular [159,252] así que las concentraciones elevadas de folistatina contribuirían a paliar el déficit de masa magra en recién nacidos PEG.

La folistatina aumenta la adipogénesis en TA atenuando la acción inhibitoria de la activina A en la diferenciación de los pre-adipocitos [253]. La activina A aumenta el número de pre-adipocitos indiferenciados vía autocrina-paracrina y está expresada preferentemente en los progenitores indiferenciados *in vivo*. Su expresión disminuye durante la inducción de la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos maduros (adipogénesis) *in vitro*. La folistatina, siendo un antagonista de la activina, promueve la diferenciación de los adipocitos desde las células progenitoras *in vitro*. Se ha descrito que en obesos los macrófagos presentes en el TA aumentan los niveles de activina A aumentando las formas inmaduras de los adipocitos, provocando disfunción del TA [254]. La miostatina también inhibe la diferenciación de los adipocitos *in vitro* y este efecto sería bloqueado por la folistatina [255]. La hiperfolistatinemia presente en recién nacidos PEG bloquearía la activina A y la miostatina con el consecuente aumento de la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos maduros. Este sería un mecanismo compensador para suplir el déficit de TA subcutáneo de los recién nacidos PEG, y ayudaría en la expansión del TA, que durante los primeros meses de vida se produce mayoritariamente a nivel subcutáneo [256, 257]. En niños PEG este mecanismo está drásticamente reducido, presentando además adipocitos de pequeño tamaño como se ha demostrado en animales de

experimentación [258]. De acuerdo con nuestros resultados, la hiperfolistatinemia en recién nacidos PEG reflejaría la activación fetal de un mecanismo homeostático para promover la adipogénesis y facilitar el reclutamiento de masa grasa post-natal. A través de este mecanismo los niños PEG especialmente los expuestos a dieta hipercalórica, intentarían aumentar la sensibilidad a la insulina, expandir el TA para acumular el exceso de grasa, y suprimir la producción de macrófagos y de citoquinas pro-inflamatorias como mecanismo de prevención de la obesidad [259,260]. Además la hiperfolistatinemia facilitaría el paso de TA blanco a TA marrón inhibiendo la activina y la miostatina y mejorando el metabolismo energético y la termogénesis del feto [261,262]. En sujetos obesos, los niveles de FSTL3 están aumentados e inducidos por TNF- α , probablemente como mecanismo para contrarrestar los efectos pro-inflamatorios de la activina A [263]. También en gestaciones con crecimiento fetal restringido se ha descrito aumento de marcadores de inflamación como TNF- α , que induciría aumento de folistatina en los PEG por un mecanismo similar [243].

Durante los primeros meses de vida, los PEG priorizan el reclutamiento de masa magra [147], agravando el déficit de TA subcutáneo. Esto podría traducir la persistencia de los efectos de la folistatina en el músculo a los 4 meses, sobre los efectos en TA. La reducción de la expansión del TA subcutáneo en períodos críticos del desarrollo, especialmente si se asocia a dieta hipercalórica, favorecería la resistencia a la insulina y el desarrollo de lipotoxicidad por la imposibilidad de almacenar los lípidos en exceso.

En un estudio longitudinal, se observó que los niveles de folistatina son más bajos en niños PEG con talla baja que reciben tratamiento con GH. La disminución de la folistatina durante el tratamiento se podría relacionar con la persistencia de menor cantidad de TA subcutáneo y con la resistencia a la insulina secundaria al tratamiento [264], confirmando el papel de la folistatina en el metabolismo glucídico y en la regulación del TA.

El TA se desarrolla en las últimas etapas de la vida fetal y se expande rápidamente en el periodo inmediato post-natal. Como se ha comentado anteriormente, durante los primeros meses de vida los niños PEG priorizan el reclutamiento de masa magra sobre el de masa grasa y sobre el contenido mineral óseo empeorando su hipoadiposidad [147].

El segundo artículo de esta Tesis (de Zegher et al. Diabetes Care, 2012) demuestra que los niveles de Pref-1 son detectables al nacer y presentan un rango entre 6-100 µg/L siendo mucho más altos que en circulación materna, sugiriendo el origen fetal de este factor. Los recién nacidos PEG presentaron niveles más altos de Pref-1, comparados con los AEG, sin relación con parámetros de composición corporal. Como se ha descrito en la introducción, Pref-1 inhibe la adipogénesis y la formación del hueso inhibiendo la diferenciación de las células multipotentes mesenquimales en adipocitos, condrocitos y osteoblastos [265]. Las concentraciones elevadas de Pref-1, el único marcador de los pre-adipocitos, demuestran que los recién nacidos PEG mantienen un número elevado de células adiposas indiferenciadas; los niveles altos de Pref-1 inhibirían la diferenciación de los adipocitos del TA subcutáneo. Ratas transgénicas con mayor expresión de la forma soluble de Pref-1 mostraron una marcada reducción del TA y disfunción del mismo con menor secreción de factores adipocitarios. Como consecuencia, estas ratas presentaban lipodistrofia, hipertrigliceridemia y disminución de la sensibilidad a la insulina [172]. Las ratas con inhibición total de Pref-1 también desarrollaban hipertrigliceridemia, aumento de AGL y alteración del metabolismo de la glucosa [171] hecho que demuestra que el correcto desarrollo y función del TA subcutáneo son críticos para mantener la homeostasis glucosa/insulina; asimismo, concentraciones adecuadas de Pref-1 en edades tempranas son fundamentales para la regulación del número de adipocitos post-natales. En nuestro estudio, las concentraciones elevadas de Pref-1 contribuirían al déficit de TA subcutáneo en los recién nacidos PEG, a una menor diferenciación de los

adipocitos, y a la alteración de la producción de adipoquinas. Si existen pocos adipocitos maduros la expansión de TA conlleva la hipertrofia de estos adipocitos durante el *catch-up* post-natal y consecuente lipotoxicidad. Se ha descrito que Pref-1 también tiene un papel en la regulación de la masa muscular por lo cual su mayor expresión incrementa la masa muscular y las fibras musculares en animales de experimentación [266]. En nuestro estudio, los niveles elevados de Pref-1 favorecerían el reclutamiento de la masa muscular durante los primeros meses de vida cuando los niños PEG priorizan la expansión de la masa magra [147].

Pref-1 se expresa abundantemente en tejidos embrionarios y en placenta, participando en el crecimiento fetal. Estudios realizados en adipocitos, páncreas, medula ósea, hígado y timo de ratas evidencian la función de Pref-1 como factor de crecimiento dado que mantiene las células proliferativas en un estadio indiferenciado [267]. Nuestro grupo (Díaz et al.) ha demostrado que la expresión de Pref-1 en placenta está disminuida en niños PEG y se relaciona con la ganancia de peso en los primeros meses de vida. La disminución de la expresión de Pref-1 en placenta se asociaría a restricción del crecimiento fetal porque un ambiente intrauterino desfavorable podría alterar la metilación en regiones reguladoras de Pref-1. La existencia de dos formas de Pref-1 (la soluble y la asociada a membrana) codificadas por diferentes mecanismos de *splicing* en el mismo gen, explicaría por qué la expresión de Pref-1 está disminuida en placenta pero su forma soluble está aumentada en sangre de cordón. La expresión reducida de Pref-1 placentario en niños PEG, se asociaría al *catch-up* de peso a los 4 y 12 meses; además se relacionaría inversamente con el porcentaje total de masa grasa y directamente con la masa magra, así que la expresión disminuida de Pref-1 en placenta no favorecería un aumento de adipogénesis en niños PEG [268]. La expresión de Pref-1 en el TA marrón fetal es alta y disminuye progresivamente después del nacimiento con la diferenciación de

los adipocitos marrones, lo que demuestra que Pref-1 está implicado también en el control de los genes que regulan la termogénesis, por lo cual las concentraciones elevadas en niños PEG indicarían la existencia de adipocitos marrones poco diferenciados al nacer y de un menor control de la termogénesis [269]. Los fetos de peso elevado hijos de madres con diabetes gestacional presentan niveles bajos de Pref-1 en sangre de cordón, indicativos de mayor adipogénesis y más TA fetal; estas características constituyen una imagen en espejo de nuestro estudio en PEG [270].

En el periodo post-natal Pref-1 deja de expresarse en varios tejidos [271] y en nuestro estudio se demuestra que sus niveles circulantes disminuyen; durante los primeros días de vida y a los 4 meses los niveles de Pref-1 son comparables con los de niños AEG. Esta disminución de las concentraciones de Pref-1 indica que en los primeros meses de vida aumentan las formas maduras de adipocitos aunque en niños PEG el número total de adipocitos sigue siendo escaso en período post-natal, como se ha descrito anteriormente.

5.2 BAJO PESO AL NACER Y EVOLUCIÓN DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA: LACTANCIA MATERNA VS LACTANCIA ARTIFICIAL

4 meses: Escasa expansión del tejido adiposo. Aumento de IGF-1 y adiponectina-APM en niños alimentados con LA

El tercer artículo de esta Tesis (de Zegher et al. Diabetes 2012) compara niños AEG alimentados con LM con dos grupos PEG alimentados, respectivamente, con LA estándar (LA1) y LA enriquecida en proteínas (LA2), durante los primeros 4 meses de vida. Durante este periodo los niños PEG que recibieron LM y los que recibieron LA ganaron peso y longitud, masa grasa y magra de forma similar. Proporcionalmente el aumento de masa grasa fue el doble en lactantes AEG que en lactantes PEG. Considerando que se necesita menos energía para ganar 1 Kg de masa magra que 1 Kg de masa grasa [272] los niños

PEG necesitarían entonces menos calorías que los niños AEG para ganar la misma cantidad de peso corporal, y esto significaría que no está justificado utilizar fórmulas enriquecidas en niños PEG. En nuestro estudio la alimentación no influye en la ganancia de peso ni en la composición corporal durante los primeros 4 meses de vida. Este hecho se explicaría con la teoría del *programming*, que indica que la influencia de la LA sobre el aumento de peso es evidente a partir de los 3 meses de edad post-natal, y fundamentalmente entre los 3 y 6 meses, con una respuesta dosis-dependiente [273]. Singhal et al. reportaron que niños PEG alimentados con fórmula enriquecida durante los primeros 9 meses de vida presentaban aumento de peso más marcado evidente a los 9 meses que los alimentados con LM o fórmula estándar y esto se relacionaba con un aumento de masa grasa a los 5-8 años [204].

Gale et al. demostraron que niños a término AEG alimentados con LA, presentaban más masa magra y menos masa grasa a los 3-4 meses y 8-9 meses mientras que a los 12 meses tenían más masa grasa [274]. Por el contrario, los niños alimentados con LM aumentarían la masa grasa durante los primeros meses de vida debido al mayor contenido de leptina en la leche materna, que además determinaría mejor regulación del apetito [194]. El déficit de TA en niños alimentados con LA durante el periodo de máxima expansión del mismo, podría predisponer a problemas metabólicos [275]. Gale et al. describieron también que niños AEG a término a los dos meses de vida presentaban un aumento del TA subcutáneo y de lípidos hepáticos (sugestivo de aumento de la lipogénesis hepática) medidos por resonancia magnética, independientemente del tipo de alimentación recibida. Este mecanismo fisiológico permitiría acumular grasa para preservar energía [276]. En los PEG la escasa expansibilidad del TA en los primeros meses de vida es independiente de la alimentación y representaría una respuesta genéticamente programada que traduciría un fallo en el aumento del número de

adipocitos en este periodo crítico de la vida post-natal con hipertrofia de estos pocos adipocitos en caso de dieta hipercalórica [277].

Cómo demostramos en el tercer artículo (de Zegher et al. Diabetes 2012) a los 4 meses los niveles circulantes de adiponectina-APM y de IGF-1 están influenciados por la nutrición siendo comparables en niños AEG y PEG que recibieron LM, sin embargo se encuentran más elevados en los niños PEG alimentados con LA, siendo los niveles de adiponectina-APM más altos en los niños alimentados con LA1 y los niveles de IGF-1 más aumentados en niños PEG alimentados con LA2. Anteriormente se había descrito que fórmulas enriquecidas en proteínas estimulan la producción de insulina y aumentan los niveles de IGF-1, con consecuente aceleración posterior del crecimiento. Además en animales de experimentación las dietas hipercalóricas pueden provocar alteraciones epigenéticas en la expresión de IGF-1 que llevarían a las alteraciones metabólicas propias de la obesidad [278]. Ong et al. demostraron que los lactantes AEG sanos alimentados con fórmulas artificiales presentaban niveles más altos de IGF-1 a los 3 meses comparados con los alimentados con LM, sin encontrar diferencias en la adiposidad, y estos niveles se asociaban con un aumento en longitud entre los 3 y 12 meses; además, encontraron una relación inversa del peso al nacer con los niveles de IGF-1 a los 3 meses [279]. Se ha descrito también que IGF-1 regula las funciones del TA y estimula la diferenciación de los pre-adipocitos en adipocitos maduros por lo cual la elevación de los niveles de IGF-1 sería un mecanismo compensatorio para reclutar más adipocitos maduros [280,281]. La expresión de la adiponectina-APM aumenta con la diferenciación de los adipocitos, por lo que los niveles de adiponectina pueden aumentar durante los primeros meses de vida [282]. Los neonatos a término presentan un 15% aproximadamente de masa grasa, mayoritariamente subcutánea. Con el aumento de edad la ratio grasa subcutánea/ visceral disminuye y los cambios en la composición

corporal contribuyen a la evolución de una correlación positiva entre adiponectina y peso al nacer a una correlación negativa con el peso en la edad adulta. Estudios longitudinales en ratones han demostrado que con la edad, la adiponectina aumenta con el peso, y llegado a un punto máximo, empieza a descender proporcionalmente al acúmulo de grasa abdominal [283]. Los mecanismos que regulan la adiponectina en adultos son distintos a los que regulan este marcador en niños. Por ejemplo, en recién nacidos de peso elevado para la edad gestacional las concentraciones de adiponectina y de leptina en sangre de cordón son altas y se relacionan directamente con la adiposidad, mientras que en adultos tienen una relación inversa [284]. En nuestro estudio los niveles de adiponectina-APM fueron similares en lactantes PEG y AEG alimentados con LM, pero más altos en niños PEG alimentados con LA a los 4 meses. La adiponectina estimula la diferenciación de los adipocitos y suprime la lipólisis por lo cual en niños PEG existe una correlación entre los niveles de adiponectina y los cambios en la diferenciación del TA en los primeros 4 meses. El aumento de adiponectina-APM en el grupo PEG alimentado con LA sería un mecanismo compensador que intentaría estimular la diferenciación de las células adiposas y la expansión del TA, dado que la dotación de adipocitos es deficitaria e insuficiente para afrontar un exceso de calorías [285].

12 meses: resistencia a la insulina y aumento de masa grasa relacionados con la fórmula enriquecida en proteínas

Según los resultados del cuarto artículo (de Zegher et al. JCEM, 2013) a los 12 meses, los niños PEG alimentados con LM exclusiva tienen menos masa grasa, más sensibilidad a la insulina y concentraciones normales de IGF-1 y adiponectina-APM. Entre los 4 y 12 meses los PEG alimentados con LA2 presentan aumento de masa grasa, concentraciones elevadas de IGF-1 y una disminución de los niveles de adiponectina-

APM. Los PEG que recibieron LA1 presentaron características similares excepto por las concentraciones de IGF-1, que fueron iguales a los PEG alimentados con LM.

Soto et al. e Iñiguez et al. describieron que los PEG que realizan *catch-up* presentan al año de vida concentraciones más elevadas de insulina e IGF-1 comparados con niños AEG [52,55]. Iñiguez et al. demostraron también que en PEG los niveles elevados de IGF-1 persistían a los 3 años y estaban relacionados con parámetros de resistencia a la insulina. El estado de resistencia a la insulina ya presente al año de edad empeoraría en los sujetos que reciben fórmulas enriquecidas en proteínas, y estarían asociadas a resistencia a la insulina en la adolescencia [286]. Socha et al. encontraron niveles elevados de IGF-1 y de insulina en niños AEG alimentados con fórmula enriquecida en proteínas, que se asociaban a una ganancia rápida de peso en los primeros 6 meses de vida demostrando la importancia de IGF-1 en el crecimiento post-natal inmediato [287]. La ganancia ponderal se correlaciona directamente con aumento de masa grasa comparado con los niños alimentados con LM y esta tendencia persiste a los 2 años [288,289]. Por el contrario, en los niños alimentados con LM las concentraciones de IGF-1 eran más bajas en la infancia y más altas en la adolescencia, sugiriendo un efecto protector cardiovascular [290]. La regulación de IGF-1 a través del aporte proteico se ha descrito previamente en la infancia [291]. La IGF-1 promueve el crecimiento longitudinal del hueso y la formación del músculo esquelético durante el periodo post-natal [292] pero también tiene efectos sobre el TA favoreciendo la diferenciación de los adipocitos y el acumulo de lípidos *in vitro* [293]. En nuestro estudio los PEG alimentados con LA2 presentan valores elevados de IGF-1 a los 12 meses y estos valores se asocian a un aumento de masa grasa probablemente debido a los efectos de IGF-1 sobre el TA.

El *catch-up* en masa grasa al año de vida estaría relacionado con la disminución de los niveles de adiponectina, mucho más marcada en lactantes PEG alimentados con LA2, lo

que sugiere disfunción del TA. Estudios experimentales en ratas demuestran que las fórmulas hipercalóricas en fetos con retraso de crecimiento intrauterino, que favorecen un *catch-up* rápido, se asocian a alteración en la expresión de genes del tejido adiposo [294]. Un estudio longitudinal de Iñiguez et al. ha demostrado que la adiponectina tiende a disminuir durante los primeros 2 años de vida de forma similar en AEG y PEG. Las concentraciones de esta proteína disminuyen más en PEG con más *catch-up* en peso, sin relacionarse con las cifras de insulina [143]. Bozzola et al. observaron que las concentraciones de adiponectina total y de las isoformas de adiponectina eran comparables en AEG y PEG durante el primer año de vida. Estos valores experimentaban, secuencialmente, un ascenso durante los primeros meses de vida, seguido de un descenso al año, mientras que las cifras de leptina –más bajas en recién nacidos PEG- aumentaban durante el primer año de vida con el *catch-up* y se relacionaban con el IMC. Las concentraciones bajas de adiponectina y altas de leptina al año de vida estarían relacionadas con el aumento de adiposidad consecuente al *catch-up* [295]. Hibino et al. encontraron que en lactantes AEG sanos los niveles de adiponectina-APM se mantienen iguales desde el nacimiento hasta los 6 meses mientras que al año disminuyen fisiológicamente y no se relacionan con el IMC; además encuentran una correlación positiva entre los niveles de adiponectina-APM en sangre de cordón y los niveles a los 12 meses reflejando una programación intrauterina de esta adipoquina [296]. El descenso fisiológico de adiponectina durante el primer año estaría relacionado con la ganancia de masa grasa desde el periodo neonatal hasta el año de vida.

En resumen, durante los primeros 4 meses de vida -que representan la fase más dinámica de la expansión del TA (mayor reclutamiento de adipocitos)-, y que se caracterizan por una rápida deposición de lípidos (0,5g/hora) y un aumento de la sensibilidad a la insulina [256] los PEG priorizan la expansión de masa magra sobre la

masa grasa independientemente del tipo de alimentación recibida, por lo cual agravan su déficit de TA subcutáneo. Al año de vida los PEG alimentados con fórmula enriquecida en proteínas presentan mayor expansión del TA en comparación con los PEG que reciben LM, pero este TA contiene pocos adipocitos, produciéndose hipertrofia de los mismos con consecuente disfunción del TA y disminución de las concentraciones de adiponectina-APM. Por el contrario, los lactantes AEG alimentados con LM presentan mayor sensibilidad a la insulina, y reclutan más masa grasa durante los primeros 4 meses para permitir la expansión del TA; al año presentan menos masa grasa y concentraciones normales de adiponectina e IGF-1. Los PEG alimentados con LM durante los primeros 4 meses presentan el mismo déficit de TA que los alimentados con LA, pero tienen concentraciones de IGF-1 y adiponectina-APM similares a los AEG. Al año, los PEG que reciben LM tienen poca masa grasa y niveles normales de IGF-1 y de adiponectina-APM, hecho que demuestra que la LM previene la hipertrofia y disfunción de los escasos adipocitos subcutáneos en PEG.

5.3 BAJO PESO AL NACER Y EVOLUCIÓN A LOS 3-6 AÑOS DE VIDA: resistencia a la insulina, aumento de la grasa hepática y del grosor de la Intima media carotídea

El quinto artículo de esta Tesis (Sebastiani et al. Ped Obes, 2016) demuestra que los niños PEG que realizan un *catch-up* teóricamente adecuado sin desarrollar obesidad [297], presentan alteraciones vasculares y aumento de grasa pre-peritoneal y hepática entre los 3 y 6 años de edad. También presentan aumento de las concentraciones de insulina e IGF-1 y disminución de adiponectina-APM, compatibles con un estado de resistencia a la insulina, ya detectable a la edad de 3 años.

Nuestro grupo ha descrito que entre los 2 y 6 años los niños PEG, en ausencia de obesidad, presentan niveles elevados de IGF-1 e insulina y un exceso de grasa visceral

medida por resonancia magnética [298,299]. En animales de experimentación con restricción del crecimiento fetal, la mayor acción de la insulina en el metabolismo de los AGL podría ser en parte responsable de este aumento de grasa visceral [300]. Nuestro grupo había descrito también que entre los 2 y los 6 años la adiponectina-APM disminuye en niños PEG que realizan *catch-up*, mientras que aumenta el IMC, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), IGF-1, y la masa grasa total y abdominal. La correlación inversa entre insulina y adiponectina-APM no es objetivable hasta los 4 años, siendo más significativa a los 6 años [123]. En el artículo de Sebastiani et al. se confirman estos cambios metabólicos determinados por aumento de HOMA, IGF-1 y disminución de adiponectina-APM en niños PEG de 3 y 6 años con *catch-up* espontáneo. En ausencia de este *catch-up*, los niños PEG son más sensibles a la acción de la insulina, y muestran concentraciones normales de adiponectina-APM, poco TA subcutáneo y una cantidad normal de TA visceral [301]. El estado de resistencia a la insulina ya presente en edades tempranas en PEG se ha relacionado además con alteraciones vasculares. A los 3 y 6 años, los PEG con *catch-up* tienen mayor grosor de la cIMT y a los 6 años, también de la aIMT, ambos marcadores precoces del riesgo cardiovascular. Se ha descrito que los recién nacidos PEG tienen mayor grosor de la cIMT y de la aIMT independientemente del grado de restricción del crecimiento prenatal [233]. Estudios realizados en PEG confirman la existencia de signos de disfunción endotelial ya intraútero, más marcados en fetos con alteración del índice de pulsatilidad [302,303]. Los neonatos PEG pueden presentar alteración de la morfología y función cardíaca y reducción de la distensibilidad arterial, demostrando la precocidad de las alteraciones cardiovasculares, aunque en este estadio son sólo subclínicas [304]. La adaptación fetal a la malnutrición intrauterina, provocaría además de resistencia a la insulina, disminución de la densidad capilar, disfunción endotelial y reducción del número de nefronas [305]. Crispi et al. describieron alteraciones

del funcionalismo cardiaco y aumento del grosor de la cIMT a los 5 años de edad en niños PEG a término o pretérmino [306]. Bradley et al. también encontraron alteraciones precoces en la distensibilidad y elasticidad arterial en PEG preadolescentes [307]. Un artículo muy reciente de Faienza et al. describe alteraciones cardiovasculares y aumento de la cIMT a los 10 años en niños PEG a término definidos como peso o talla $< p3$, resultados que son similares a los de nuestro artículo [308]. En nuestro estudio no encontramos diferencias en la tensión arterial entre grupos, ni asociación con la IMT. Leunissen et al. encontraron un aumento de la cIMT en adultos jóvenes con antecedente de PEG con *catch-up* recuperador, sin encontrar diferencias en la tensión arterial entre AEG y PEG; sin embargo, observaron que el aumento de masa grasa durante la infancia era el factor de riesgo determinante para presentar aumento de tensión arterial sistólica y diastólica, independientemente del peso al nacer. También el peso en la edad adulta era un determinante de la tensión arterial diastólica [309]. En la literatura los resultados son discordantes [310]. Las diferencias en cIMT entre niños PEG y AEG a los 6 años están mayormente relacionadas con los cambios en la grasa visceral y la resistencia a la insulina descritos en pacientes PEG [298,299]. La resistencia a la insulina determinaría un estado pro-inflamatorio y disfunción del TA, promoviendo la secreción de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias responsables de las alteraciones cardiovasculares y de un estado pro-aterogénico [311]. Las concentraciones de insulina predicen la precocidad de las alteraciones arterioescleróticas medidas con la cIMT [312]; además el hiperinsulinismo llevaría a aumento de grasa visceral en niños PEG [313]. La disminución de la ratio TA subcutáneo/TA visceral sería la responsable de la reducción de adiponectina en sujetos con resistencia a la insulina, dado que los adipocitos periféricos (subcutáneos) son los máximos productores de esta adipoquina [314]. La disminución de la adiponectina-APM en niños PEG sería una señal precoz de disfunción del TA y debido a que la adiponectina

tiene propiedades anti-arterioscleróticas *in vitro*, su decremento causaría daño endotelial precoz [315].

El aumento del IMC y de grasa abdominal medida por ecografía se ha relacionado con aumento de la cIMT en niños de 5 años. El aumento del IMC provocaría cambios en la pared arterial como mecanismo de adaptación al aumento de longitud y presión en los vasos sanguíneos. El aumento de grasa visceral provocaría aumento de las citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-6, con efecto directo sobre la función vascular y alteraciones en el endotelio detectables precozmente [316]. Estudios en niños obesos encuentran relación entre grasa abdominal medida por DXA y alteraciones cardiovasculares a los 9 años [317]; además se ha descrito que el acúmulo de grasa visceral se asocia a aumento precoz de marcadores de inflamación como la PCR ultrasensible, que indicaría daño vascular ya detectable a los 3 años de edad [318]. Serían los cambios en el IMC desde la infancia hasta la edad adulta que conllevarían un aumento de la cIMT [319]. Skilton et al. encontraron que la ganancia de peso entre los 0 y 18 meses se asociaba a adiposidad central, aumento de tensión arterial sistólica, de marcadores de inflamación y del grosor de la cIMT a los 8 años [320]. En nuestro estudio encontramos una asociación entre la ganancia de peso entre los 3 y 6 años y la cIMT explicando un 48% de su variabilidad, y no encontramos asociación entre el crecimiento precoz post-natal (0-3 meses) con la cIMT a los 3 y a los 6 años. Evelein et al. encontraron una asociación entre la ganancia de peso en los primeros meses de vida y la cIMT a los 5 años en población sana independientemente del peso al nacer. Además en los niños nacidos con menos peso y con ganancia de peso exagerada en los primeros meses de vida las arterias eran más rígidas y tenían menor distensibilidad [321]. Se conoce que el grosor de la cIMT aumenta y la distensibilidad disminuye según la edad, la altura, el IMC y la tensión arterial sistólica y que la edad es el factor más determinante del

aumento de grosor de la cIMT [322]. El incremento de la cIMT reflejaría un envejecimiento precoz de las arterias (*aging*) en los niños PEG; es decir, estos niños tendrían unas arterias propias de niños de mayor edad.

El aumento de IMC entre los 3-6 años y sus consecuencias metabólicas en niños PEG a los 6 años podría tener relación con el *timing* del rebote adiposo que en la población general ocurre entre los 5 y 7 años [323]. En este estudio se podría especular que la población PEG entre los 3 y 6 años, realizaría un rebote adiposo precoz [324]. El rebote adiposo precoz antes de los 5 años se ha relacionado con resistencia a la insulina, aumento de adiposidad y riesgo metabólico ya a partir de la edad de 7 años [325].

El aumento de IMC a expensas de la grasa visceral en niños PEG jugaría un papel fundamental en las complicaciones cardio-metabólicas descritas en este estudio. La grasa pre-peritoneal que representa una medida de grasa visceral se encuentra aumentada en niños PEG comparados con los AEG a los 6 años y se correlaciona positivamente con la cIMT. El punto de corte de la medida de esta grasa en niños es de 4 mm [326]. Tadokoro et al. describieron que el aumento de grasa pre-peritoneal se asociaba a disminución de adiponectina en varones puberales; estos resultados concuerdan con los resultados de nuestro estudio [327].

Cuando existe aumento de grasa visceral y disfunción precoz del TA subcutáneo por falta de expansión y fallo en el almacenamiento del exceso de lípidos, se genera un aumento del flujo de ácidos grasos en la circulación portal hepática que contribuye directamente a la disminución de la sensibilidad a la insulina a nivel hepático, estimulando la producción de colesterol y glucosa y aumentando la producción hepática de VLDL. Este mecanismo llevaría a cambios estructurales en el hígado y sería clave en la patogénesis de la NASH [328]. En nuestro estudio encontramos aumento de los lípidos intrahepáticos medidos por Resonancia Magnética. En las biopsias se definen cambios en la grasa hepática cuando

más del 5% de los hepatocitos tienen lípidos; si el porcentaje es más del 25% se habla de hígado graso. Por ecografía y resonancia se definen cambios en la grasa hepática si más del 10% de los hepatocitos contienen lípidos, y se habla de hígado graso si tienen más del 30% aunque los valores son muy variables según las poblaciones, especialmente en niños obesos [327]. El aumento de los lípidos intrahepáticos encontrado en nuestro estudio en PEG a los 6 años estaría relacionado con su perfil metabólico desfavorable y la hipoadiponectinemia. Si existe una disfunción del TA y los pocos adipocitos se vuelven hipertróficos, la grasa en exceso se acumula en musculo esquelético e hígado con consecuente empeoramiento de la acción de la insulina, y de la tolerancia a la glucosa; la reducida capacidad adipogénica del TA subcutáneo conlleva el acúmulo de grasa visceral con mayor producción de adipocinas pro-inflamatorias y menos adiponectina; disminución de la oxidación de ácidos grasos en el hígado y desarrollo de hígado graso [328,329].

La falta de expansión del TA durante los primeros meses de vida postnatal es clave para todas las complicaciones descritas en PEG durante la primera infancia, especialmente en los PEG que reciben alimentación hipercalórica, experimentando una disfunción del TA con aumento de grasa visceral, resistencia a la insulina, aumento de lípidos intrahepáticos y del grosor de la IMT, resultando en un perfil cardio-metabólico más desfavorable.

5.4 PUNTOS FUERTES Y LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS

El estudio de Sebastiani et al. Ped Obes, 2012, es el primero en el que se ha determinado la concentración de folistatina en sangre de cordón y se han relacionado estos valores con la composición corporal neonatal. Entre las limitaciones se encuentran la ausencia de medición de folistatina en sangre materna y de otras proteínas de la superfamilia de la TGF- β como la activina, la miostatina y la FSL-3 en el recién nacido. En el artículo de de

Zegher et al. Diabetes Care 2012, se estudian por primera vez las concentraciones de Pref-1 en recién nacidos y mujeres embarazadas. Una limitación es la falta de medición del Pref-1 transmembrana o placentario.

Los estudios reportados en los artículos de de Zegher et al. Diabetes, 2012 y de Zegher et al. JCEM, 2013 son los primeros que describen la influencia del tipo de alimentación sobre el perfil endocrino-metabólico y la composición corporal de manera aleatorizada, prospectiva y longitudinal a los 4 y 12 meses, en niños PEG. Los niños PEG alimentados con LA se dividieron en dos grupos según el tipo de fórmula utilizada (LA1 y LA2) y se compararon con dos grupos control: AEG y PEG alimentados con LM. Entre las limitaciones se encuentra el hecho de que no se midió la grasa visceral y que el número de pacientes PEG del grupo LA2 era menor. En el artículo de Zegher et al. JCEM, 2013 no fue posible determinar si las diferencias encontradas entre los PEG alimentados con LA1 o LA2 dependen exclusivamente de las fórmulas utilizadas o también influye la alimentación complementaria entre los 4 y 12 meses.

En el artículo de Sebastiani et al. Ped Obes, 2016 los puntos fuertes incluyen su naturaleza longitudinal, la utilización de criterios de inclusión estrictos que favorecen que la edad de los participantes sea muy similar, y la utilización de los mismos métodos y el mismo personal investigador. Entre las limitaciones se encuentran el relativamente escaso número de participantes, la ausencia de cuantificación de grasa hepática (por resonancia magnética) y de aIMT a los 3 años, y la no inclusión de pacientes PEG sin *catch-up* para estudio comparativo.

6. CONCLUSIONES

6.1. Los recién nacidos PEG presentan un perfil metabólico más insulino-sensible, caracterizado por concentraciones bajas de insulina e IGF-1; además, presentan niveles bajos de adiponectina-APM. Estos parámetros están relacionados con el crecimiento fetal y con el escaso TA que presentan al nacer. En sangre de cordón tienen concentraciones elevadas de Pref-1, un potente inhibidor de la adipogénesis, y aumento de folistatina que estimula la hipertrofia muscular, intenta compensar la escasa adipogénesis, y aumenta la sensibilidad a la insulina. Este perfil insulino-sensible prepara a los niños PEG para el *catch-up*.

6.2. Durante los primeros 4 meses de vida los niños PEG empeoran su déficit de TA durante el periodo crítico de máxima expansión del mismo, por lo cual presentan un desarrollo escaso de TA, independientemente de la alimentación recibida. Los niveles de Pref-1 disminuyen a los 4 meses indicando un aumento de los adipocitos maduros, aunque el número de éstos permanece escaso. Los PEG alimentados con LA presentan valores altos de adiponectina-APM e IGF-1 que estimularían el reclutamiento de adipocitos como respuesta a la escasa expansión del TA en condiciones de ingesta hipercalórica.

6.3. Al año, los niños PEG alimentados con LA enriquecida en proteínas presentan un perfil endocrino-metabólico más desfavorable que los AEG o los PEG alimentados con LM. Estos niños presentan un patrón de resistencia a la insulina, aumento de la masa grasa y disminución de las concentraciones de adiponectina-APM. El aumento de masa grasa estaría relacionado con la expansión del TA en respuesta a una dieta hipercalórica, pero contiene escasos adipocitos, lo que condiciona una hipertrofia de los mismos y su consecuente disfunción, que causará lipotoxicidad e hipoadiponectinemia.

6.4. Entre los 3 y 6 años los niños PEG que han realizado *catch-up* espontáneo tienen un perfil cardio-metabólico más desfavorable: siguen mostrando resistencia a la insulina - determinado por un mayor índice HOMA-IR, concentraciones más bajas de adiponectina-APM y mayor grosor de la cIMT, marcador precoz de riesgo cardiovascular. A los 6 años persiste el patrón de resistencia a la insulina y aparecen los primeros signos de lipotoxicidad, específicamente el aumento de grasa visceral y hepática. Estas alteraciones se acompañan de disfunción endotelial, con aumento de grosor de la cIMT y aIMT.

6.5. Las alteraciones ya presentes en PEG en edades tempranas de la vida causarían complicaciones metabólicas y vasculares con consecuente evolución hacia el SM y la diabetes tipo 2. La LM que evitaría el *catch-up* rápido y excesivo durante los primeros meses de vida y la disfunción del TA, sería fundamental en etapas precoces de la vida post-natal para prevenir esta evolución. La prevención de la obesidad fomentando el ejercicio y una alimentación sana y equilibrada durante los primeros años de vida serían fundamentales para prevenir las complicaciones metabólicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:804-810.
2. Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204:288-300.
3. Hoffman C, Galan HL. Assessing the “at-risk” fetus: Doppler ultrasound. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21:161-166.
4. Bamfo JE, Odibo AO. Diagnosis and Management of Fetal Growth Restriction. *J Pregnancy.* 2011; 2011: 640715
5. American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2013; 121:1122-1133.
6. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FMO'Donoghue K, Hunter A, Morrison JJ, Burke G, Dicker P, Tully EC, Malone FD. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 208: 290.e1–290.e6
7. Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 2004; 9:419–425.
8. Roig MD, García-Algar O. Restricted intrauterine growth: a problem of definition or content? *An Pediatr (Barc).* 2011; 75:157-160.
9. Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics & Gynecology.* 2002; 99: 490–496.

10. Brodsky D, Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2004; 19:307–319.
11. Collett-Solberg PF, Cohen P. Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine*. 2000; 12:121–136.
12. Chard T. Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regul*. 1994; 4:91–100.
13. Han VK, Bassett N, Walton J, Challis JR. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 2680-93
14. Randhawa R, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab*. 2005; 86:84-90. Review.
15. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res*. 2006; 65 (Suppl.3):50 e8.
16. Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, van Duijn C, de Ridder M, Savage M, Clark A. Polymorphism in the IGF-I gene: clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2720.
17. Kumar N, Leverence J, Bick D, Sampath V. Ontogeny of growth-regulating genes in the placenta. *Placenta*. 2012; 33:94-99.
18. Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta—a review. *Placenta*. 2005; 26(Suppl A):S10e20.
19. Rinaudo P, Wang E. Fetal programming and metabolic Syndrome. *Annu Rev Physiol*. 2012; 74:107-130

20. Srinivasan M, Patel MS. Metabolic programming in the immediate postnatal period. *Trends Endocr Metab.* 2008; 19:146-152
21. Chan JC, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS, Yoon KH, Hu FB. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA.* 2009; 301:2129–2140.
22. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311:171–174.
23. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989; 2:577-580.
24. Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmons SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ.* 1990; 301: 259-262.
25. Forsén T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. *Ann Intern Med.* The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. 2000; 133:176-82.
26. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ.* 1999; 318(7181):427-431.
27. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006; 23:469-480.
28. Bacha F, Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Comparison of different definitions of pediatric metabolic syndrome: relation to abdominal adiposity, insulin resistance, adiponectin, and inflammatory biomarkers. *J Pediatr.* 2008; 152:177-184.

29. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J*. 2004; 68:975-981.
30. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the US. *Diabetes Care*. 2005; 28:2745–2749.
31. De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2004; 110:2494–2497.
32. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*. 2004; 350:2362–2374.
33. Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, Wolf H, Berg C, Rigano S, Germer U, Moyano D, Turan S, Hartung J, Bhide A, Müller T, Bower S, Nicolaides KH, Thilaganathan B, Gembruch U, Ferrazzi E, Hecher K, Galan HL, Harman CR. Predictors of neonatal outcome in early-onset placental dysfunction. *Obstet Gynecol*. 2007; 109:253–261.
34. Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*. 2001; 50:2279–2286.
35. Lane RH, Kelley DE, Gruetzmacher EM, Devaskar SU. Uteroplacental insufficiency alters hepatic fatty acid-metabolizing enzymes in juvenile and adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280:183–190.
36. Selak MA, Storey BT, Peterside I, Simmons RA. Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:130–137

37. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2008; 37:635–646
38. Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, Nave BT. Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:534–539.
39. Wit JM, Boersma B. Catch-up growth: definition, mechanisms, and models. *Pediatr Endocrinol Metab.* 2002; 15 (Suppl 5):1229-1241.
40. Gafni RI, Baron J. Catch-up growth: possible mechanisms. *Pediatr Nephrol.* 2000; 14:616-619
41. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL. Children born small for gestational age: do they catch-up? *Pediatr Res.* 1995; 38: 267-271.
42. Ekelund U, Ong KK, Linné Y, Neovius M, Brage S, Dunger DB, Wareham NJ, Rössner S. Association of weight gain in infancy and early childhood with metabolic risk in young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:98-103.
43. Nobili V, Alisi A, Panera N, Agostoni C. Low birth weight and catch-up-growth associated with metabolic syndrome: a ten year systematic review. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2008; 6:241-247.
44. Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol.* 1992; 99:154–158.
45. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001; 60:5–20.

46. Nair L, Nair MK, Chacko DS. Markers of fetal onset adult diseases. *Indian paediatrics*. 2009; 46, s48–s54.
47. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low-birth weight with diabetes and vascular disease. *Lancet*. 1999; 353 (9166): 1789–1792.
48. Jaquet D, Leger J, Czernichow P, Levy-Marchal C. The effect of in-utero undernutrition on the insulin resistance syndrome. *Current diabetes reports*. 2002; 2:77–82.
49. Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:1401-1406.
50. Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Dunger D; ALSPAC Study Team. Circulating IGF-1 levels in childhood are related to both current body composition and early postnatal growth rate. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1041-1044.
51. Ong KK, Petry CJ, Emmett PM, Sandhu MS, Kiess W, Hales CN, Ness AR, Dunger DB; ALSPAC study team. Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. *Diabetologia*. 2004; 47:1064-1070.
52. Soto N, Bazaes RA, Peña V, Salazar T, Avila A, Iñiguez G, Ong KK, Dunger DB, Mericq MV. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:3645-3650.
53. Mericq V, Ong KK, Bazaes R, Peña V, Avila A, Salazar T, Soto N, Iñiguez G, Dunger DB. Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. *Diabetologia*. 2005; 48:2609-2614.

54. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1548-1555.
55. Iñiguez G, Ong K, Bazaes R, Avila A, Salazar T, Dunger D, Mericq V. Longitudinal changes in insulin-like growth factor-I, insulin sensitivity, and secretion from birth to age three years in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:4645-4649.
56. Liu W, Chin-Chance C, Lee EJ, Lowe WL Jr. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase contributes to insulin-like growth factor I-mediated inhibition of pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 2002; 143:3802-3812.
57. Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, Chernausek SD, Mejia W, Le Roith D. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes.* 2001; 50:1110-1118.
58. Dunger D, Yuen K, Ong K. Insulin-Like Growth Factor 1 and Impaired Glucose Tolerance. *Horm Res.* 2004; 62 (suppl 1):101–107
59. Johnston LB, Dahlgren J, Leger J, Glander L, Savage MO, Czernichow P, Albertsson-Wikland K, Clark AJ. Association between insulin like growth factor I (IGF-I) polymorphisms, circulating IGF-I, and pre- and postnatal growth in two European small for gestational age populations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:4805–4810.
60. Lévy-Marchal C, Czernichow P. Small for gestational age and the metabolic syndrome: which mechanism is suggested by epidemiological and clinical studies? *Horm Res.* 2006; 65 (Suppl 3):123-130.
61. Jain V, Singhal A. Catch up growth in low birth weight infants: Striking a healthy balance. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012; 13:141–147.

62. Dennison BA, Edmunds LS, Stratton HH, Pruzek RM. Rapid infant weight gain predicts childhood overweight. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14:491–499.
63. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Deanfield J, Lucas A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*. 2004 9; 109:1108-1113.
64. Botton J, Heude B, Maccario J, Ducimetière P, Charles MA; FLVS Study Group. Postnatal weight and height growth velocities at different ages between birth and 5 years and body composition in adolescent boys and girls. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1760–1768.
65. Chomtho S, Wells JC, Williams JE, Davies PS, Lucas A, Fewtrell MS. Infant growth and later body composition: evidence from the 4-component model. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1776–1784.
66. Gillman MW. Early infancy as a critical period for development of obesity and related condition. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2010; 65: 13–24.
67. Jimenez-Chillaron JC, Patti ME. To catch up or not to catch up: is this the question? Lessons from animal models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007; 14:23-29. Review
68. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013; 9:191-200.
69. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2005; 40: 229-242.
70. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppänen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet*. 2007; 27;3:e64

71. Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP. Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(suppl 2):S46–S57.
72. Rasmussen EL, Malis C, Jensen CB, Jensen JE, Storgaard H, Poulsen P, Pilgaard K, Schou JH, Madsbad S, Astrup A, Vaag A. Altered fat tissue distribution in young adult men who had low birth weight. *Diabetes Care.* 2005; 28:151–153
73. Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* 2005; 48:547–552.
74. Dulloo AG, Jacquet J. An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25(suppl 5):S22–S29.
75. Cettour-Rose P, Samec S, Russell AP, Summermatter S, Mainieri D, Carrillo-Theander C, Montani JP, Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG. Redistribution of glucose from skeletal muscle to adipose tissue during catch-up fat: a link between catch-up growth and later metabolic syndrome. *Diabetes.* 2005; 54:751–756.
76. Rosenwald M, Perdikari A, Rülcke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 659–667.
77. Dulloo AG. Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: a thrifty phenotype that predisposes individuals with Catch-Up growth to insulin resistance and obesity. *Horm Res* 2006; 65(suppl 3):90–97
78. Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance following catch-up weight gain in low birth weight children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:2153-2158.
79. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol.* 2008; 23: e237

80. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest.* 2007; 117:2621-2637.
81. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1796-1808.
82. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner HJ. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:1023-1033.
83. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008; 453:783-787.
84. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome- An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801:338-349.
85. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* 2002; 45:1201-1210.
86. Kuzawa CW. Adipose Tissue in human infancy and childhood: an evolutionary perspective. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1998; (Suppl 27):177-209
87. Muhlhausler B, Smith SR. Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20:51-57. Review

88. Padoan A, Rigano S, Ferrazzi E, Beaty BL, Battaglia FC, Galan HL. Differences in fat and lean mass proportions in normal and growth-restricted fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191:1459-1464.
89. Crescenzo, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG. A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes.* 2003; 52:1090-1097.
90. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.* 2004; 14:589-600.
91. Cinar N, Gurlek A. Association between novel adipocytokines adiponectin, vaspin, visfatin, and thyroid: An experimental and clinical update. *Endocr Connect.* 2013; 2:R30-38.
92. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:85-97.
93. Wang B, Wood IS, Trayhurn P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch.* 2007; 455:479-492.
94. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116:1793-801. Review. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006; 116:2308.
95. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1796-1808.
96. McGee KC, Harte AL, da Silva NF, Al-Daghri N, Creely SJ, Kusminski CM, Tripathi G, Levick PL, Khanolkar M, Evans M, Chittari MV, Patel V, Kumar S, McTernan PG. Visfatin is regulated by rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus and

- influenced by NF κ B and JNK in human abdominal subcutaneous adipocytes. *PLoS One*. 2011; 6:e20287
97. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008; 14:222-231.
 98. Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Collin D, Czernichow P, Levy-Marchal C. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia*. 2005; 48:849–855.
 99. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012; 55:2319-2326.
 100. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1595–1599.
 101. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:1930–1935
 102. Turer AT, Khera A, Ayers CR, Turer CB, Grundy SM, Vega GL, Scherer PE. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia*. 2011; 54:2515–2524
 103. Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G, Wheeler MB. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *J Biol Chem* 2010; 285:33623–33631

104. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rutkowski JM, Wade MR, Tenorio VM, Kuo MS, Brozinick JT, Zhang BB, Birnbaum MJ, Summers SA, Scherer PE. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med.* 2011; 17:55–63
105. Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia.* 2005; 48:132–139
106. Chen MB, McAinch AJ, Macaulay SL, Castelli LA, O'brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE, Steinberg GR. Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:3665–3672
107. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279:30817–30822
108. Miller RA, Chu Q, Le Lay J, Scherer PE, Ahima RS, Kaestner KH, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest.* 2011; 121:2518–2528
109. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2011 ; 60:313–326
110. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in

- metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest.* 2007; 117:2621–2637
111. Matsuzawa Y, Shimomura I, Kihara S, Funahashi T. Importance of Adipocytokines in Obesity-Related Diseases. *Horm Res.* 2003; 60 (suppl 3):56–59
112. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002; 277:25863–25866
113. McCourt HJ, Hunter SJ, Cardwell CR, Young IS, Murray LJ, Boreham CA, McEneaney J, Woodside JV, McKinley MC. Adiponectin multimers, body weight and markers of cardiovascular risk in adolescence: Northern Ireland Young Hearts Project. *Int J Obes (Lond).* 2013; 37:1247-1253.
114. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2006; 29:1357-1362
115. Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, et al. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:4053-4061.
116. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Asayama K, Shirahata A. High molecular weight, rather than total, adiponectin levels better reflect metabolic abnormalities associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:5113-5116.
117. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 219: 9–15.

118. Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, Fukushima M, Nakamura T, Kuroe A, Nakai Y, Ishibashi S. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2003; 52:1274–1278.
119. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005; 6: 13–21
120. Kotani Y, Yokota I, Kitamura S, Matsuda J, Naito E, Kuroda Y. Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clin Endocrinol*. 2004; 61, 418–423.
121. Chan TF, Yuan SS, Chen HS, Guu CF, Wu LC, Yeh YT, Chung YF, Jong SB, Su JH. Correlations between umbilical and maternal serum adiponectin levels and neonatal birthweights. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004; 83: 165–169.
122. Dunger D, Ong K. Abundance of adiponectin in the newborn. *Clin Endocrinol*. 2004; 61: 416–417
123. Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Angulo M, Sebastiani G, de Zegher F. High-molecular-weight adiponectin in children born small- or appropriate-for-gestational-age. *J Pediatr*. 2009; 155:740-742.
124. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T & Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269:540–543.
125. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998; 395: 535–547.
126. De Graaf C, Bloom WA, Smeets, PA, Stafleu A, Hendriks HF. Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 946–961.

127. Shea SA, Hilton MF, Orlova C, Ayers RT, Mantzoros CS. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 2537–2544.
128. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 1730–1736.
129. Mantzoros M, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno T, Kim SY, Ole-Petter R, Hamnvik OP, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301: E567–E584.
130. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1409–1421.
131. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294:E827–E832.
132. Pombo M, Pombo CM, Garcia A, Caminos E, Gualillo O, Alvarez CV, Casanueva FF, Dieguez C. Hormonal control of growth hormone secretion. *Horm Res.* 2001; 55 (Suppl 1): 11–16.
133. Khan A, Narangoda S, Ahren B, Holm C, Sundler F, Efendic S. Long-term leptin treatment of ob/ob mice improves glucose-induced insulin secretion. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25: 816–821.
134. Ahren B, Havel PJ. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1999; 277: R959–R966.
135. German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh IS, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ Jr, Schwartz MW, Morton GJ. Leptin activates a novel CNS

- mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology*. 2011; 152: 394–404.
136. Ceddia RB, William WN Jr, Curi R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999; 23: 75–82.
137. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283: E187–E192.
138. Moon HS, Matarese G, Brennan AM, Chamberland JP, Liu X, Fiorenza CG, Mylvaganam GH, Abanni L, Carbone F, Williams CJ, De Paoli AM, Schneider BE, Mantzoros CS. Efficacy of metreleptin in obese patients with type 2 diabetes: cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes*. 2011; 60:1647–1656.
139. Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Leptin activates human B cells to secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38 MAPK/ERK 1/2 signaling pathway. *J Clin Immunol*. 2011; 31:472–478.
140. Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H, Hauguel-de Mouzon S. Prenatal leptin production evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:2409–2413.
141. Matsuda J, Yokota I, Iida M, Murakami T, Naito E, Ito M, Shima K, Kuroda Y. Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82:1642-1644.
142. Karakosta P, Chatzi L, Plana E, Margioris A, Castanas E, Kogevinas M. Leptin levels in cord blood and anthropometric measures at birth: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2011; 25:150-163.

143. Iniguez G, Soto N, Avila A, Salazar T, Ong K, Dunger D, Mericq V. Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:5500–5503.
144. Kaar JL, Brinton JT, Crume T, Hamman RF, Glueck DH, Dabelea D. Leptin levels at birth and infant growth: the EPOCH study. *J Dev Orig Health Dis.* 2014; 5:214-218.
145. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology.* 2005; 146:4211-4216.
146. Hernandez MI, Rossel K, Peña V, Cavada G, Avila A, Iñiguez G, Mericq V. Leptin and IGF-I/II during the first weeks of life determine body composition at 2 years in infants born with very low birth weight. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012; 25:951-955.
147. Ibáñez L, Sebastiani G, Diaz M, Gómez-Roig MD, López-Bermejo A, de Zegher F. Low body adiposity and high leptinemia in breast-fed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr.* 2010; 156:145–147.
148. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1796–1808.
149. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity–diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest.* 1994; 94:1543–1549.
150. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D’Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002; 105: 804–809.

151. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS, Grinspoon SK. TNF- α antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: E146–E150.
152. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB Journal.* 2003; 17: 884–886.
153. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003; 278: 13740–13746.
154. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001; 286: 327–334.
155. Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 8282–8286.
156. Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297:E157–E164.
157. 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: 3586–3597.

158. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997; 387:83–90.
159. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:9306–9311.
160. Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol*. 2010; 24:1998–2008
161. Singh R, Bhasin S, Braga M, Artaza JN, Pervin S, Taylor WE, Krishnan V, Sinha SK, Rajavashisth TB, Jasuja R. Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signalling pathways. *Endocrinology*. 2009; 150: 1259–1268.
162. Gajos-Michniewicz A, Piastowska AW, Russell JA, Ochedalski T. Follistatin as a potent regulator of bone metabolism. *Biomarkers*. 2010; 15: 563–574.
163. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003; 23:7230–7242
164. Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, Dungner E, Wahlen K, Decaunes P, Rydén M, Björklund P, Arver S, Bhasin S, Bouloumie A, Arner P, Dahlman I. Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 3003–3009.
165. Braga M, Reddy ST, Vergnes L, Pervin S, Grijalva V, Stout D, David J, Li X, Tomasian V, Reid CB, Norris KC, Devaskar SU, Reue K, Singh R. Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism. *J Lipid Res*. 2014; 55:375-384.

166. Brandt C, Hansen RH, Hansen JB, Olsen CH, Galle P, Mandrup-Poulsen T, Gehl J, Pedersen BK, Hojman P. Over-expression of Follistatin-like 3 attenuates fat accumulation and improves insulin sensitivity in mice. *Metabolism*. 2015; 64:283-295.
167. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 1993; 73:725-734
168. Wang Y, Sul HS. Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 5421-5435.
169. Wang Y, Sul HS. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab*. 2009; 9:287–302.
170. Kim KA, Kim JH, Wang Y, Sul HS. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 2294–2308.
171. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5585–5592.
172. Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim KH, Lee S, Kang C, Sul HS. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest*. 2003; 111: 453–461.
173. O’Connell J, Lynch L, Hogan A, Cawood TJ, O’Shea D. Preadipocyte Factor-1 Is Associated with Metabolic Profile in Severe Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:E680-684.
174. Lee SH, Rhee M, Yang HK, Ha HS, Lee JH, Kwon HS, Park YM, Yim HW, Kang MI, Lee WC, Son HY, Yoon KH. Serum preadipocyte factor 1

- concentrations and risk of developing diabetes: a nested case-control study. *Diabet Med.* 2016; 33:631-8.
175. Alisi A, Locatelli M, Nobili V. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13: 397–402.
176. Van Straten EM, Bloks VW, Huijkman NC, Baller JF, van Meer H, Lütjohann D, Kuipers F, Plösch T. The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298: R275-R282
177. Ibáñez L, Suárez L, Lopez-Bermejo A, Díaz M, Valls C, de Zegher F. Early development of visceral fat excess after spontaneous catch-up growth in children with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:925-928.
178. Rasmussen EL, Malis C, Jensen CB, Jensen JE, Storgaard H, Poulsen P, Pilgaard K, Schou JH, Madsbad S, Astrup A, Vaag A: Altered fat tissue distribution in young adult men who had low birth weight. *Diabetes Care.* 2005; 28: 151–153.
179. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology.* 2002; 35: 367– 372.
180. Faienza MF, Brunetti G, Ventura A, D'Aniello M, Pepe T, Giordano P, Monteduro M, Cavallo L. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Prepubertal Children Born Small for Gestational Age: Influence of Rapid Weight Catch-Up. *Growth Horm Res Paediatr.* 2013; 79:103-109.
181. Garg A, Misra A: Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3019–3022.
182. Alisi A, Panera N, Agostoni C, Nobili V. Intrauterine Growth Retardation and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *International Journal of Endocrinology.* 2011; 2011: 269853.

183. Baird J, Fisher D, Lucas P, Kleijnen J, Roberts H, Law C. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ*. 2005; 331:929–931.
184. Monteiro PO, Victora CG. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life—a systematic review. *Obes Rev*. 2005; 6:143–154.
185. Ekelund U, Ong K, Linne Y, Neovius M, Brage S, Dunger DB, Wareham NJ, Rössner S. Upward weight percentile crossing in infancy and early childhood independently predicts fat mass in Young adults: the Stockholm Weight Development Study (SWEDES). *Am J Clin Nutr*. 2006; 83:324–330.
186. Demerath EW, Choh AC, Czerwinski SA, Lee M, Sun SS, Chumlea WC, Duren D, Sherwood RJ, Blangero J, Towne B, Siervogel RM. Genetic and environmental influences on infant weight and weight change: The Fels longitudinal study. *Am J Hum Biol*. 2007; 19:692–702.
187. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*. 2012; 94:2242-2263.
188. Bouret SG. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behaviour and hypothalamic development. *J Nutr*. 2010; 140: 653–649.
189. Karaolis-Danckert N, Buyken AE, Kulig M, Kroke A, Forster J, Kamin W, Schuster A, Hornberg C, Keil T, Bergmann RL, Wahn U, Lau S. How pre- and postnatal risk factors modify the effect of rapid weight gain in infancy and early childhood on subsequent fat mass development: results from the Multicenter Allergy Study 90. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1356–1364.
190. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Davey Smith G, Gillman MW, Cook DG. The effect of breast-feeding on mean body mass index throughout life: a quantitative review of published and unpublished observational evidence. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82: 1298–1307.

191. Bartok C, Ventura AK. Mechanisms underlying the association between breastfeeding and obesity. *Int J Pediatr Obesity*. 2009; 4: 196–120.
192. Singhal A, Sadaf Farooqi I, O’Rahilly S, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75: 993–999.
193. Singhal A, Lanigan J. Breastfeeding, early growth and later obesity. *Obes Rev*. 2007; 8(suppl 1):51– 54.
194. Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Oggero R. Can hormones contained in mothers’ milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? *Clin Endocrinol*. 2009; 71: 757–765.
195. Durmuş B, Ay L, Duijts L, Moll HA, Hokken-Koelega AC, Raat H, Hofman A, Steegers EA, Jaddoe VW. Infant diet and subcutaneous fat mass in early childhood: the Generation R Study. *Eur J Clin Nutr*. 2012; 66:253-260.
196. Harder T, Bergmann RL, Kallischnigg G, Plagemann A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2005; 162: 397–403.
197. De Kroon M, Renders C, Buskermolen M, Van Wouwe J, van Buuren S, Hirasing R. The Terneuzen Birth Cohort: longer exclusive breastfeeding duration is associated with leaner body mass and a healthier diet in young adulthood. *BMC Pediatr*. 2011; 11:33.
198. Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, Zhao J, Schinnar R, Nelson SE, Ziegler EE, Strom BL. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation*. 2005; 111:1897-1903.
199. Druet C, Ong KK. Early childhood predictors of adult body composition. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metabol*. 2008; 22:489-502.

200. Oddy WH, Mori TA, Huang RC, Marsh JA, Pennell CE, Chivers PT, Hands BP, Jacoby P, Rzehak P, Koletzko BV, Beilin LJ. Early infant feeding and adiposity risk: from infancy to adulthood. *Ann Nutr Metab.* 2014; 64:262-270.
201. Lucas A. Programming not metabolic imprinting. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 602.
202. Agostoni C. Early nutrition and programming: too little, too much, or ?- *Pediatr Res.* 2003; 54:151.
203. Hoppe C, Udam TR, Lauritzen L, Molgaard C, Juul A, Michaelsen KF. Animal protein intake, serum insulin-like growth factor I, and growth in healthy 2.5-y-old Danish children. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:447–452
204. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Kennedy K, Stephenson T, Elias-Jones A, Lucas A. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? *Circulation.* 2007; 115:213-220.
205. Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, Fewtrell M, Cole TJ, Stephenson T, Elias-Jones A, Weaver LT, Ibhanebhor S, MacDonald PD, Bindels J, Lucas A. Nutrition in infancy and long-term risk of obesity: evidence from 2 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2010; 92:1133–1144
206. Weber M, Grote V, Closa-Monasterolo R, Escribano J, Langhendries J-P, Dain E, Giovannini M, Verduci E, Gruszfeld D, Socha P, Koletzko B. European Childhood Obesity Trial Study Group. Lower protein content in infant formula reduces BMI and obesity risk at school age: follow-up of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99:1041-1051.
207. Abrams SA, Hawthorne KM, Pammi M. A systematic review of controlled trials of lower-protein or energy-containing infant formulas for use by healthy full-term infants. *Adv Nutr.* 2015; 6:178-6188.

208. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ*. 2001; 322: 949–953.
209. Crispi F, Hernandez-Andrade E, Pelsers M, Plasencia W, Benavides-Serralde JA, Eixarch E, Le Noble F, Ahmed A, Glatz JF, Nicolaides KH, Gratacos E. Cardiac dysfunction and cell damage across clinical stages of severity in growth-restricted fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: 254. e1-8.
210. Comas M, Crispi F, Cruz-Martinez R, Figueras F, Gratacos E. Tissue Doppler echocardiographic markers of cardiac dysfunction in small-for-gestational age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 205: 57.e1–6.
211. Girsén A, Ala-Kopsala M, Makikallio K, Vuolteenaho O, Rasanen J. Cardiovascular hemodynamics and umbilical artery N-terminal peptide of pro B-type natriuretic peptide in human fetuses with growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007; 29:296-303.
212. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2013; 304: H1585–H1597.
213. Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci Lond*. 2008; 114: 1–17.
214. Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol*. 2004; 180:1–16.
215. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*. 2011; 91: 827–887.

216. Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1802–1809.
217. Leunissen RW, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken- Koelega A. Timing and tempo of first year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood. *JAMA.* 2009; 301: 2234–2242.
218. Fabricius-Bjerre S, Jensen RB, Færch K, Larsen T, Mølgaard C, Michaelsen KF, Vaag A, Greisen G. Impact of birth weight and early infant weight gain on insulin resistance and associated cardiovascular risk factors in adolescence. *PLoS One.* 2011; 6: e20595.
219. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10:265–227
220. Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes.* 2004; 53:2735-2740.
221. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2011; 365:213– 221.
222. Stein JH, Korcarz CE, Post WS. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: summary and discussion of the American Society of Echocardiography consensus statement. *Prev Cardiol.* 2009; 12:34-38. Review.
223. Järvisalo MJ, Jartti L, Näntö-Salonen K, Irjala K, Rönnemaa T, Hartiala JJ, Celermajer DS, Raitakari OT. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation.* 2001; 104:2943-2947.

224. McCloskey K, Vuillermin P, Ponsonby AL, Cheung M, Skilton MR, Burgner D. Aortic intima-media thickness measured by trans-abdominal ultrasound as an early life marker of subclinical atherosclerosis. *Acta Paediatr.* 2014; 103:124–130.
225. Sarkola T, Manhiot C, Slorach C, Bradley TJ, Hui W, Mertens L, Redington A, Jaeggi E. Evolution of the arterial structure and function from infancy to adolescence is related to anthropometric and blood pressure changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:2516-2524
226. Pesonen E, Kaprio J, Martimo P, Ruismaki A. Topography of intimal thickening in the left coronary artery of children compared with the topography of atherosclerosis. *Coron Artery Dis.* 1996; 7:459–465.
227. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997; 100:2680 –2690.
228. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Daniels SR, Hayman L, Jacobson M, Mahoney L, Mietus-Snyder M, Rocchini A, Steinberger J, McCrindle B; American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension.* 2009; 54:919-950.
229. Skilton MR, Evans N, Griffiths KA, Harmer JA, Celermajer DS. Aortic wall thickness in newborns with intrauterine growth restriction. *Lancet* 2005; 365:1484–1486.

230. Koklu E, Ozturk MA, Gunes T, Akcakus M, Kurtoglu S. Is increased intima-media thickness associated with preatherosclerotic changes in intrauterine growth restricted newborns? *Acta Paediatr.* 2007; 96:1858.
231. Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, Fanos V, Zaninotto M, Visentin S, Cavallin F, Trevisanuto D, Cosmi E. Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic Wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. *Kidney Int.* 2011; 80:119–123.
232. Shimizu T, Fujii T, Iwasaki J, Nakano Y, Sakurai M, Miura F, Dobashi K, Mizuno K, Itabashi K. Abdominal aortic intima-media thickness in preschool children born preterm. *Pediatr Cardiol.* 2014; 35: 121–125.
233. Stergiotou I, Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Cruz-Lemini M, Bijmens B, Gratacos ET. Aortic and carotid intima-media thickness in term small-for-gestational-age newborns and relationship with prenatal signs of severity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014; 43:625-631.
234. Crispi F, Figueras F, Cruz-Lemini M, Bartrons J, Bijmens B, Gratacos E. Cardiovascular programming in children born small for gestational age and relationship with prenatal signs of severity. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207:121.e1-9.
235. Trevisanuto D, Avezzù F, Cavallin F, Doglioni N, Marzolo M, Verlato F, Zanardo V. Arterial wall thickness and blood pressure in children who were born small for gestational age: correlation with umbilical cord high-sensitivity C-reactive protein. *Arch Dis Child.* 2010; 95:31-34.
236. Ibañez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, Díaz M, Gómez-Roig MD, De Zegher F. Gender Specificity of Body Adiposity and Circulating Adiponectin, Visfatin, Insulin, and Insulin Growth Factor-I at Term Birth: Relation to Prenatal Growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:2774–2778.

237. Verkauskiene R, Beltrand J, Claris O, Chevenne D, Deghmoun S, Dorgeret S, Alison M, Gaucherand P, Sibony O, Lévy-Marchal C. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157:605-612.
238. Bazaes RA, Salazar TE, Pittaluga E, Peña V, Alegría A, Iñiguez G, Ong KK, Dunger DB, Mericq MV. Glucose and lipid metabolism in small for gestational age infants at 48 hours of age. *Pediatrics.* 2003; 111:804–809.
239. Carlsen EM, Renault KM, Jensen RB, Nørgaard K, Jensen JE, Nilas L, Cortes D, Michaelsen KF, Pryds O. The Association between Newborn Regional Body Composition and Cord Blood Concentrations of C-Peptide and Insulin-Like Growth Factor I. *PLoS One.* 2015; 10:e0121350.
240. Inoue M, Itabashi K, Nakano Y, Nakano Y, Tobe Y. High-molecular-weight adiponectin and leptin levels in cord blood are associated with anthropometric measurements at birth. *Horm Res.* 2008; 70:268–272.
241. Kamoda T, Saitoh H, Saito M, Sugiura M, Matsui A. Serum adiponectin concentration in newborn infants in early postnatal life. *Pediatr Res.* 2004; 56:690-3
242. Lindsay RS, Walker JD, Havel PJ, Hamilton BA, Calder AA, Johnstone FD; Scottish Multicentre Study of Diabetes Pregnancy. Adiponectin is present in cord blood but is unrelated to birth weight. *Diabetes Care.* 2003; 26:2244-2249.
243. Visentin S, Lapolla A, Londero AP, Cosma C, Dalfrà M, Camerin M, Faggian D, Plebani M, Cosmi E. Adiponectin levels are reduced while markers of systemic inflammation and aortic remodelling are increased in intrauterine growth restricted mother-child couple. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:401595.
244. Street ME, Volta C, Ziveri MA, Viani I, Bernasconi S. Markers of insulin sensitivity in placentas and cord serum of intrauterine growth-restricted newborns. *Clin Endocrinol.* 2009; 71:394–399.
245. Qiao L, Yoo HS, Madon A, Kinney B, Hay WW Jr, Shao J. Adiponectin enhances mouse fetal fat deposition. *Diabetes.* 2012; 61:3199–3207.

246. 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; 123:682–689.
247. Garcés MF, Vallejo SA, Sanchez E, Palomino-Palomino MA, Leal LG, Ángel-Muller E, Díaz-Cruz LA, Ruíz-Parra AI, González-Clavijo AM, Castaño JP, Abba M, Lacunza E, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. Longitudinal analysis of maternal serum Follistatin concentration in normal pregnancy and preeclampsia *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015; 83:229-235.
248. Bobrow CS, Holmes RP, Muttukrishna S, Mohan A, Groome N, et al. 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*. 2002; 186:283–287
249. Näf S, Escote X, Ballesteros M, Yañez R, Simón-Muela I, Gil P, Albaiges G, Vendrell J, Megia A. 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*. 2014; 9: e92175.
250. Szabat M, Johnson JD, Piret JM. Reciprocal modulation of adult beta cell maturity by activin and follistatin. *Diabetologia*. 2010; 53: 1680–1689.
251. Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42:2023–2029.
252. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004; 350:2682-2688.
253. Kawabata N, Kamiya N, Suzuki N, Matsumoto M, Takagi M. Changes in extracellular activin A: follistatin ratio during differentiation of a mesenchymal

- progenitor cell line, ROB-C26 into osteoblasts and adipocytes. *Life Sci.* 2007; 81: 8–18.
254. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, Bourlier V, Mohsen-Kanson T, Ladoux A, Elabd C, Scheideler M, Trajanoski Z, Takashima Y, Amri EZ, Lacasa D, Sengenès C, Ailhaud G, Clément K, Bouloumie A, Kirkland JL, Dani C. Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes.* 2010; 59: 2513–2521.
255. Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 281:902–906.
256. De Zegher F, Lopez-Bermejo A, Ibáñez L. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20:418-423.
257. Olhager E, Flinke E, Hannerstad U, Forsum E. Studies on human body composition during the first 4 months of life using magnetic resonance imaging and isotope dilution. *Pediatr Res.* 2003; 54:906-912.
258. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr.* 1997; 78:121-9.
259. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zerfas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C, Sun P, Lonning S, Skarulis M, Sumner AE, Finkel T, Rane SG. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab.* 2011; 14:67–79.
260. Dong J, Dong Y, Dong Y, Chen F, Mitch WE, Zhang L. Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues. *Int J Obes (Lond).* 2016; 40:434-442.
261. Fournier B, Murray B, Gutzwiller S, Marcaletti S, Marcellin D, Bergling S, Brachat S, Persohn E, Pierrel E, Bombard F, Hatakeyama S, Trendelenburg

- AU, Morvan F, Richardson B, Glass DJ, Lach-Trifilieff E, Feige JN. Blockade of the activin receptor IIb activates functional brown adipogenesis and thermogenesis by inducing mitochondrial oxidative metabolism. *Mol Cell Biol.* 2012; 32:2871-2879.
262. Singh R, Braga M, Pervin S. Regulation of brown adipocyte metabolism by myostatin/follistatin signalling. *Front Cell Dev Biol.* 2014; 2: 60.
263. Brandt C, Pedersen M, Rinnov A, Andreasen AS, Møller K, Hojman P, Pedersen BK, Plomgaard P. Obesity and low-grade inflammation increase plasma follistatin-like 3 in humans. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:364209.
264. Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Jaramillo A, Marín S, de Zegher F. Growth hormone therapy in short children born small-for-gestational-age: effects on abdominal fat partitioning and on circulating follistatin and high-molecular weight adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:2234–2239.
265. Wang Y, KimKA, KimJH, Sul HS. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr.* 2006; 136:2953–2956
266. Waddell JN, Zhang P, Wen Y, Gupta SK, Yevtodiyyenko A, Schmidt JV, Bidwell CA, Kumar A, Kuang S. Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration. *PLoS One.* 2010; 5: e15055.
267. Yevtodiyyenko A, Schmidt JV. Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn.* 2006; 235:1115-1123.
268. Díaz M, Bassols J, Aragonés G, Mazarico E, López-Bermejo A, Ibáñez L. Decreased placental expression of pre-adipocyte factor-1 in children born small-for-gestational-age: Association to early postnatal weight gain. *Placenta.* 2013; 34: 331-334.
269. Armengol J, Villena JA, Hondares E, Carmona MC, Sul HS, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Pref-1 in brown adipose tissue: specific involvement in brown

- adipocyte differentiation and regulatory role of C/EBP δ . *Biochem J.* 2012; 443:799-810.
270. Li J, Zhu Q, Wang H, Han C, Zhou Q, Huang H, Dong M. Decreased fetal pre-adipocyte factor-1 in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 2014; 431:93-95.
271. Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822; 2012:988-995.
272. Pencharz PB. Protein and energy requirements for 'optimal' catch-up growth. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64:S5–S7.
273. Kramer MS, Guo T, Platt RW, Vanilovich I, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Michaelsen KF, Dewey K. Promotion of Breastfeeding Intervention Trials Study Group. Feeding effects on growth during infancy. *J Pediatr.* 2004; 145:600–605.
274. Gale C, Logan KM, Santhakumaran S, Parkinson JR, Hyde MJ, Modi N. Effect of breastfeeding compared with formula feeding on infant body composition: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95:656–669.
275. Bouhours-Nouet N, Dufresne S, de Casson FB, Mathieu E, Douay O, Gatelais F, Rouleau S, Coutant R. High birth weight and early postnatal weight gain protect obese children and adolescents from truncal adiposity and insulin resistance: metabolically healthy but obese subjects? *Diabetes Care.* 2008; 31:1031-1036.
276. Gale C, Thomas EL, Jeffries S, Durighel G, Logan KM, Parkinson JR, Uthaya S, Santhakumaran S, Bell JD, Modi N. Adiposity and hepatic lipid in healthy full-term, breastfed, and formula-fed human infants: a prospective short-term longitudinal cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99:1034-1040.
277. Dulloo AG. Adipose tissue plasticity in catch-up-growth trajectories to metabolic syndrome: hyperplastic versus hypertrophic catch-up fat. *Diabetes.* 2009; 58:1037-1039.

278. Tosh DN, Fu Q, Callaway CW, McKnight RA, McMillen IC, Ross MG, Lane RH, Desai M. Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 299:G1023–1029.
279. Ong KK, Langkamp M, Ranke MB, Whitehead K, Hughes IA, Acerini CL, Dunger DB. Insulin-like growth factor I concentrations in infancy predict differential gains in body length and adiposity: the Cambridge Baby Growth Study. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90:156–161.
280. Okada T, Takahashi S, Nagano N, Yoshikawa K, Usukura Y, Hosono S. Early postnatal alteration of body composition in preterm and small-for-gestational-age infants: implications of catch-up fat. *Ped Res*. 2015; 77:136-142.
281. Blüher S, Kratzsch J, Kiess W. Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19:577–587.
282. Inami I, Okada T, Fujita H, Makimoto M, Hosono S, Minato M, Takahashi S, Harada K, Yamamoto T. Impact of serum adiponectin concentration on birth size and early postnatal growth. *Pediatr Res*. 2007; 61:604-606.
283. Bullen JW Jr, Bluher S, Kelesidis T, Mantzoros CS. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292:E1079–E1086.
284. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Chiou CH, Hsu YW, Ho SC, Chu C. 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.
285. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*. 2005; 46:1369–1379.

286. Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A. Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet* 2003; 361(9363):1089–1097.
287. Socha P, Grote V, Gruszfeld D, Janas R, Demmelmair H, Closa-Monasterolo R, Subías JE, Scaglioni S, Verduci E, Dain E, Langhendries JP, Perrin E, Koletzko B. European Childhood Obesity Trial Study Group. Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94:1776S–1784S.
288. Escribano J, Luque V, Ferre N, Mendez-Riera G, Koletzko B, Grote V, Demmelmair H, Bluck L, Wright A, Closa-Monasterolo R. European Childhood Obesity Trial Study Group. Effect of protein intake and weight gain velocity on body fat mass at 6 months of age: the EU Childhood Obesity Programme. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36:548-53.
289. Grote V, von Kries R, Closa-Monasterolo R, Scaglioni S, Gruszfeld D, Sengier A, Langhendries JP, Koletzko B. European Childhood Obesity Trial Study Group. Protein intake and growth in the first 24 months of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 51:S117-S118.
290. Martin RM, Holly JM, Smith GD, Ness AR, Emmett P, Rogers I, Gunnell D. Could associations between breastfeeding and insulin-like growth factors underlie associations of breastfeeding with adult chronic disease? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005; 62:728–737.
291. Koletzko B, Broekaert I, Demmelmair H, Franke J, Hannibal I, Oberle D, Schiess S, Baumann BT, Verwied-Jorky S. EU Childhood Obesity Project. Protein intake in the first year of life: a risk factor for later obesity? The E.U. childhood obesity project. *Adv Exp Med Biol*. 2005; 569:69-79.
292. Fernandez AM, Dupont J, Farrar RP, Lee S, Stannard B, Le Roith D. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2002; 109:347–355.

293. Scavo LM, Karas M, Murray M, Leroith D. Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3543–3553.
294. Bol VV, Delattre AI, Reusens B, Raes M, Remacle C. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297:R291-R299.
295. Bozzola E, Meazza C, Arvigo M, Travaglino P, Pagani S, Stronati M, Gasparoni A, Bianco C, Bozzola M. Role of adiponectin and leptin on body development in infants during the first year of life. *Ital J Pediatr*. 2010; 36:26.
296. Hibino S, Itabashi K, Nakano Y, Inoue M, Tanaka D, Maruyama T. Longitudinal changes in high molecular weight serum adiponectin levels in healthy infants. *Pediatr Res*. 2009; 65:363-366.
297. Lei X, Chen Y, Ye J, Ouyang F, Jiang F, Zhang J. The optimal postnatal growth trajectory for term small for gestational age babies: a prospective cohort study. *J Pediatr* 2014; 166:54–58.
298. Ibañez L, Suárez L, López-Bermejo A, Diaz M, Valls C, de Zegher F. Early development of visceral fat excess following spontaneous catch-up growth in children with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:925-928.
299. Ibañez L, López-Bermejo A, Suárez L, Marcos MV, Diaz M, de Zegher F. Visceral adiposity without overweight in children born small-for-gestational-age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:2079-2083.
300. De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, Owens JA. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292:R875-R886.

301. Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Marcos MV, Casano P, de Zegher F. Abdominal fat partitioning and high-molecular-weight adiponectin in short children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:1049-1052.
302. Cosmi E, Visentin S, Fanelli T, Mautone AJ, Zanardo V. Aortic intima media thickness in fetuses and children with intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2009; 114:1109–1114.
303. Gomez-Roig MD, Mazarico E, Valladares E, Guirado L, Fernandez-Arias M, Vela A. Aortic intima-media thickness and aortic diameter in small for gestational age and growth restricted fetuses. *PLoS One.* 2015; 10:e0126842.
304. Sehgal A, Doctor T, Menahem S. Cardiac function and arterial biophysical properties in small for gestational age infants: postnatal manifestations of fetal programming. *J Pediatr.* 2013; 163:1296–1300.
305. Visentin S, Grumolato F, Nardelli GB, Di Camillo B, Grisan E, Cosmi E. Early origins of adult disease: low birth weight and vascular remodeling. *Atherosclerosis.* 2014; 237:391–399.
306. Crispi F, Bijmens B, Figueras F, Bartrons J, Eixarch E, Le Noble F, Ahmed A, Gratacós E. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation* 2010; 121:2427–2436.
307. Bradley TJ, Potts JE, Lee SK, Potts MT, De Souza AM, Sandor GGS. Early changes in the biophysical properties of the aorta in pre-adolescent children born small for gestational age. *J Pediatr.* 2010; 156:388-392.
308. Faienza MF, Brunetti G, Delvecchio M, Zito A, De Palma F, Cortese F, Nitti A, Massari E, Gesualdo M, Ricci G, Carbonara S, Giordano P, Cavallo L, Scicchitano P, Ciccone MM. Vascular function and myocardial performance indices in children born small for gestational age. *Circ J.* 2016 25; 80:958-963.
309. Leunissen RWJ, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken-Koelega ACS. Effect of birth size and catch-up growth on adult blood pressure and carotid intima-media thickness. *Horm Res Paediatr.* 2012; 77:394–401.

310. Huxley R, Neil A, Collins R: Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet*. 2002; 360:659–665.
311. Reaven G. Why a cluster is truly a cluster: insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2008; 54:785-787.
312. Koskinen J, Kähönen M, Viikari JS, Taittonen L, Laitinen T, Rönnemaa T, Lehtimäki T, Hutri-Kähönen N, Pietikäinen M, Jokinen E, Helenius H, Mattsson N, Raitakari OT, Juonala M. Conventional cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in predicting carotid intima-media thickness progression in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation*. 2009; 120:229-236.
313. Tanaka Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Ogawa Y, Uchiyama M. Lower birth weight and visceral fat accumulation are related to hyperinsulinemia and insulin resistance in obese Japanese children. *Hypertens Res*. 2005; 28:529–536.
314. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008; 29:2959–2971.
315. Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2007; 74:11–18.
316. Geerts CC, Evelein AM, Bots ML, van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CS Ann Med. Body fat distribution and early arterial changes in healthy 5-year-old children. *Ann Med*. 2012; 44:350-359.
317. Dencker M, Wollmer P, Karlsson MK, Lindén C, Andersen LB, Thorsson O. Body fat, abdominal fat and body fat distribution related to cardiovascular risk factors in prepubertal children. *Acta Paediatr*. 2012; 101:852–857.
318. Skinner AC, Steiner MJ, Henderson FW, Perrin EM. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. *Pediatrics*. 2010; 125:801–809.

319. Oren A, Vos LE, Uiterwaal CS, Gorissen WH, Grobbee DE, Bots ML: Change in body mass index from adolescence to young adulthood and increased carotid intima-media thickness at 28 years of age: the Atherosclerosis Risk in Young Adults study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27:1383–1390.
320. Skilton MR, Marks GB, Ayer JG, Garden FL, Harmer JA, Leeder SR, Toelle BG, Webb K, Marks GB, Celermajer DS. Weight gain in infancy and vascular risk factors in later childhood. *Pediatrics* 2013; 131:1821–1828.
321. Evelein AM, Visseren FLJ, Van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CSPM. Excess early postnatal weight gain leads to thicker and stiffer arteries in young children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: 794–801.
322. Doyon A, Kracht D, Bayazit AK, Deveci M, Duzova A, Krmar RT, Litwin M, Niemirska A, Oguz B, Schmidt BM, Sözeri B, Querfeld U, Melk A, Schaefer F, Wühl E; 4C Study Consortium. Carotid artery intima-media thickness and distensibility in children and adolescents: reference values and role of body dimensions. *Hypertension.* 2013; 62:550-556.
323. Hughes AR, Sherriff A, Ness AR, Reilly JJ. Timing of adiposity rebound and adiposity in adolescence. *Pediatrics.* 2014; 134:1354-1361.
324. Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Maillot M, Bellisle F. Early adiposity rebound: causes and consequences for obesity in children and adults. *Int J Obes (Lond).* 2006; 30:S11-S17.
325. González L, Corvalán C, Pereira A, Kain J, Garmendia ML, Uauy R. Early adiposity rebound is associated with metabolic risk in 7-year-old children. *Int J Obes (Lond).* 2014; 38:1299-1304.
326. Saitou E, Hara M, Tamura S, Okada T. Sex and age differences in ultrasonographical measurement of the preperitoneal fat thickness and abdominal subcutaneous fat thickness in healthy school children. *Journal of JASSO,* 2004; 10:292-296.

327. Tadokoro N, Shinomiya M, Yoshinaga M, Takahashi H, Matsuoka K, Miyashita Y, Nakamura M, Kuribayashi N. Visceral fat accumulation in Japanese high school students and related atherosclerotic risk factors. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17:546–557.
328. Nobili V, Marcellini M, Marchesini G, Vanni E, Manco M, Villani A, Bugianesi E. Intrauterine growth retardation, insulin resistance, and non-alcoholic fatty liver disease in children. *Diabetes Care.* 2007; 30: 2638–2640.
329. Koska J, Stefan N, Permana PA, Weyer C, Sonoda M, Bogardus C, Smith SR, Joannisse DR, Funahashi T, Krakoff J, Bunt JC. Increased fat accumulation in liver may link insulin resistance with subcutaneous abdominal adipocyte enlargement, visceral adiposity, and hypoadiponectinemia in obese individuals. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87:295-302.

