

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Francisco José Torres Espínola

ISBN: 978-84-9163-104-0

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44888>

Cristina Campoy Folgoso, Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Miguel Pérez García, Catedrático del Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico, y Andrés Catena Martínez, Catedrático del Departamento Psicología Experimental, de la Universidad de Granada.

HACEN CONSTAR que el presente trabajo titulado "*Efectos de la obesidad y la diabetes materna durante la gestación sobre el neurodesarrollo de los hijos*", que constituye la memoria presentada por Francisco José Torres Espínola para optar al grado de Doctor en la Universidad de Granada, ha sido realizado en el Departamento de Pediatría bajo su dirección. Asimismo, considerándola concluida, autorizan su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman la presente en Granada, a 30 de Noviembre de 2016

Cristina Campoy Folgoso

Miguel Pérez García

Andrés Catena Martínez

El doctorando Francisco José Torres Espínola y los directores de la tesis Cristina Campoy Folgoso, Miguel Pérez García y Andrés Catena Martínez; Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 30 de Noviembre 2016

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

Esta memoria de tesis doctoral forma parte del Proyecto de Investigación de Excelencia (Ref. P06-CTS-02341), coordinado por la Prof. Cristina Campoy Folgoso, titulado: *"Papel de la Nutrición y la Genética materna sobre la Programación del Desarrollo del Tejido Adiposo Fetal. Búsqueda de Marcadores de Riesgo de Obesidad en Etapas Precoces de la Vida"*; Acrónimo: PREOBE (*"Programación Precoz de la Obesidad"*), subvencionado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, de la Junta de Andalucía y parcialmente por los Laboratorios Abbott Nutrition.

A Marta, María y Francisco

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para todas aquellas personas que han colaborado de una manera o de otra en la realización de esta tesis.

A mis directores de trabajo, a los que estoy profundamente agradecido por estos años de dedicación y esfuerzo en los cuales el trabajo duro al final tiene su recompensa. Agradecimiento especial a la Profesora Cristina Campoy Folgoso como directora principal de este trabajo, a la que admiro profundamente, y ha confiado en mí en estos años dándome todo el apoyo necesario para la consecución de esta tesis. Por supuesto, a mis co-directores de tesis los cuales me han enseñado en estos años a avanzar e involucrarme en la investigación, el Prof. Miguel Pérez García del que he aprendido tanto sobre la aplicación de los test neuropsicológicos. Quiero agradecer también al Prof. Andrés Catena Martínez, el cual siempre ha estado disponible para escuchar mis dudas, para mí ha sido un honor contar con la sabiduría de estos directores. Ellos han sido unos maestros excepcionales, por lo que quiero expresar mi agradecimiento por la confianza que han depositado en mí, y por haberme ofrecido la oportunidad de realizar uno de mis sueños que era la investigación aplicada.

A los Profesores María Teresa Miranda y Francisco Cruz Quintana, y a todo el equipo en general de obstetras, ginecólogos, matronas, pediatras por ayudar en este proyecto. Especial admiración a mi compañero en las revisiones durante tantos años el Dr. Antonio Jerez Calero sin el cual este estudio no hubiera sido posible.

Un agradecimiento especial a todos mis compañeros de trabajo del Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS, pues en estos años que se han implicado es el estudio a lo largo de los ocho años y otros tantos más que quedan aún por concluir (*Tania, Pilar, Cristina, Francis, Dani, Mirian, Ana, Mireia, Staffan, Signe, Antonio, Luz, Maite,.....*); a todos ellos les tengo un cariño muy especial pues sin ellos la realización de esta tesis hubiera sido imposible. No obstante, quiero destacar a la Dra. Signe y el Dr. Staffan que han estado a mi lado enseñándome y ayudándome a finalizar los publicaciones que forman parte de este trabajo.

Quiero agradecer también al Prof. Jesús Florido y la Prof. Carmen Padilla del Departamento de Obstetricia y Ginecología que facilitaron la realización de este

proyecto con una actitud muy positiva. También debo agradecer a todo el personal de los hospitales San Cecilio y Materno Infantil y de los centros de Salud que han colaborado en este estudio.

Como no podría ser de otro modo, la parte más importante de este trabajo, son aquellas personas que en los últimos años ha tenido que apoyarme en tantos momentos difíciles en los cuales estuve tentado de abandonarlo todo y gracias al ánimo y fuerza que siempre me transfieren he podido continuar adelante. Por ello, esta tesis está dedicada especialmente a mi familia, Marta compañera abnegada la cual me ha apoyado desde el primer momento para que yo fuera doctor, mi hija María a la cual adoro y mi hijo Francisco el terremoto de la casa. Sin ellos no hubiera sido posible todo el camino recorrido en los últimos años. Sin olvidar mí maestro Miguel Sánchez Zambrano que confió en mí desde el primer momento para dedicarme profesionalmente al mundo de la psicología clínica.

Especial agradecimiento a mis padres los cuales a lo largo de la vida se han preocupado de que estudiara y fuera una persona de provecho, como siempre dice mi madre si ella hubiera podido estudiar hubiera sido Catedrática, eran otros tiempos y no todo el mundo tenía acceso al estudio, siempre se preocupó de guiarnos por el camino correcto.

Un especial agradecimiento a todas las madres y sus hijos que han participado en este proyecto, y han colaborado hasta 8 años después de que sus madres fueran reclutadas y comenzaran a participar en este estudio, prestando su tiempo desinteresadamente durante tantos años, y manteniendo un interés encomiable, lo que ha permitido que se obtengan resultados novedosos e importantes; sin su ayuda no hubiera sido posible llevarlo a cabo.

Espero no dejarme a nadie en el camino..... Por eso quiero insistir en mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de una forma o de otra a la realización de esta tesis.

INDICE DE ABREVIATURAS

AA: Ácido Araquidónico

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

AGPI-CL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Ala: Alanina

LA: Ácido esencial linoleico

LNA: Ácido esencial α -linolénico

BSID: Escala de Desarrollo Infantil de Bayley

CBCL: Child Behavior Checklist

DHA: Ácido Docosaheptaenoico

IC: Intervalo de confianza

IMC: Índice de masa corporal

IOM: Instituto de Medicina

K-ABC: Batería de evaluación para niños Kaufman

OMS: Organización Mundial de la Salud

PPAR: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas

Pro: Prolina

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

TDAH: Trastorno de déficit de atención e hiperactividad

WISC: Escala de inteligencia Wechsler para niños

PIAT: Prueba de reconocimiento de lectura y matemáticas

Resumen

El desarrollo humano es un proceso altamente complejo, influenciado por un amplio rango de interacciones genéticas y factores ambientales. El periodo de desarrollo embrio-fetal es uno de los más vulnerables en la vida humana. Los cambios que tengan lugar en el ambiente intrauterino van a impactar sobre el desarrollo del nuevo ser, con efectos a largo plazo que alcanzarán no sólo la infancia sino también en la vida adulta, habiéndose establecido claras asociaciones con el desarrollo de enfermedades crónicas no-transmisibles.

Se ha comprobado que durante la vida fetal y los primeros años de vida se produce una "programación" e "imprinting" metabólicos tempranos mediados por el estado nutricional y metabólico materno, la alimentación en los primeros 2 años de vida y otros factores ambientales socio-económicos, culturales y demográficos.

Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que alteraciones durante la vida pre-, peri- y postnatal pueden tener un impacto significativo sobre la salud futura y el desarrollo del niño. Durante la vida precoz existen diversas "ventanas críticas" para el desarrollo cerebral que pueden influir de forma permanente en el neurodesarrollo final del individuo; los efectos de factores ambientales, metabólicos y nutricionales desfavorables durante la gestación pueden determinar diversas alteraciones a largo plazo, incluso cambios en la estructura y función cerebral, merma de las capacidades intelectuales o trastornos de la conducta, lo cual va a tener un gran impacto en la vida del nuevo ser.

El peso de la madre antes de la gestación, la ganancia de peso durante el embarazo, la dieta y diversas patologías metabólicas tales como la obesidad y/o la diabetes gestacional, pueden afectar al neurodesarrollo posterior de los hijos.

Además de los riesgos a corto plazo tales como prematuridad y macrosomía, la obesidad materna también se ha asociado a un incremento del riesgo de que sus hijos desarrollen disfunciones metabólicas e inmunológicas y fallos en el neurodesarrollo. Considerando el aumento progresivo de la proporción de mujeres en edad reproductiva (>20% en Europa) que alcanzan la gestación con sobrepeso y obesidad, mejorar el conocimiento y describir estas asociaciones constituye un paso imprescindible para

desarrollar protocolos de prevención y tratamientos para mantener la salud de nuestros niños y futuros adultos. De hecho, hoy día se sabe de la posibilidad de modificar la evolución de efectos patológicos originados durante la vida precoz, mediante correctas intervenciones dietéticas, actividad física y en general estilos de vida saludables, y mediante la mejora de las condiciones socioeconómicas.

Se ha publicado que los hijos nacidos de madres con obesidad o diabetes gestacional pueden tener problemas de neurodesarrollo a partir de los 4 años de edad y que se prolongarían durante la adolescencia; igualmente se ha observado que los hijos nacidos de embarazadas con estos problemas pueden presentar trastornos del comportamiento y otras patologías del aprendizaje.

Por otra parte, la genética materna y la propia de sus hijos pueden ser determinantes de todo el proceso de neurodesarrollo, y podrían influir en el desarrollo de diversas patologías que se van a manifestar durante la infancia, la adolescencia, la juventud o la vida adulta. Los trastornos metabólicos maternos van a condicionar cambios adaptativos de la expresión génica tanto en la placenta como en los tejidos fetales, que determinarán el desarrollo y funcionamiento de los órganos del bebé para toda su vida. Los diferentes genotipos van a jugar un papel importante en el desarrollo cerebral, probablemente por comprometer el transporte materno-fetal de nutrientes esenciales así como el status de los mismos durante la infancia; el resultado puede ser una alteración del desarrollo cognitivo, de la conducta o alteraciones de la función cerebral.

Los receptores de activación de proliferación de los peroxisomas (PPARs) son factores activados de ligandos de transcripción con funciones cruciales en la homeostasis lipídica, el metabolismo de la glucosa, los procesos anti-inflamatorios, el desarrollo de la placenta y están implicados en las funciones cognitivas y las enfermedades neurodegenerativas. Se ha comprobado que los polimorfismos de los genes PPAR influyen sobre la actividad de los receptores PPAR. El polimorfismo Pro12Ala del PPARG2 se ha asociado con un aumento del índice de masa corporal, obesidad, diabetes tipo 2, enfermedad coronaria, susceptibilidad a cáncer de mama, y otras patologías, incluyendo alteraciones cognitivas y enfermedades neurodegenerativas.

El presente trabajo se justifica por la falta de evidencia científica acerca del patrón de crecimiento y desarrollo en niños nacidos de madres metabólicamente comprometidas.

En el marco del Proyecto PREOBE, estudio de cohorte prospectivo, en el que se reclutaron embarazadas con normopeso ($18 \leq \text{BMI} < 25$), sobrepeso ($25 \leq \text{BMI} < 30$), obesidad ($\text{BMI} \geq 30$) y aquellas que desarrollaron diabetes gestacional, se ha realizado un seguimiento del crecimiento y neurodesarrollo de los hijos.

Los **objetivos** del presente estudio son:

- 1) Estudiar las diferencias en la evolución del embarazo, así como la ganancia de peso, y los cambios metabólicos e inmunológicos que van a determinar el tipo de parto y el crecimiento fetal.
- 2) Analizar los efectos de la obesidad y/o diabetes gestacional maternas sobre biomarcadores bioquímicos, hormonales, inflamatorios e inmunológicos y su influencia sobre el crecimiento fetal.
- 3) Determinar la influencia a largo plazo de la obesidad y/o diabetes maternas sobre el neurodesarrollo de los hijos durante el primer año y medio de vida.
- 4) Evaluar los efectos de diferentes polimorfismos genéticos del PPAR- γ Pro12-Ala, tanto en la madre como en sus hijos, sobre el neurodesarrollo de los niños.

Los **resultados** más relevantes muestran que el sobrepeso, la obesidad y la diabetes gestacional maternas se asocian al estado nutricional, la antropometría y composición corporal, y determinan cambios importantes en diferentes biomarcadores.

El efecto sobre el feto en desarrollo aún no está totalmente claro, pero en el presente trabajo se ha observado un mayor peso y un aumento del riesgo de desarrollar macrosomía en los hijos nacidos de madres con obesidad. Además, los bebés nacidos de embarazadas obesas y con diabetes gestacional mostraron una circunferencia de la cintura mayor al nacimiento. Los resultados obtenidos sugieren que tanto la obesidad como la diabetes gestacional en la embarazada determinan un paso excesivo materno-fetal de sustratos energéticos desde la madre al feto. En las embarazadas con sobrepeso y obesidad se han identificado varios candidatos posibles causantes las alteraciones descritas, entre ellos biomarcadores del metabolismo de la glucosa (*aumento de glucosa, insulina y HbA1c*), inflamación (*niveles altos de PCR*) y estado de hierro (*aumento del riesgo de deficiencia de hierro*), así como niveles más bajos de vitamina B12 y ácido fólico.

Los hijos nacidos de madres obesas muestran un desarrollo cognitivo y del lenguaje acelerado de forma temporal a los 6 meses de edad, que se desacelera a los 18 meses de edad, particularmente en el lenguaje. Estos cambios podrían estar ocasionados por un incremento del aporte de nutrientes a través de la placenta o a través de la leche materna en las embarazadas obesas, favoreciendo una sinaptogénesis más rápida durante los primeros 6 meses de vida, pero con efectos potencialmente negativos a largo plazo. Los niños nacidos de madres con diabetes gestacional muestran puntuaciones bajas en los indicadores de desarrollo de motricidad gruesa, lenguaje expresivo y lenguaje compuesto a los 18 meses de edad.

El polimorfismo genético Pro12Ala del PPAR γ de la madre parece tener un efecto importante en el desarrollo cerebral a largo plazo, independientemente de la condición materna de sobrepeso, obesidad o diabetes gestacional. Los hijos nacidos de madres con el genotipo salvaje Pro12 obtuvieron mejores resultados en las puntuaciones de desarrollo cognitivo, del lenguaje y del desarrollo motor a los 18 meses, respecto a los niños nacidos de madres portando los alelos Ala; sin embargo, el genotipo Pro12 materno no influyó sobre el desarrollo socio-emocional. Estos resultados muestran que las variantes genéticas maternas del PPAR γ tienen efectos a largo plazo sobre el desarrollo cerebral. Las variantes PPAR γ 12Ala determinan un descenso de la actividad de los receptores, que pueden conducir a una transferencia anómala de lípidos de la madre al feto, que influirá de forma negativa sobre el desarrollo cerebral.

Como conclusión, se ha comprobado que la obesidad, la diabetes gestacional y la genética maternas pueden determinar la futura salud y la enfermedad de sus hijos, y específicamente van a influir sobre el crecimiento y neurodesarrollo.

INDICE GENERAL

Capítulo 1 **Introducción General**

Capítulo 2 **Justificación y Objetivos**

Capítulo 3 **Metodología**

Capítulo 4 **Publicaciones**

- 1. Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE)*
- 2. Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age – A Follow Up from the PREOBE Cohort*
- 3. Maternal PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with infant's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age*

Capítulo 5 **Discusión General**

Capítulo 6 **Conclusiones**

CAPITULO 1

Introducción General

Capítulo 1: Introducción General

1. Neurodesarrollo humano

1.1. Crecimiento y Desarrollo Cerebral

El crecimiento del niño comienza a determinarse desde la fecundación del óvulo femenino. El crecimiento somático termina alrededor de los 25 años y el crecimiento del cerebro sobre los 30-35 años (1). El papel del genotipo es fundamental en el control de la información y reproducción de las células del feto en crecimiento, determinando las características tanto del cerebro como de sus posibles conexiones; no obstante, la genética no es la única implicada en el desarrollo cerebral, el ambiente también es un factor determinante de este desarrollo. En los primeros meses de gestación, el desarrollo cerebral es el producto de la interconexión sináptica de millones de neuronas, las cuales reciben y envían señales electroquímicas entre ellas (2).

Durante los primeros dos trimestres de embarazo, tiene lugar un intenso desarrollo neuronal (*neurogénesis*), alcanzando el nivel máximo en la producción de neuronas a los siete meses de gestación. El número de neuronas existentes al nacimiento permanece estable, aunque el número de conexiones sinápticas aumenta a un ritmo extraordinario después del nacimiento (3). Al expandirse el tejido neuronal, el cerebro aumenta en volumen y peso, aunque este incremento es solo temporal. Tras el nacimiento los enormes excesos de sinapsis producidas en los primeros dos trimestres de gestación van a sufrir una “poda” que tiene lugar a partir de los 4 meses de edad y hasta los dos años, mediante un proceso de selección natural a nivel celular. Esta poda selectiva de las conexiones sinápticas concretarán la estructura y funciones del cerebro humano (2). Esta gran cantidad de sinapsis en el recién nacido garantizan la creación de una red neuronal capaz

de facilitar el aprendizaje y la adaptación desde ese momento en adelante (2, 3) (Tabla I.1).

Poco después del nacimiento en el hipocampo comienzan a formarse los circuitos neuronales relacionados con la memoria, esto permite al recién nacido almacenar información sensorial, desarrollando aprendizaje. Aproximadamente entre las 8-12 semanas de edad, aumentan los circuitos neuronales en las áreas de los lóbulos parietales, occipitales y temporales, la función de estos lóbulos no es recibir información sensorial, sino integrar la información transmitida desde las áreas primarias sensorial y motora, y de esta manera facilitar los movimientos finos a medida que interaccionan con el medio ambiente. A los seis meses de edad da comienzo la formación de los circuitos del lóbulo frontal, dedicado al procesamiento más complejo de información, las llamadas funciones ejecutivas, el niño comienza a planificar y ejecutar conductas dirigidas a unos objetivos concretos. Durante las primeras etapas de la vida del niño se desarrolla la mayor parte del crecimiento del volumen cerebral, el desarrollo normal del cerebro es universal en el ser humano, al nacimiento los circuitos neuronales que comenzaron desarrollándose en el útero continúan su desarrollo fuera de él y experimentan una gran mielinización en el tronco cerebral, tálamo, áreas motoras, áreas sensoriales primarias y en áreas del cerebelo (4) (Tabla I.2).

TABLA I.1. Procesos de neurodesarrollo

	<i>Proliferación neuronal</i>	<i>Crecimiento axones y dendritas</i>	<i>Sinaptogénesis y poda</i>	<i>Mielinización</i>	<i>Apoptosis</i>
Momento	Semana 7 de gestación: Proliferación neuronal (<i>principalmente se completa al nacimiento</i>): neurogénesis celular (5), que continúa al menos hasta 4,5 meses después del parto. Se ha observado neurogénesis en adultos (6).	Semana 15 de Gestación: Diversificación de axones y dendritas , proliferando conexiones intercelulares. El crecimiento de dendritas persiste hasta 2 años después del nacimiento; los axones neuronales de algunas áreas cerebrales llegan a sus destinos finales (5).	Semana 23 de Gestación hasta la vida adulta: Sinaptogénesis (6). La densidad sináptica llega a un pico en diferentes momentos y en diferentes áreas cerebrales (<i>corteza visual, 4-12 meses de vida; corteza pre-frontal, a partir de 15 meses de edad</i>). La disminución de la densidad sináptica que sigue a este pico en cada área refleja la poda sináptica. La sobreproducción de la sinapsis se completa en el 2º año de vida, y en la adolescencia se produce otro pico. La poda sináptica tiene lugar entre 1-18 años (5).	Semana 12-14 de gestación hasta la vida adulta: La mielina es materia blanca grasa que cubre los axones, acelerando la velocidad de transmisión de los impulsos nerviosos intercelulares. La mielinización tiene el período más crítico a partir de la 20 semanas de gestación (cerebelo: orientación y equilibrio) y hasta 2 años después del nacimiento (4). Tras el nacimiento, las áreas involucradas en la visión y la audición alcanzan un pico de mielinización; posteriormente, se produce el pico de mielinización en las áreas del lenguaje, coincidiendo con la aparición de estas habilidades (5).	Semana 23 de gestación hasta el final de la adolescencia: La apoptosis es la muerte celular programada; mueren alrededor del 50%. Entre otros mecanismos, la apoptosis está regulada principalmente por factores neurotróficos (<i>BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; IGF-1: factor-1 de crecimiento similar a la insulina</i>). Si los niveles de factores neurotróficos disminuyen por debajo de un cierto umbral, las moléculas implicadas en el potencial de acción se degeneran (7). La microcefalia y un volumen cerebral pequeño está determinado por la proliferación/ disminución neuronal o el aumento de la apoptosis.
Evidencia	Ratones criados en ambientes enriquecidos (<i>grandes cajas con objetos que permiten la estimulación visual y táctil</i>) muestran un mayor peso cerebral y de grosor cortical respecto a aquellos criados en ambientes empobrecidos (<i>jaulas de laboratorio estándar</i>) (8).	Individuos con altos niveles de educación se asocian a una ramificación dendrítica mayor en el área de Wernicke, y por tanto, mejor procesamiento del lenguaje (9). Ratones criados en ambientes enriquecidos (<i>juguets y otros roedores</i>) tienen más espinas dendríticas (10).	Ratones criados en ambientes enriquecidos (<i>grandes recintos con objetos que permiten la estimulación visual y táctil</i>) muestran más sinapsis /neurona en las cortezas visual y motora respecto a aquellos criados en ambientes empobrecidos (<i>jaulas de laboratorio estándar</i>) (8) .	Niños criados en orfanatos rumanos y posteriormente adoptados, que experimentaron privación socioemocional temprana, presentan cambios estructurales en los tractos de sustancia blanca respecto a niños sanos normales no residentes en orfanato (11). La práctica del piano en la infancia mejora la mielinización en las áreas cerebrales donde subyace el movimiento de los dedos (<i>anisotropía fraccionada</i>) (12). Un ambiente de crianza enriquecido mejora la mielinización del cuerpo calloso en roedores y monos (13, 14).	

Tabla I.2. Etapas del desarrollo cerebral

1. *Nacimiento celular (Neurogénesis, Gliogénesis)*
 2. *Migración celular*
 3. *Diferenciación celular*
 4. *Maduración celular (Crecimiento de axones y dendritas)*
 5. *Sinaptogénesis*
 6. *Mielogénesis*
 7. *Muerte celular y poda sináptica*
-

El desarrollo del cerebro en las primeras etapas va a permitir que el recién nacido pueda mantener sus funciones vitales correctamente y logre interactuar aumentando su probabilidad de supervivencia; este incremento de las conexiones sinápticas permite al niño acrecentar sus capacidades de atender, responder y relacionarse adecuadamente con el medio que le rodea (15). Aunque el desarrollo en las primeras etapas es similar, no significa que los cerebros se desarrollen de la misma manera; el cerebro del lactante puede ser construido como una perfecta unidad de procesamiento de información e interacción con el medio ambiente y con gran capacidad de adaptación a este y, por tanto, con infinitas posibilidades de conexiones cerebrales; estas conexiones son específicas para cada niño y son reforzadas dependiendo de la combinación de factores ambientales y genéticos.

Durante el corto período de 9 meses, la célula inicial "madre" da lugar a más de 100 mil millones de células nerviosas y a un cerebro que pesa aproximadamente 400 g, al nacimiento del niño y cada neurona en el córtex cerebral posee aproximadamente 2500 sinapsis, a los tres años tendrán alrededor de 15000 *conexiones sinápticas* cada una, es decir, alrededor del doble que un cerebro adulto. Durante los primeros 4 años de vida, el cerebro continúa creciendo, alcanzando el tamaño de 1.200 g, que es sólo aproximadamente 200 g a menos de la del cerebro de un adulto. Durante los próximos 10-15 años, el crecimiento del cerebro continúa; participando las diferentes partes del

cerebro de forma diferente; por ejemplo, el espesor de las diferentes regiones de la corteza cerebral de los cambios entre las edades de 5 y 18 años a ritmos diferentes, con las regiones importantes para el razonamiento, la planificación y la comunicación social (1, 16).

Estudios recientes mediante técnicas de neuroimagen y potenciales cognitivos, muestran el cerebro del adolescente sin madurar, que va a presentar cambios estructurales extensos mucho después de la pubertad (17) (Figura I.1).

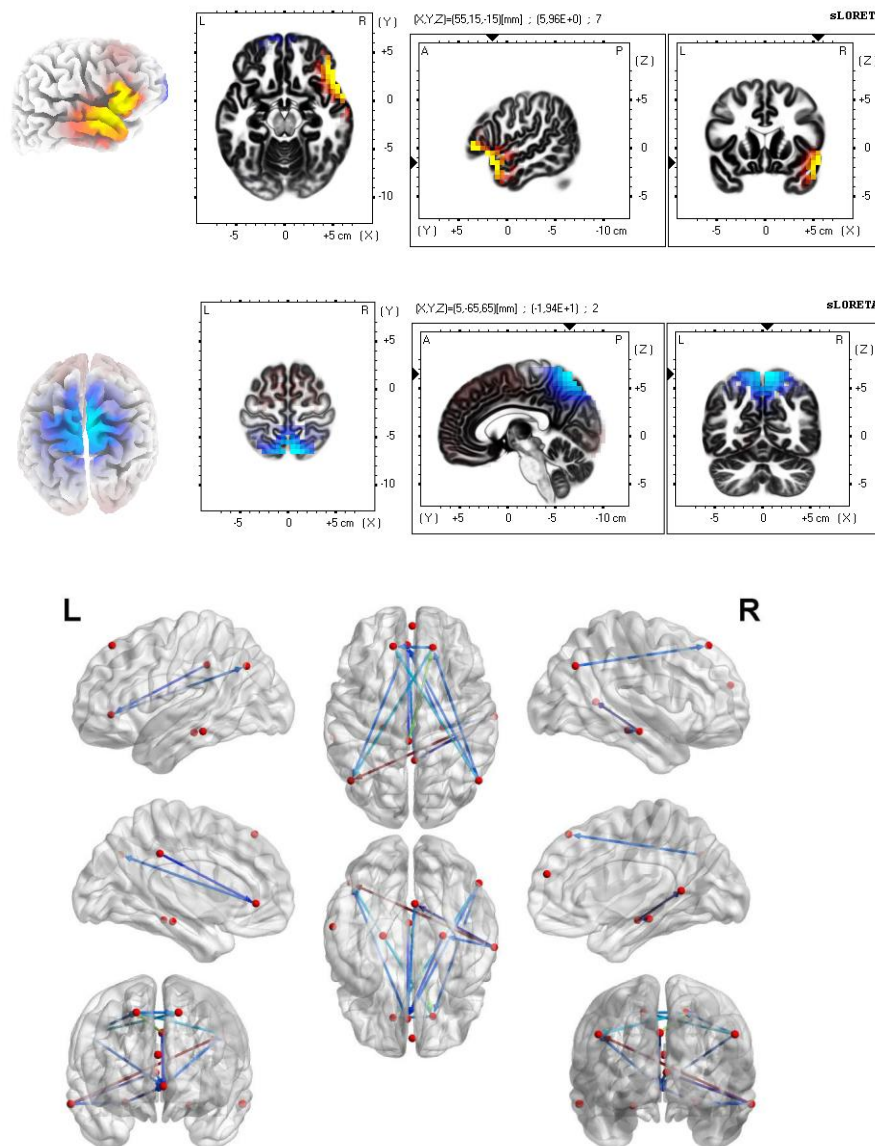


Figura I.1. Imagen del cerebro de un niño de 6 años.

1.2. Plasticidad Cerebral

En los últimos años los neurocientíficos han establecido la capacidad cerebral “de adaptación y cambio” en respuesta a las demandas del ambiente, se denomina *plasticidad cerebral* (18-21); este concepto comprende la creación y el fortalecimiento de ciertas conexiones neuronales y el debilitamiento o la eliminación de otras, según las necesidades. El estado nutricional va a ser determinante de la estructura y función cerebrales en periodos críticos del desarrollo cerebral (22). El grado de modificación dependerá del *tipo* de aprendizaje; por ejemplo, el aprendizaje a largo plazo implica una modificación más profunda en las conexiones neuronales. También depende del *período* de aprendizaje; así, los niños más pequeños experimentan un crecimiento extraordinario de nuevas sinapsis, y por tanto, la capacidad plástica cerebral es mayor. No obstante, la plasticidad es una característica central del cerebro a lo largo de toda la vida (23).

En las diferentes etapas en el desarrollo cerebral hay unos periodos denominados sensibles u óptimos durante los cuales los diferentes tipos de aprendizajes son más favorables y efectivos, y el desarrollo de ciertas habilidades son más óptimas, esto no significa que si no se desarrollan en ese determinado momento se vayan a quedar sin desarrollar. Dentro de los denominados periodos restringidos y tempranamente sensibles, ciertas habilidades sensoriales son más susceptibles de verse afectadas si no se desarrollan adecuadamente y en el momento justo; en este contexto estarían incluidas ciertas experiencias emocionales y cognitivas, como podrían ser los sonidos en relación al desarrollo del lenguaje (24). Otras habilidades, como la adquisición del vocabulario y la escritura, no se encuentran dentro de estas ventanas críticas y pueden ser aprendidas en cualquier momento, a lo largo de nuestra vida (25).

La flexibilidad del cerebro para adaptarse a las demandas ambientales se llama plasticidad cerebral; desde hace unos años, y gracias a los numerosos estudios realizados mediante la utilización de las técnicas de neuroimagen, se sabe que en el cerebro se produce una transformación física y estructural a través de la continua modificación en las sinapsis entre las neuronas, ya sea por el reforzamiento de estas conexiones o su debilitamiento (18). El grado de modificación depende en gran medida del tipo de aprendizaje que tenga lugar, ya sea a largo o corto plazo y de las condiciones ambientales a las cuales está expuesto el cerebro. No solo el cerebro en los inicios del desarrollo en su etapa infantil posee plasticidad, si no que los cerebros adultos poseen también esta cualidad, de hecho, la rehabilitación neuropsicológica no tiene edad y se da a lo largo de toda la vida (26).

La plasticidad cerebral depende en gran medida, de la genética particular de cada individuo y los estímulos a los que es sometida, estos factores, apoyan e incrementan la formación y desarrollo de los circuitos neuronales de forma única en cada individuo. Existen procesos epigenéticos los cuales son específicos para el crecimiento y desarrollo de esos circuitos neuronales (ambiente del individuo), dependientes en gran medida de la edad del individuo y las etapas del desarrollo, los cuales expondrían los periodos sensibles en el desarrollo cerebral (27, 28).

El proceso por el cual se produce la plasticidad cerebral puede ser clasificado según sea: *expectante a la experiencia y dependiente de la experiencia*. La *plasticidad expectante a la experiencia* depende en más medida de la genética del individuo durante los primeros años de vida y la influencia en la estructura cerebral. La *plasticidad dependiente de la experiencia*, en mayor medida es la modificación del cerebro como resultado de la exposición a determinados ambientes de aprendizaje; por ejemplo, el proceso por el cual se lleva a cabo la mielinización es considerada un proceso dependiente de la experiencia

(2, 29). En el proceso de la plasticidad cerebral hallamos también los denominados *periodos sensibles*, que son aquellos en los cuales determinados aprendizajes están más predispuestos a su adquisición y a la correcta ordenación cerebral (30). Estos podrían incidir en el desarrollo sensorial, la visión, el lenguaje y ciertas experiencias emocionales y cognitivas (31).

Las funciones cerebrales como la visión, lenguaje y funciones cognitivas de orden superior, tienen una mayor velocidad de desarrollo en los primeros dos a tres años de vida, pero solo las sinapsis bien consolidadas a través del uso se mantendrán en el tiempo, esto dará lugar a un proceso de poda selectiva el cual estaría determinada por la interacción de la genética y el ambiente en el cual se desarrolle el individuo; es vital entender que el desarrollo del cerebro en gran medida está determinado por la probabilidad de que ciertos factores concuerden en el tiempo y momento adecuados para su óptimo desarrollo (32, 33). Estas experiencias a las que se somete el individuo determinarán en un futuro la mielinización, aquellas conexiones sinápticas que hayan sido más reforzadas permanecerán a lo largo de la vida pudiendo determinar las futuras capacidades en la vida adulta.

De los 3 a los 6 años, el niño está más predispuesto para aprender un idioma no nativo, lo cual no implica que posteriormente se pueda aprender (34). Otro periodo fundamental es la adolescencia desde los 10-20 años; gracias a las técnicas de neuroimagen se ha descubierto que el cerebro no detiene su crecimiento a los 12 años como se creía, pues a pesar de que a esa edad alcanzaba el 90-95% de su tamaño de adulto, el cerebro del adolescente es una obra en construcción que nunca deja de modificarse; este periodo dura más allá de los 30 años, tanto en la sustancia blanca como en el gris (35). Se ha corroborado que existe una segunda gran proliferación neuronal y al mismo tiempo una

gran poda, dándose lugar al inicio y al final de la etapa adolescente respectivamente, este crecimiento y disminución altera el número de sinapsis en entre las neuronas (36).

1.3. Factores condicionantes del neurodesarrollo

Uno de los principales factores que afectan al desarrollo cerebral es el ambiente en el cual se desarrolla el niño; es importante el contexto en el que vive (*alimentación, entorno socio-económico y emocional, nivel cultural, contaminantes ambientales,..*) y el modelo de familia y estilos de vida que adopten los padres para ese niño. Así, una buena alimentación y un grado socio-económico alto determinan un mejor desarrollo neuropsicológico (32, 37).

Los descubrimientos realizados en diversas investigaciones en los últimos años sobre el cerebro indican el modelo educativo y de estilo de vida que siguen los padres, y en el que crece y se desarrolla el niño, como fundamental para el proceso del aprendizaje; por este motivo las nuevas teorías sobre los modelos de aprendizaje están creando formatos más apropiados y efectivos con el fin de obtener un adecuado desarrollo cerebral a través de un aprendizaje más efectivo (33, 38).

Factores genéticos y ambientales tales como la nutrición, ejercicio físico, calidad del ambiente (*emocional, medioambiental, higiene*), interacción social, y una buena higiene del sueño van a conducir a un mejor funcionamiento del cerebro; aunque todo esto puede parecer demasiado obvio, estos factores van a tener un impacto crucial sobre la adquisición de conocimientos y sobre el desarrollo socio-emocional. Los estudios publicados hasta el momento, demuestran que condicionando de forma óptima el crecimiento y desarrollo se puede mejorar el potencial de desarrollo cerebral, aumentar

la plasticidad y facilitar el proceso de aprendizaje. Estos nuevos conocimientos científicos indican la necesidad de implementar mejoras en los programas de salud pública incorporando estrategias más centradas en el óptimo crecimiento y desarrollo del niño que determinarían grandes beneficios a corto, medio y largo plazo para la sociedad.

En los últimos años se ha demostrado que determinadas áreas del cerebro, incluyendo el hipocampo, desempeñan un papel fundamental en el aprendizaje y en el desarrollo de la memoria; se ha comprobado que la propia muerte neuronal determina la generación de nuevas neuronas, lo que ocasiona una modificación continua de la estructura cerebral a lo largo de la vida (39, 40). Los factores ambientales influyen directamente sobre el desarrollo cerebral, ampliando experiencias, modificando la evolución de los procesos de desarrollo descritos y condicionando el aprendizaje y las habilidades futuras del adulto (41).

El desarrollo cerebral viene determinado tanto por el momento (*timing*) como por la secuencia de eventos madurativos; la interacción entre la predisposición genética y el medio ambiente tiene lugar desde la vida intrauterina. Un ejemplo de este proceso fisiológico son las neuronas sensoriales, que mediante una secuencia regida por turnos en los cuales se activan o desactivan, van conectando las capas más profundas del sistema sensorial con las más superficiales. En la evolución de la alimentación durante las etapas de recién nacido y lactante, cada alimento nuevo que el bebé va probando estimula las neuronas sensoriales encargadas de la visión del alimento, el gusto, el olfato, el tacto y así sucesivamente, hasta crear las conexiones necesarias mediante las cuales se produce el aprendizaje sobre cada alimento e incluso cuáles son más agradables para el niño; este proceso tan sencillo puede llegar a determinar nuestras futuras preferencias de alimentos en la vida adulta (42) y puede verse modulado por determinados factores ambientales. El

crecimiento neuronal del niño comienza en la vida fetal, de ahí la importancia en el desarrollo de programas de bienestar social, encaminados a una adecuada alimentación y ejercicio físico en las embarazadas y del niño después del nacimiento, lo cual contribuirá mejor a su desarrollo cerebral (43, 44).

Después del nacimiento, los dos primeros años de vida son considerados como altamente sensibles para la creación de las conexiones sinápticas relacionadas con los procesos de la atención, percepción, psicomotricidad, memoria, emociones y la capacidad de relacionarse, incluyendo el lenguaje (45). El lenguaje es el proceso mejor estudiado y documentado en relación con los periodos en el desarrollo del niño (46-48); el ambiente específico en el cual se desarrolla el niño y dependiendo mucho de los estímulos externos a los que se enfrente afectarán el desarrollo del lenguaje. Así, se alcanza la capacidad adecuada de discriminación fonológica y un buen aprendizaje del idioma; durante la infancia el aprendizaje de nuevos idiomas sería la característica más importante, después de la adolescencia es más complicado el aprendizaje de nuevos idiomas, aunque no imposible. Esto se debe a que una vez mielinizado un circuito neuronal o sinapsis, quedaría “fijo” de por vida, a no ser que ocurra algún daño cerebral o degeneración celular (49).

Sin embargo, otros estudios no apoyan la idea de la conjunción de factores genéticos, medioambientales y el momento del desarrollo (*timing*) puedan determinar ciertos procesos cerebrales. Aún existen importantes lagunas respecto a los mecanismos y circunstancias que rodean la proliferación de sinapsis y su posterior poda (50). Se necesitan más estudios que permitan aclarar la fisiología de estos complejos procesos y cómo determinados factores ambientales van a determinar un mejor o peor desarrollo cerebral, en función de su influencia sobre el desarrollo y función de estructuras

cerebrales; tal es el caso de la nutrición durante “*los primeros 1000 días*”, el índice de masa corporal de la madre, la intolerancia a la glucosa, la genética materna y fetal, la alimentación al pecho y el ejercicio físico, durante estas etapas, las más vulnerables del neurodesarrollo.

2. Nutrición y neurodesarrollo

La nutrición durante antes y durante el embarazo y en los primeros años de vida del niño es primordial para su crecimiento y neurodesarrollo. Durante el desarrollo fetal y tras el nacimiento tiene lugar un rápido crecimiento y desarrollo del cerebro, siendo este más vulnerable durante el primer y tercer trimestres de la gestación (*ventanas críticas del neurodesarrollo*) al déficit o exceso de importantes nutrientes funcionales. Durante los “*periodos sensibles*” o “*ventanas críticas*” del neurodesarrollo el estado nutricional materno, por tanto, va a jugar un papel esencial. Se reconocen entre otros, como nutrientes esenciales para el correcto desarrollo cerebral las proteínas (aminoácidos), ácidos grasos poliinsaturados, ácido fólico, hierro, iodo, cinc, cobre, selenio, vitaminas A y D o colina; además, cada uno de ellos tiene una ventana crítica específica durante la cual su deficiencia puede determinar efectos negativos sobre el neurodesarrollo a corto, medio y largo plazo (22, 51, 52).

2.1. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son vitales para el desarrollo cerebral, en procesos tales como la sinaptogénesis, el desarrollo de las membranas neuronales o la mielinización.

Dentro de los AGPI, destacan por su presencia e importancia en el desarrollo cerebral, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), docosahexaenoico (DHA)

y araquidónico (AA). El DHA proviene de diferentes elongaciones y desaturaciones a partir del ácido esencial α -linolénico (LNA), constituyendo la serie omega-3; El AA proviene sucesivas elongaciones y desaturaciones a partir del ácido esencial linoleico (LA) constituyendo la serie omega-6. LA y LNA y sus derivados comparten enzimas desaturasas y elongasas, y por tanto, compiten en la síntesis de los AGPI-CL, en un proceso regulado por la ingesta dietética y los diferentes polimorfismos genéticos de estas enzimas (FADS y ELOV). El DHA posiblemente sea el ácido graso con un papel más importante en la formación y función del sistema nervioso y, especialmente en el cerebro fetal, habiéndose comprobado un proceso de biomagnificación de la acreción de DHA entre las 32 y 40 semanas de gestación (53-55). Tanto el DHA como el AA tienen funciones estructurales a nivel cerebral, formando parte imprescindible de los fosfolípidos de las membranas celulares del sistema nervioso y regulando sus funciones metabólicas.

El DHA se encuentra en la mayoría de los tejidos en pequeñas cantidades, pero es a nivel cerebral donde lo encontramos de forma mayoritaria formando parte estructural de las membranas celulares, participando en la función de transmisión de señales y en el crecimiento neuronal; conforma un 30-40% del total de ácidos grasos en los bastones de los segmentos externos de la retina, favoreciendo la fluidez de la membrana, modificando la movilidad de las proteínas y la actividad de los enzimas que son críticos en la transducción de señales visuales. La disminución de DHA en el cerebro y retina interfiere con la normal neurogénesis y función neuronal así como en las cascadas de señalización visual.

Tras el nacimiento, las conexiones neuronales se crean y refuerzan con la estimulación; la falta de estimulación puede producir una pérdida transitoria de agudeza visual y

cambios en las funcionales corticales (56). Algunos estudios han reportado la existencia de una alta correlación entre el contenido de DHA en el cerebro con la capacidad de aprendizaje y el nivel de inteligencia de los recién nacidos hasta los 2 años (57). Otros estudios realizados en niños y animales corroboran estos descubrimientos y la importancia de este ácido graso a nivel cerebral para un adecuado desarrollo cognitivo (58). Durante el periodo de gestación el DHA es transferido al feto por la madre y esta lo obtiene a través de la dieta ya sea en su forma de α -linolénico que es precursor del DHA o directamente como DHA; posteriormente el recién nacido lo recibe a través de la leche materna y de los alimentos que ingiere durante los primeros años de vida. Diversos estudios sugieren la necesidad de suplementar a la madre con DHA durante la gestación y el periodo pre-concepcional para mejorar los niveles de ácidos grasos y así favorecer un correcto desarrollo cerebral (57-60). Igualmente, estudios realizados en niños prematuros indican los importantes beneficios de la suplementación con DHA sobre el desarrollo cognitivo y de la retina, incrementando con su presencia la agudeza visual y a largo plazo ciertas habilidades cognitivas (61-63). A pesar de los estudios llevados a cabo, aún queda mucho por investigar y no existe evidencia científica acerca de los efectos de la suplementación con DHA sobre la mejora a nivel cognitivo en niños nacidos a término (64).

2.2. Hierro

Durante el periodo fetal y a lo largo de la vida el hierro posiblemente sea uno de los oligoelementos más importantes para el neurodesarrollo, estando implicado en varias áreas y funciones cerebrales importantes. Tanto el déficit como el exceso de hierro puede afectar el adecuado neurodesarrollo; también es importante el momento en el cual se

necesite, existen procesos neuronales que tienen una determinada "*Ventana Crítica o Timing*", momentos en los que unos niveles adecuados de hierro son esenciales para los procesos de organogénesis cerebral (65, 66). El déficit de hierro afecta a la mielinización, a la síntesis de los neurotransmisores (monoaminas) y al metabolismo energético del hipocampo durante el periodo neonatal (67). La deficiencia de hierro durante el desarrollo afecta, por tanto, afectando a la velocidad de procesamiento al existir una menor mielinización, alteraciones del desarrollo motor (*monoaminas*), y problemas en la memoria de reconocimiento (*hipocampo*); se ha observado que el déficit de hierro durante *ventanas críticas* del desarrollo cerebral puede producir una reducción de la masa del hipocampo, incluso después de la reposición de los depósitos de hierro (68, 69). El déficit de hierro durante la gestación en madres con sobrepeso u obesidad pre-concepcional, determina una alteración del neurodesarrollo de los hijos a los 18 meses de edad (70).

2.3. Ácido fólico

El ácido fólico o vitamina B9, es primordial en las primeras semanas en la formación del embrión y en el crecimiento fetal durante el embarazo. Existe evidencia científica de que el déficit de ácido fólico durante el primer trimestre de la gestación aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar malformaciones del tubo neural tales como la espina bífida (71, 72). De forma generalizada se recomienda la ingesta de ácido fólico durante el periodo pre-concepcional y el primer trimestre de la gestación. Se ha observado un descenso de las concentraciones plasmáticas de ácido fólico conforme avanza la gestación, que es significativamente mayor en los embarazos de mujeres obesas, las cuales presentan un alto riesgo de deficiencia de folatos durante el último trimestre del embarazo (73). La deficiencia de folatos y la elevación de los niveles de homocisteína en

el embarazo van a determinar un efecto negativo a largo plazo sobre el desarrollo cerebral asociado a un peor rendimiento cognitivo (74).

3. Obesidad y Diabetes Mellitus durante la gestación

3.1. Obesidad y Diabetes: Epidemia a nivel mundial.

En los últimos años del siglo XX y principios del XXI, la obesidad y la diabetes se han convertido en un problema generalizado de salud pública en el mundo desarrollado (75-78). La tendencia exponencial de la prevalencia de obesidad observada en Estados Unidos se ha extendido a otros países del mundo (79). A pesar de las campañas de prevención realizadas para controlar estas patologías, la sobrealimentación generalizada en la población de países industrializados, y la falta de recursos en los países en vías de desarrollo condicionando el consumo de alimentos de baja calidad y alto contenido energético, ha determinado un alto porcentaje de personas obesas que a su vez desarrollan las patologías asociadas a esta enfermedad, tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, enfermedades articulares o alteraciones mentales tales como la depresión, etc. (80-82), que han aumentado de forma exponencial. Debido al aumento de la población mundial y a la rapidez que se desarrolla, las infraestructuras y los recursos médicos en el planeta pueden no ser suficientes para afrontar una epidemia de tal magnitud (83, 84).

Entre los grupos de riesgo se encuentran los niños y las embarazadas. Una mala alimentación en los niños puede conllevar desequilibrios nutricionales y obesidad; el nivel cultural de los padres y la publicidad de comida basura dirigida a los niños pueden jugar un papel importante (85, 86). El consumo mayoritario de productos de alto

contenido en grasas y azúcares, el cambio de patrones de juego y actividad física (sedentarismo) en los niños, y los estilos de vida en las grandes ciudades, van a ser determinantes del incremento del IMC en los niños del primer mundo y, como consecuencia una alta probabilidad a desarrollar en el futuro enfermedades relacionadas con la obesidad (87).

Las embarazadas obesas se consideran un grupo de riesgo, pues la enfermedad va afectar a la salud materna, pero también a la de su descendencia, facilitando la transmisión intergeneracional del riesgo de desarrollar obesidad. Se ha comprobado que los hijos nacidos de madres obesas, dependiendo del índice de masa corporal (IMC) materno pre-concepcional y la ganancia de peso durante la gestación, pueden desarrollar alteraciones metabólicas a partir del primer año de vida (88, 89).

La OMS ha establecido los límites del IMC para clasificar a la población en 9 categorías; para ello se han tenido en cuenta el peso, la talla y la complejión física. En las Tablas I.3, I.4 y I.5 aparecen los valores de IMC y clasificación para adultos publicados por la OMS, para niños publicados por el IOTF (90) y las recomendaciones de ganancia de peso durante la gestación realizadas por el Instituto de Medicina (IOM) (91, 92).

Tabla I.3. Valores internacionales del IMC en adultos (OMS)

	IMC (Kg/m ²)
<i>Delgadez Severa</i>	<16.00
<i>Delgadez Moderada</i>	16.00-16.99
<i>Delgadez Aceptable</i>	17.00-18.49
<i>Bajo Peso</i>	<18.50
<i>Normo peso</i>	18.50-24.99
<i>Sobrepeso</i>	25.00-29.99
<i>Obesidad tipo 1</i>	30.00-34.99
<i>Obesidad tipo 2</i>	35.00-39.99
<i>Obesidad tipo 3</i>	≥ 40.00

Tabla I.4. Puntos de corte internacionales del Índice de Masa Corporal (IMC) para sobrepeso y obesidad, definidos por sexo y edad (entre 2 y 18 años).

Edad (años)	Índice de Masa Corporal 25 kg/m ²		Índice de Masa Corporal 30 kg/m ²	
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
2	18.41	18.02	20.09	19.81
2.5	18.13	17.76	19.80	19.55
3	17.89	17.56	19.57	19.36
3.5	17.69	17.40	19.39	19.23
4	17.55	17.28	19.29	19.15
4.5	17.47	17.19	19.26	19.12
5	17.42	17.15	19.30	19.17
5.5	17.45	17.20	19.47	19.34
6	17.55	17.34	19.78	19.65
6.5	17.71	17.53	20.23	20.08
7	17.92	17.75	20.63	20.51
7.5	18.16	18.03	21.09	21.01
8	18.44	18.35	21.60	21.57
8.5	18.76	18.69	22.17	22.18
9	19.10	19.07	22.77	22.81
9.5	19.46	19.45	23.39	23.46
10	19.84	19.86	24.00	24.11
10.5	20.20	20.29	24.57	24.77
11	20.55	20.74	25.10	25.42
11.5	20.89	21.20	25.58	26.05
12	21.22	21.68	26.02	26.67
12.5	21.56	22.14	26.43	27.24
13	21.91	22.58	26.84	27.76
13.5	22.27	22.98	27.25	28.20
14	22.62	23.34	27.63	28.57
14.5	22.96	23.66	27.98	28.87
15	23.29	23.94	28.30	29.11
15.5	23.60	24.17	28.60	29.29
16	23.90	24.37	28.88	29.43
16.5	24.19	24.54	29.14	29.56
17	24.46	24.70	29.41	29.69
17.5	24.73	24.85	29.70	29.84
18	25	25	30	30

Grupo de Trabajo sobre Obesidad (IOTF) de la Organización Mundial de la Salud (2008)(90). Los datos se han obtenidos a partir de las medias de los datos poblacionales procedentes de los siguientes países: Brasil, Gran Bretaña, Hong Kong, Holanda, Singapur, Estados Unidos (93).

Tabla I.5. Ganancia de peso total y tasas de ganancia de peso recomendadas para mujeres con embarazo simple

Peso antes del embarazo (Kg/m ²)	Ganancia total de peso recomendada (Kg)	Ganancia de peso recomendada en el 2º y 3er trimestres
Bajo peso (<18,5)	12,5–18	0,51 (0,44–0,58)
Normal (18,5–24,9)	11,5–16	0,42 (0,35–0,50)
Sobrepeso (25–29,9)	7–11,5	0,28 (0,23–0,33)
Obesidad (≥30)	5–9	0,22 (0,17–0,27)

(IOM, 2009) (94)

3.2. Influencia de la obesidad materna durante la gestación sobre el neurodesarrollo de sus hijos.

Los datos recogidos en el año 2011 en España en mujeres de edades comprendidas entre los 25 y 54 años muestran un porcentaje de obesidad ($IMC \geq 30 \text{Kg/m}^2$) del 17,5%, un porcentaje que prácticamente duplica el resultado del 2003 (9.8%). Entre los niños españoles de 2 a 17 años el porcentaje de obesidad y sobrepeso era del 27.8% en el año 2011, cifras que ponen de manifiesto que estamos ante un grave problema de salud pública, pues las tasas de obesidad y sobrepeso se están duplicando en cortos espacios de tiempo (95). La obesidad se define como un aumento del peso corporal debido a un exceso de grasa corporal que hace peligrar seriamente la salud; es una enfermedad metabólica multifactorial, influida por factores genéticos, fisiopatológicos, metabólicos, moleculares y socioambientales (96). Algunas personas son más susceptibles de ganar peso debido a razones genéticas, pero la combinación de una alimentación inadecuada y la tendencia a una vida sedentaria explica la mayor parte del espectacular incremento de la obesidad infantil en los últimos 15 años en nuestro país. Por tanto, los malos hábitos de alimentación y un estilo de vida sedentaria son los principales factores responsables de un incremento excesivo de peso corporal fundamentalmente por el aumento del tejido adiposo (97).

Es de vital importancia en salud pública considerar los riesgos de la obesidad durante el embarazo; según estudios llevados a cabo por Catalano et al., la obesidad en la embarazada va a determinar alteraciones metabólicas, tales como la disminución de la sensibilidad a la insulina y, incrementando el riesgo de diabetes gestacional y preeclampsia que se asocian a un parto prematuro y al aumento de la mortalidad neonatal (98).

En 2002, Barker et al. (2002) propusieron la teoría de la programación fetal de la salud y la enfermedad (99), "*...el impacto de las condiciones de vida intrauterina sobre la aparición de futuras enfermedades en la vida adulta*"; la hipótesis de Barker et al. (2002) fija su atención en enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II, las cuales se originarían como mecanismo de adaptación del feto a la malnutrición/sobrenutrición intrauterina. No obstante, el papel de la nutrición y el estado metabólico materno en la programación precoz del neurodesarrollo de los hijos es un tema de máximo interés.

Existen pocos estudios publicados que evalúan el papel de la obesidad materna sobre el neurodesarrollo de los hijos (Hinckle, et al. 2012). La obesidad materna, asociada a un estado inflamatorio, estrés metabólico y lipotoxicidad, generando un ambiente intrauterino adverso para el desarrollo del cerebro fetal, determinando potencialmente alteraciones del desarrollo motor, cognitivo y conductual (100).

En un análisis llevado a cabo por Brion et al. (2010), en dos cohortes (ALSPAC y Generation R) donde participaron alrededor de 5000 niños hasta los 3.5 años de edad, se estudió el efecto del sobrepeso materno sobre el neurodesarrollo de los hijos; se pudo comprobar que en los niños nacidos de madres con sobrepeso mostraban una disminución en las habilidades verbales pero que este efecto desaparecía cuando se ajustaban los resultados por variables confusoras; los autores concluyeron que no quedaba claro si el efecto sobre el neurodesarrollo fue debido al sobrepeso materno antes de la gestación o

al tipo de educación, hábitos y ambiente socioeconómico en el que se desarrolla el niño. El estudio ALSPAC estableció una relación entre el sobrepeso de la madre y de desarrollo de problemas externalizantes (socialización) en los hijos; sin embargo, estos resultados no fueron corroborados en la cohorte de Generation R. En los mismos niños del estudio ALSPAC a los 8 años de edad, se pudo comprobar que los hijos nacidos de madres con sobrepeso u obesidad presentaban un coeficiente intelectual (CI) mayor que los niños nacidos de madres normopeso, incluso tras ajustar por las variables confusoras. No obstante, estos resultados hay que tomarlos con precaución pues están en discordancia con los resultados obtenidos en otros estudios (101). Neggers et al. (2003), en un estudio realizado en niños nacidos de madres normopeso y obesas, comprobaron una asociación negativa entre el peso materno y el resultado en los test de neurodesarrollo a los 5 años de edad; los hijos nacidos de madres obesas obtuvieron 5 puntos menos de CI y menor puntuación en el desarrollo del lenguaje respecto a los nacidos de madres normopeso. No se comprobaron diferencias en el desarrollo motor. Los mecanismos por los cuales se dan estas circunstancias no están aún claros (102). Un estudio epidemiológico longitudinal a nivel nacional en Estados Unidos, demostró una relación negativa entre el peso materno pre-concepcional (obesidad o bajo peso) y el neurodesarrollo de los hijos a los 2 años de edad (test de Bayley II) (100). Heikura et al. (2007), en un estudio llevado a cabo en dos cohortes de madres-hijos (20000 en total), y con un intervalo entre las dos cohortes de 20 años, identificaron los factores socio-demográficos y prenatales que podrían influir en el desarrollo cognitivo; el IMC materno pre-concepcional se identificó como variable confusora (103). En las cohortes INMA (*Infancia y medio ambiente*) (España) y RHEA (*Estudio madre-hijo en Creta-Grecia*), Casas et al. (2013), estudiaron el neurodesarrollo de los niños a los 20 meses de edad mediante las escalas de desarrollo de Bayley, la I y la III, respectivamente; se pudo corroborar que los hijos de madres obesas muestran una

puntuación inferior en el desarrollo cognitivo a los 20 meses de edad respecto a los hijos de nacidos de madres sanas normopeso; no se observaron diferencias significativas en el desarrollo psicomotor (104). Por otra parte, Tanda et al. (2013), en Estados Unidos estudiaron 3412 niños con edades comprendidas entre 60-83 meses, nacidos de madres normopeso, sobrepeso y obesidad; comprobaron que los hijos de madres obesas obtenían puntuaciones más bajas en inteligencia que los hijos de madre normopeso (105). Más recientemente, Lisu Huang et al. (2014) en una muestra de 20000 niños Estadounidenses, hijos de madres normopeso, sobrepeso y obesidad, y evaluados a los 7 años de edad mediante *Wechsler Intelligence Scales* (WISC), demostraron una asociación entre la obesidad materna pre-concepcional y la obtención de puntuaciones más bajas en el CI de los niños, que empeoraban con el incremento del peso ganado durante el embarazo (106).

Por otra parte, en los años 70, un estudio realizado en Dinamarca en 4300 niños Sorensen et al. (1997) demostraron que el peso al nacimiento tiene una asociación positiva con el desarrollo de la inteligencia en la vida adulta; estos resultados rebatieron los obtenidos en numerosos estudios realizados en niños macrosómicos nacidos de madres obesas, que de forma reiterada habían mostrado la existencia de un peor desarrollo cognitivo en la edad escolar (107). Del mismo modo, Yang et al. (2008), en un estudio longitudinal llevado a cabo en niños entre los 5-12 años, demuestra que factores familiares como el tipo de educación, estado socioeconómico de la familia, número de hermanos o el tiempo que se le dedica al niño, son determinantes del desarrollo cognitivo en mayor medida que el propio ambiente intrauterino (108). Veldwijk et al. (2011), no pudieron demostrar la asociación entre el peso al nacimiento y el CI a los 4-7 años (K-ABC) (109).

Shaefer et al. (2000), en un estudio realizado en adultos nacidos en los años 50 y 60 en California (EEUU), demostró una relación significativa entre el IMC de la madre antes

del embarazo y el desarrollo de esquizofrenia; los niños nacidos de madres obesas tenían una probabilidad mayor de padecer esquizofrenia en la vida adulta, independientemente de otros factores perinatales (110). Por otra parte, Jones et al. (1998), en Finlandia, en adultos nacidos en los años 60 comprobaron una alta correlación entre bajo peso al nacimiento y el desarrollo de esquizofrenia (111). Kawai et al. (2000), estudiando una cohorte de 52 pacientes diagnosticados con esquizofrenia, comprobaron que uno de los factores implicados en el desarrollo de la esquizofrenia es el IMC materno pre-concepcional; a más IMC más probabilidad de que los hijos desarrollen esta patología mental (112).

Un estudio llevado a cabo en Suecia y Finlandia, Rodríguez et al. (2008), utilizando una gran cohorte de niños nacidos de madres normopeso, sobrepeso y obesidad, y controlando por el peso ganado durante el embarazo, mostraron una mayor prevalencia de TDAH en hijos nacidos de madres con sobrepeso u obesidad (113). Posteriormente, estos mismos autores (2010) replicaron el estudio anterior en niños de 5 años nacidos de madres normopeso, sobrepeso y obesidad, y comprobaron que los niños nacidos de madres con sobrepeso u obesidad mostraban más trastornos de atención (114). En otro estudio, Buss et al. (2012) evaluaron niños de 7,5 años nacidos de madres normopeso, sobrepeso y obesidad, mediante el test CBCL (*Child Behavior Checklist*) (conducta) y el test "Go-no-Go" (atención); demostraron un mayor riesgo de padecer TDAH en niños nacidos de madres obesas respecto a aquellos que nacieron de las madres con normopeso; en este caso la ganancia de peso durante la gestación no tuvo un efecto significativo (115). Van Lieshout et al. (2013) estudiaron el comportamiento de 2500 niños de 2 años nacidos de madres con diferente IMC mediante el test CBCL; concluyeron que los niños nacidos de madres con un mayor IMC presentaron más problemas externalizantes (116). Robinson et al. (2012) evaluaron de forma prospectiva 2900 parejas madre-hijo hasta los 17 años

de edad; tras ajustar por numerosas variables confusoras, demostraron que nacer de madres con sobrepeso u obesidad pre-concepcional influye en el desarrollo de problemas afectivos y alteraciones mentales tales como la depresión en los hijos a lo largo de su vida (117).

Es importante tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados que en muchos de los estudios referidos no se tuvo en cuenta en ningún momento la diabetes gestacional, incluyéndose madres normopeso, sobrepeso y obesas que además habían desarrollado esta patología metabólica (Tabla I.6).

Tabla I.6. Revisión bibliográfica de estudios de intervención y epidemiológicos respecto al papel de la obesidad materna en el desarrollo cognitivo y de enfermedades mentales

<i>Muestra</i>	<i>Diseño</i>	<i>Predictor</i>	<i>Objetivos de estudio/resultados</i>	<i>Principales hallazgos</i>	<i>Limitaciones</i>	
CI y Neurodesarrollo						
Neggers et al. (2003)	Madre-hijos EEUU (edad ~ 5 años) (N=355), nacidos entre 1985-1989	Cohorte de niños afroamericanos, con bajos ingresos cuyas madres fueron seleccionadas por bajos niveles de zinc en plasma	IMC informado por las madres a las 23 sem gestación IMC: analizada como un continuo y medida categórica. Grupo de referencia categórica: IMC = 19,8-26 Sobrepeso: 26,1-29 Obesas >29 Aumento de peso embarazo: analizada como variable continua.	Evaluación de la asociación del IMC materno pre-concepcional, el aumento de peso durante la gestación con el desarrollo psicomotor de los hijos.	Los hijos de madres obesas tienen mayor probabilidad de tener habilidades cognitivas disminuidas, pero no las motoras. Cada aumento de 1 unidad en el IMC materno se asocia a una reducción del CI (4.7 puntos más bajo) y el CI no verbal (5.6 puntos más bajo).	La muestra está altamente seleccionada (madres con bajos niveles de zinc) y pequeña. Las madres no eran muy participativas. No se ajustaron los resultados a la posible existencia de Diabetes.
Heikura et al. (2008)	Finlandia (1966, N=12058 y 1986, N=9.032) (~ 11,5 años de edad)	Estudio de 2 cohortes	IMC antes del embarazo informado a las 25 semanas de gestación	Análisis de la asociación de variables sociodemográficas maternas y de salud durante el embarazo sobre la capacidad intelectual. CI<70 (Discapacidad intelectual)	1.966: obesos: OR = 1,3, IC del 95%:0,5-3,1 1.986: obesos: OR = 3,6, IC del 95%: 2,0-6,6	Autoinforme materno de peso y altura en ~ 25 semanas gestación. No se ajustaron los resultados para la existencia de diabetes.
Hinkle et al. (2012)	Muestra EEUU N=6850	Estudio de Cohorte al nacimiento	IMC antes del embarazo. IMC: 25- 29,99 kg/m ² (sobrepeso). IMC: 30-34,99 kg/m ² (obesidad). IMC ≥35 kg/m ² (≥II clase obesas). Datos aportados por la madre	BSID-II formato corto a los 2 años. Índice de Desarrollo Mental (lenguaje / cognición). Índice de Desarrollo Psicomotor (habilidades motoras finas / gruesas)	Niños nacidos de madres Obesas clase ≥II: Puntuación total: β = -2,13 (IC del 95%, -3,32 -0,93). Riesgo de retraso grave: OR = 1,54 (IC del 95%, 1.14-2.10).	No se midió la cognición de los padres
Craig et al. (2012)	Estudio en EEUU n = 101 (2 años) n = 118 (8 años)	Estudio caso-control	IMC medido objetivamente en el 2º trimestre del embarazo.	BSID-III a los 2 años. WISC-III en 8 años	r = -0,16 (lenguaje). r = -0,20 (CI rendimiento mental)	Control de error: No se midió el CI materno.
Veldwijk et al. (2011)	Holanda N=236	Cohorte al nacimiento	IMC antes del embarazo. medido objetivamente.	K-ABC a los 4 años y 7 años	No se obtuvieron resultados significativos después de ajustar por las variables confusoras.	Diseño del estudio: el IMC y el desarrollo cognitivo no fue el objetivo principal de la investigación.
Tanda et al. (2013)	EEUU N=3412	Cohorte embarazadas	IMC antes del embarazo. IMC: 25-29,99 kg/m ² (sobrepeso) IMC ≥30 kg/m ² (obesidad). Ganancia de peso durante la gestación. Datos aportados por la madre	(PIAT) Pruebas de reconocimiento de lectura y de matemáticas a los y 5-7 años	Hijos de madres Obesas: <i>Reconocimiento lectura</i> 0,23 unidades SD (↓ 3 pts). Hijos de madres Obesas: <i>Matemáticas</i> 0,16 unidades SD (↓ 2 pts). No hay asociación con el aumento de peso	Control de error: No se tuvo en cuenta el CI paterno, ni la diabetes de la madre.
Brion et al. (2011)	Reino Unido y Holanda ALSPAC, N=5,000 y Generación R, n≈2,500	Dos cohortes de embarazadas	IMC antes del embarazo ≥25 kg/m ² (sobrepeso). Datos aportados por la madre	ALSPAC: MacArthur test de Comunicación en niños (38 meses). DANVA subtest de caras a los 8 años. WISC-II a los 8 años. SDQ padres a los 4 años.	↓ Longitud de la oración, OR=0,88 (IC 95%, 0,77-1,00). ↓ CI, OR=0,84 (95% IC, 0,73 hasta 0,98). Problemas totales CBCL: OR=1,21 (IC 95%, 1,00-1,47). CBCL externalización: OR=1,21 (IC 95%, 1,00-1,47).	Control de error: No se midieron los CI en los padres ni el riesgo de problemas psiquiátricos.

Profesor SDQ a los 8 años.
Generación R:
 Encuesta sobre el desarrollo del lenguaje a los 30 meses.
 PARCA a los 30 meses.
 CBCL padres a los 36 meses

TDAH

Rodríguez et al. (2008)	Escandinavia De 7 a 12 años de edad (N = 12 556). nacidos entre 1978-1987	3 cohortes prospectivas	IMC registros médicos a las 10 sem. de gestación. Grupo de referencia IMC: 19-26 kg/m ² . Sobrepeso >26 kg/m ² y peso ganado al durante el embarazo.	Examinar la asociación entre el IMC materno y/o aumento de peso durante la gestación y los síntomas principales del TDAH en los hijos en edad escolar.	Riesgo de TDAH: Sobrepeso (IMC>26): OR = 1,43, 95% IC 1,12-1,83). Por cada unidad de aumento del IMC: OR=1,04; IC 95%: 01.02 a 01.07). Para las mujeres con un IMC alto, el aumento de peso se incrementó aún más las probabilidades (OR = 1,24, 95% IC: 1,07-1,44).	El peso se evaluó a las 10 semanas de gestación y fue llamado "peso antes del embarazo". No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.
Rodríguez et al. (2010)	Suecia Niños de 5 años (N = 1.714). Nacidos entre 1999-2000	Estudio prospectivo desde el nacimiento	IMC pre-concepcional - registros médicos Tres grupos según IMC: - Referencia (20-25 kg/m ²) - Sobrepeso (25-30 kg/m ²) - Obesas (>30 kg/m ²)	Para evaluar la asociación entre la obesidad de la madre antes del embarazo y el riesgo de síntomas de TDAH en los niños.	El informe de los padres no aumenta la probabilidad en los resultados. Informe del docente: Sobrepeso materno: Falta de atención: OR = 2,00, 95% IC: 1,20-3,35. Emocionalidad negativa: OR=1,81; IC del 95%: 1,22-2,69. Obesidad materna: Falta de atención: OR = 2,09, 95% IC: 1,19 a 4,82.	No queda claro si la altura y el peso maternos son aportados por las madres o evaluados por los profesionales médicos. El sobrepeso materno es un factor de riesgo pero no la obesidad. Los hijos de madres con sobrepeso presentan más problemas específicos. No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.
Jongeling et al. (2010)	Australia N=2312	IMC antes del embarazo >30 kg/m ² Informado por la madre	Cohorte embarazadas	TDAH a los 5, 8, 10, o 14 años (informe de los padres)	OR = 2,58 (IC 95%, 1,22-5,45)	Control de error: No se midió el posible TDAH de los padres

Esquizofrenia

Jones et al. (1998)	Finlandia Participantes de hasta 28 años (N = 10 578). Nacidos en 1966	Cohorte prospectiva al nacimiento	IMC informado por la madre entre la semana 24-28 de embarazo IMC >29 kg/m ² Grupo de referencia 19-29 kg/m ²	Determinar la asociación entre problemas maternos y perinatales y el desarrollo de esquizofrenia en la edad adulta (Diagnóstico psiquiátrico)	IMC > 29 kg/m ² OR = 2.1, 95% IC 0.9-4.6	Estudio retrospectiva mediante auto-informe materno de peso y altura a las 24-28 semanas de gestación. No ajuste por riesgo familiar de esquizofrenia. No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.
Schaefer et al. (2000)	EEUU 30-38 años (63 casos y 6.570 controles). nacidos entre 1959-1967	Estudio caso-control prospectivo de cohorte desde el nacimiento	IMC tomado al inicio del estudio. Grupo de referencia entre 20-27 kg/m ² Grupo de obesas pre-gestacionales IMC>30 kg/m ²	Para examinar la relación entre el IMC y los trastornos del espectro esquizofrénico en su descendencia a la edad adulta. (Diagnóstico psiquiátrico)	Espectro de la esquizofrenia: Hijos de madres Obesas: RR = 2.9, 95% IC: 1.3-6.6 Esquizofrenia solo: RR = 2.7, 95% IC: 0,95-7,8	Alta tasa de abandono. No está clara la medición del Peso y altura al inicio del estudio. No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.
Wahlbeck et al. (2001)	Finlandia Personas nacidas entre 1924 y 1933 (N=7086)	Cohorte prospectiva al nacimiento	IMC al nacimiento tomado de los registros médicos. Grupo de referencia IMC>30 kg/m ²	Evaluar la influencia de la talla materna, la longitud al nacimiento y la talla en la infancia sobre el riesgo de desarrollar esquizofrenia	Hijos de madres con IMC< 30 kg/m ² : más probabilidad de padecer esquizofrenia (OR = 3,06; IC del 95%: 1,12-8,38) respecto a los nacidos de madres con IMC >30 kg/m ² .	Alta tasa de abandono. No se define el calendario de medidas de peso y talla de las madres.

				(Diagnóstico psiquiátrico)	Por cada unidad perdida de IMC materno, aumentan un 9% la probabilidad de que los hijos desarrollen esquizofrenia (OR=1,09, IC del 95% :1.2-1.17).	No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.
Kawai et al. (2004)	Japón Jóvenes de 20 años (Casos: N=52, Controles: N=6.570). Nacidos en ó después de 1966	Estudio Casos-Control	El IMC tomado en las primeras visitas en la clínica. El IMC fue tomado como una medida continua las 18.5 semanas y a las 38.5 semanas de gestación.	Evaluar la asociación de los factores prenatales y el desarrollo de esquizofrenia en la descendencia. (Diagnóstico psiquiátrico)	Por cada unidad de aumento del IMC materno al inicio del embarazo, las probabilidades de padecer esquizofrenia se incrementaron un 24% (OR=1,24, 95% IC: 1,02-1,50). Por cada unidad de aumento del IMC al final del embarazo, la probabilidad de padecer esquizofrenia aumentó un 19% (OR = 1,19; p <0,05).	Ningún ajuste por posible enfermedad mental de las madres. No se ajustaron los resultados para la diabetes gestacional u otros tipos de diabetes.

Trastornos del Comportamiento

Van Lieshout et al. (2013)	Australia N=2785	Cohorte de embarazadas	IMC antes del embarazo, informado por las madres	Temperamento al primer año. CBCL: Escalas internalización y externalización a los 2 años	$\beta = 0,13$ (IC del 95%: 0,01- 0,25) para externalización	No se controló el riesgo psiquiátrico de los padres
Robinson et al. (2013)	Australia N=2785	Cohorte embarazadas	IMC antes del embarazo 25-29,99 kg/m ² (sobrepeso). IMC ≥ 30 kg/m ² (obesidad). La percepción subjetiva sobre el peso informado por la madre	CBCL: DSM Escala de problemas afectivos (punto de corte clínico)	Sobrepeso: OR=1,51 (IC del 95%, 1,8-2,12). Obesos: OR=1,72 (IC 95%, 1,11-2,67)	No se controló el riesgo psiquiátrico de los padres
Buss et al. (2012)	Estados Unidos N=174	Cohorte embarazadas	IMC antes del embarazo. IMC: 25-29,99 kg/m ² (sobrepeso). IMC ≥ 30 kg/m ² (obesidad). Ganancia de peso durante la gestación. Medido objetivamente	Escala de falta de atención de CBCL a los 7 años. <i>Go-no-go</i> tarea (función ejecutiva)	Hijos de madres Obesas: F=4.80, P=0,03. Cohen's delta $\delta=0,54$, $\beta=0,18$. Hijos de madres Obesas: F=8.37, P=0.004. Cohen's delta $\delta =0,62$.	Muestra altamente seleccionada (criterios de exclusión múltiple)

3.3. Diabetes Gestacional y neurodesarrollo infantil

La diabetes es una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia (118, 119). La insulina es una hormona de origen pancreático la cual permite que la glucosa de los alimentos pase a las células del organismo, donde se convierte en energía para el funcionamiento de músculos y tejidos. Como resultado, el diabético no metaboliza la glucosa adecuadamente, de modo que ésta queda circulando en la sangre (hiperglucemia) provocando la macro- y microangiopatías diabéticas que determinan el daño tisular con el paso del tiempo, originando complicaciones potencialmente letales, tales como la neuropatía diabética, nefropatía diabética, alteraciones digestivas, incontinencia urinaria o impotencia, entre otras (120).

La diabetes gestacional (DG) como su propio nombre indica es aquella que se produce solo y exclusivamente durante el embarazo.

3.3.1. Diabetes Gestacional

La DG tiene lugar cuando se diagnostica diabetes por primera vez durante el embarazo a la madre, suele presentarse en una etapa avanzada de la gestación, o más precozmente cuando existen factores de riesgo como obesidad, DG en embarazo anterior, antecedentes familiares, etc., y surge debido a que el organismo no puede producir ni utilizar la suficiente insulina necesaria (121).

El test de screening que se utiliza normalmente para el diagnóstico de la diabetes gestacional se denomina test de O'Sullivan, y consiste en la determinación de la glucemia una hora después de la toma de 50 g de glucosa vía oral. Aquellas embarazadas con un

valor ≥ 140 g/dL son sometidas al test de diagnóstico con una sobrecarga oral de glucemia (SOG) de 100 g o 75 g, según los protocolos aceptados por las diferentes Sociedades de Obstetricia y Ginecología. Si la paciente presentara un valor de glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL o bien un valor de glucemia aleatorio ≥ 200 mg/dL no sería necesario realizar posteriormente la SOG, pues se diagnosticaría directamente de DG (122). Esta prueba de cribado es la que se sigue haciendo en la actualidad a todas las gestantes entre las semanas 24 y 28 en los hospitales españoles, y es el test recomendado por la *American College of Obstetricians and Gynaecologists* (ACOG) y la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia SEGO (123, 124). Se realiza entre las semanas 24 y 28, ya que es el periodo en el cual se manifiestan más los efectos diabetógenos de la gestación; no obstante, y siguiendo las recomendaciones actuales se están realizando pruebas de screening en embarazadas con riesgo en el primer trimestre de la gestación. La diabetes gestacional suele desarrollarse en una etapa avanzada de la gestación, el feto ya está bien formado, y continua con su crecimiento y desarrollo. El riesgo para el feto es, aunque menor respecto a las madres diabéticas tipo 1 o tipo 2, sin embargo, se ha demostrado que la DG igualmente puede provocar graves efectos de programación fetal con consecuencias a largo plazo para la descendencia. El control de la DG está protocolizado, y una vez diagnosticadas estas embarazadas son remitidas a los servicios de Endocrinología para su control hormonal, metabólico, y dietético (125).

La DG puede desaparecer tras el parto, sin embargo, las mujeres que han tenido DG tienen un mayor riesgo de desarrollar Diabetes tipo 2 o de volver a presentar DG en futuros embarazos. Los niños nacidos de madres con DG presentan un riesgo aumentado de desarrollar obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión y síndrome metabólico en la edad adulta (126).

Las mujeres con cualquier tipo de diabetes corren el riesgo de desarrollar durante el embarazo distintas complicaciones si no monitorizan y controlan estrechamente su enfermedad. Las embarazadas con diabetes tipo 1 son consideradas un grupo de alto riesgo, y necesitan más planificación y monitorización antes y durante la gestación a fin de minimizar el riesgo de complicaciones (127).

La hiperglucemia durante el embarazo puede provocar cambios en el crecimiento y desarrollo fetal con diferentes y variadas consecuencias, la más común la macrosomía; los bebés macrosomas suelen presentar hipoglucemia neonatal y otras complicaciones que requieren su tratamiento hospitalario. Los fetos expuestos a hiperglucemia presentan un mayor riesgo a largo plazo de desarrollar diabetes, obesidad, hipertensión, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, alteraciones del neurodesarrollo, trastornos de la conducta y enfermedades del sistema inmune (127, 128).

3.3.2. Neurodesarrollo en hijos de madres diabéticas.

Durante el embarazo existe un paso de nutrientes maternos hacia el feto a través de la placenta. Los cambios que afectan al metabolismo materno van a determinar alteraciones en la composición del plasma fetal, y por lo tanto, van a condicionar el desarrollo de los órganos fetales (129). La presencia de DG genera un ambiente no óptimo que compromete el desarrollo del feto, especialmente por los niveles elevados de glucosa en sangre (130). La hiperglucemia materna determina un paso transplacentario aumentado de glucosa hacia el feto determinando una hiperglucemia e hiperinsulinemia reactiva fetal (131). Se ha observado que el mal control de la enfermedad durante el 2º y 3er trimestres de la gestación estarían asociados a disfunciones neurológicas, especialmente relacionadas con el desarrollo de la corteza cerebral y de las áreas subcorticales (132),

tales como la migración, diferenciación celular, estratificación de neuronas corticales, mielinización y formación de sinapsis (51, 133). A las 20 semanas de gestación, el páncreas fetal es capaz de responder a la hiperglucemia, generando una mayor producción de insulina para mantener el control del nivel de glucosa. La hiperglucemia e hiperinsulinemia fetales determinan un aumento del metabolismo fetal de hasta un 30%, incrementando las necesidades de oxígeno en un 30%, y como consecuencia una hipoxia fetal crónica, que se evidencia por la elevación de concentración eritropoyetina sérica (*hormona especializada que estimula la producción de glóbulos rojos*) y un aumento compensatorio de la concentración de hemoglobina fetal. Esta hipoxia fetal crónica puede estar presente semanas anteriores al nacimiento y afectar potencialmente el desarrollo cerebral del feto (131, 132). La hipoxia crónica constituye un factor de riesgo significativo durante el desarrollo de determinadas áreas del sistema nervioso central (SNC), habiéndose comprobado su efecto negativo principalmente sobre el hipocampo (134).

Numerosos estudios llevados a cabo en hijos de madres con diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y DG, se han publicado resultados muy diversos, sin embargo de todos ellos se desprende la importancia de un buen control de la enfermedad durante la gestación para evitar problemas en el neurodesarrollo de los hijos.

Krakowiak et al. (2012), demostraron que los hijos de madres con DG tenían una mayor probabilidad de tener hijos con autismo (135). Dionne et al. (2008) comprobaron que la DG puede afectar al desarrollo del lenguaje en los hijos, concretamente el lenguaje expresivo; estos mismos autores sugieren la influencia de variables genéticas que podrían explicar los resultados en el retraso en el lenguaje de los niños nacidos de madres diabéticas. Otros factores, como un alto nivel de educación materna jugarían un papel protector muy importante, que podría enmascarar el efecto de la DG sobre el desarrollo

del lenguaje (136). BeBoer et al. (2005), observaron que los niños nacidos de embarazadas con diabetes tipo 1, puntuaban peor en desarrollo motor y cognitivo (Escala de Bayley II) a los 12 meses de edad respecto a los niños nacidos de madres sanas (137). Ornoy et al. (1998 y 1999) comprobaron un peor desarrollo cognitivo y una alteración mayor de la motricidad gruesa y fina en niños de 9 años de edad nacidos de madres con DG; además, determinaron una mayor probabilidad en estos niños de padecer trastornos de déficit de atención, hiperactividad e impulsividad (TDAH). Todos estos efectos eran más pronunciados en la edad temprana, disminuyendo progresivamente con el tiempo y no se relacionaron con el grado de control glucémico de las embarazadas (133, 138). Deregner et al. (2000), reportaron que los hijos de madres con diabetes (pregestacional o gestacional) muestran una alteración en la memoria de reconocimiento respecto a los hijos nacidos de madres sanas, medida mediante la técnica de potenciales evocados (ERP) (139). Catalano et al. (2010), demostraron que la resistencia a la insulina en mujeres embarazadas, a pesar del corto periodo de tiempo en el cual la padecen, puede afectar negativamente al desarrollo fetal, y que posteriormente el niño pueda desarrollar diversas patologías tanto de tipo neurológico como físico (140).

No obstante, por el momento, los resultados obtenidos relacionando la DG con el desarrollo cognitivo de los hijos, no son concluyentes. Abigail Fraser et al. (2012) en el estudio epidemiológico ALSPAC, concluyeron que la DG, pregestacional o la glucosuria en madres no diabéticas, se asocia de forma consistente a un menor desarrollo cognitivo y nivel educativo de los hijos entre los 4 y 6 años de edad; los niños nacidos de madres con DG presentaron 5 puntos menos en su CI respecto a los niños de madres no diabéticas; los peores resultados los obtuvieron los hijos nacidos de madres con DG y no los hijos nacidos de madres con diabetes pre-gestacional, y los niveles de glucosuria parecen tener una relación adversa con el CI del niño (141).

Plagemann et al. (2005) y Rodekamp et al. (2006) en estudios realizados con diabéticas pre-gestacionales y DG comprobaron que la lactancia materna juega un papel importante y controvertido, pues los hijos de madres diabéticas que fueron amamantados durante la primera semana de vida, y dependiendo de la cantidad de leche que ingirieran los niños, mostraron un retraso en pronunciar su primera palabra (inicio del lenguaje) que en algún caso llegó a ser de hasta 1 mes. Siendo la leche materna el alimento ideal para el correcto neurodesarrollo de los hijos, estos resultados sugieren la necesidad de verificar estos datos para diseñar recomendaciones específicas para las madres lactantes diabéticas (142, 143). Clausen et al. (2013) evaluaron a individuos de 18-27 años de edad nacidos de madres con DG con el fin de determinar el impacto de la diabetes materna a largo plazo sobre el desarrollo cognitivo, analizado mediante los tests RAVEN o el WISC. Los hijos de madres con DG obtuvieron puntuaciones inferiores en CI respecto a un grupo control de jóvenes de la misma edad nacidos de madres sanas; sin embargo, tras ajustar el modelo por variables confusoras como la edad materna, CI materno, nivel socioeconómico, etc... estas diferencias se perdieron (144).

La diabetes durante el embarazo puede afectar al desarrollo del cerebro de los hijos, induciendo un peor desarrollo neurológico a largo plazo, manifestándose en alteraciones o retrasos del desarrollo de funciones neurológicas importantes tales como la motricidad fina y gruesa, falta de atención, hiperactividad y cuadros de disfunción mínima, entre otros. No obstante, se necesitan más estudios que permitan dilucidar los mecanismos implicados en estos efectos así como los factores que influyen en las diferencias encontradas en los estudios realizados hasta el momento.

4. Polimorfismos genéticos y neurodesarrollo

Las características principales de forma, comportamiento y función de todos los organismos vivos conocidos son transmitidas de generación en generación a través de lo que denominamos información genética. Al conjunto de caracteres transmisibles se conoce como *genotipo* y su manifestación (*anatomía, fisiología y conducta*) se conoce como *fenotipo* (145). La información genética se encuentra en el núcleo de las células, y dentro de estas en los cromosomas. Los seres humanos poseen 23 pares de cromosomas donde se encuentra toda la información referida a las características propiamente dichas del ser humano. Los cromosomas están formados por largas cadenas de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y estas cadenas se dividen en segmentos funcionales que codifican cierta información más conocida como *genes* (146). El gen es la unidad de almacenamiento y transmisión de información de padres a hijos. Existen por los menos dos tipos de forma de cada gen, llamados *alelos*, uno procedente del padre y otro de la madre, estos pueden tener la misma o distinta información. La posición que ocupan en el cromosoma se conoce como *locus* en plural *loci*. El color de los ojos está determinado por los diferentes alelos, cuando los dos alelos contienen la misma información el individuo es *homocigoto* y cuando tienen información distinta es *heterocigoto* para esa característica. Cuando se juntan dos genes con distinta información, generalmente solo se manifiesta la información de uno de ellos, este se denomina gen *dominante* y al otro *recesivo* (147). Cuando combinamos diferentes alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos hablamos de un *haplotipo*, este puede ser un locus, varios loci, o incluso un cromosoma entero. Entendemos en genética y para comprender mejor nuestro estudio que un *haplotipo* es un conjunto de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en un cromosoma particular que se encuentran estadísticamente asociados (148).

4.1. PPARs (PPARG) funciones y características.

Los peroxisomas son organelas que se encuentran en las células eucariotas y albergan a las enzimas presentes en las reacciones metabólicas, mayormente implicadas en el metabolismo de los lípidos; los llamados proliferadores peroxisomales, como las tiazolidinedionas hipoglicémicas y plastificadores de uso industrial tales como el ácido ftálico y ciertos herbicidas pueden estimular un incremento de peroxisomas (149).

En estudios llevados a cabo en los años 90 acerca del funcionamiento de los peroxisomas se determinó que el sistema PPAR juega un papel muy importante dentro de la regulación de las vías metabólicas que se encuentran relacionadas con el balance energético, tales como el metabolismo lipídico, la termogénesis y la glucogénesis; también participa en el proceso inflamatorio con la producción de citoquinas, control del crecimiento y diferenciación celular (adipogénesis, macrófagos) y en la proliferación de celular neoplásica (tumores) (150, 151).

El PPAR es una proteína de aproximadamente 56 kD (Kilo-Dalton) perteneciente a la familia de los receptores nucleares, que se encarga de mediar los efectos de la expresión génica, hormonas esteroides, glucocorticoides, tiroxina, ácido retinoico y vitamina D. Se han diferenciado tres formas isomorfas del PPAR, con la denominación α , β , γ , que están codificadas por genes individuales con un alto grado de similitud; a día de hoy estos tres isotipos han sido identificados en muchas especies incluyendo a los seres humanos y los roedores (152). El gen PPAR γ , *PPARG*, está localizado en el cromosoma 3p25 y codificado en tres formas isómeras PPAR γ 1, PPAR γ 2 and PPAR γ 3; el γ 2, polimorfismo PPAR γ 2 (Pro12Ala) (rs1801282) (153), está siendo ampliamente investigado, y se ha

asociado, inconsistentemente, con el incremento de IMC (154), obesidad (155), diabetes Mellitus tipo II (156, 157), enfermedades coronarias (158), susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama (159) y otros problemas, incluyendo deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas (160-162). El control de la transcripción de los genes diana se lleva a cabo mediante un mecanismo regulado por los PPARs; la unión del ligando al PPAR resulta de la activación de éste como factor transcripcional, el receptor dimeriza, formando un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR), así mismo una vez activado el receptor se produce la unión a secuencias del ADN específicas del PPAR (PPRE), las cuales están presentes en los genes activos. Las proteínas se asociarían al extremo carboxílico de los receptores nucleares actuando como co-activadores o co-represores de la transcripción, este unión induciría un cambio conformacional en el receptor nuclear permitiendo el reclutamiento de dichos co-activadores o co-represores de la transcripción, tal y como se observa en la Figura I.2 (163, 164).

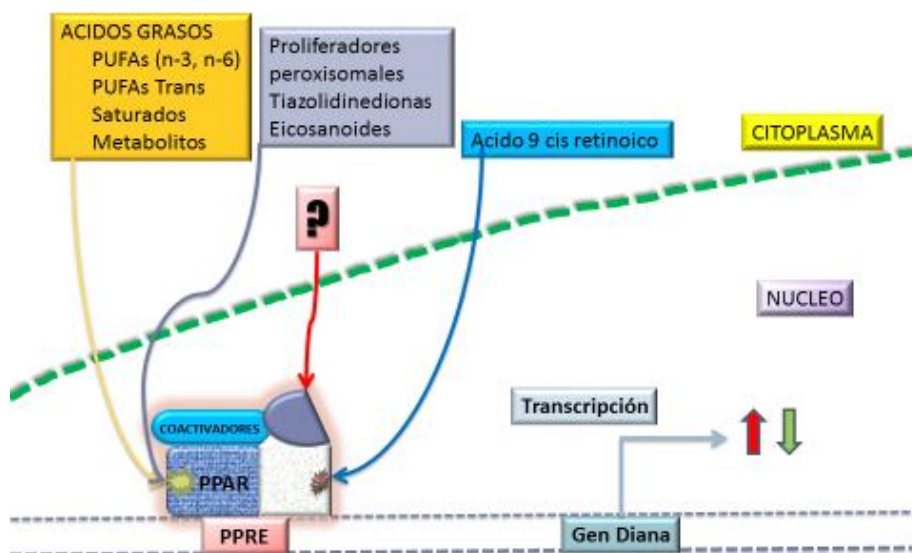


Figura I.2. Mecanismo básico de acción de PPAR. La activación del PPAR implica el cambio del receptor a una forma transcripcional activa. Por tanto, la unión tanto del ligando como de sus presuntos co-activadores al receptor con la formación de un heterodímero (proteína) con el receptor del ácido retinoico. El receptor activado por el ligando se une al elemento específico de respuesta en el ADN (PPRE), controlando la transcripción de genes diana (165).

Es importante destacar que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los eicosanoides derivados de AGPI esenciales y las tiazolidinedionas son activadores del PPAR (166). Las tiazolidinedionas son fármacos surgidos en los años 90 del siglo XX y su función es mejorar la sensibilidad de los tejidos blancos a la insulina por actuar como agonistas selectivos de receptores de la insulina localizados en el núcleo celular.

Es interesante destacar que de los PPARs, el PPAR γ es activado por el ácido Docosaheptaenoico (DHA) y no por el ácido linoleico (165). La función más estudiada del PPAR γ es su participación activa en el proceso de adipogénesis, a través de la diferenciación de los adipocitos y regulando la expresión de varias proteínas, las cuales parecen ser las responsables de la acumulación de los triglicéridos en los adipocitos (167); este mecanismo también podría estar implicado en la respuesta inmune (secreción de citoquinas) (168). Debido a la participación del PPAR γ en la diferenciación y función de los adipocitos, se piensa que podría desempeñar un importante papel en el desarrollo de la obesidad. Los fármacos anti-diabéticos son activadores de los PPARs y reducen la expresión de PPAR γ , determinando a su vez una reducción de la expresión del gen *ob* (que codifica la leptina), lo que estimularía la ingesta de alimentos y un aumento del tejido adiposo (169). Los niveles de PPARs están elevados tanto en humanos con obesidad como en animales; en estos casos se han observado altas concentraciones del mensajero del ácido ribonucleico del PPAR γ 2 en el tejido adiposo, lo que determinaría un IMC más alto, junto a un aumento de la proporción de PPAR γ 2/PPAR γ 1. Este efecto se ve disminuido cuando el individuo obeso realiza una baja ingesta calórica (170). Otra función del PPAR γ es su respuesta a la insulina, cuando existe un desajuste entre las calorías consumidas y gastadas es bastante probable que el individuo esté en el camino de desarrollar obesidad y/o cualquier trastorno metabólico asociado. Uno de estos trastornos metabólicos asociados, que además se ha convertido en epidemia en el mundo

desarrollado, es la resistencia a la insulina y el alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (171). Los fármacos dirigidos al tratamiento de la diabetes tipo 2 como la familia de las tiazolidinedionas tienen un efecto sobre el PPAR γ ; se cree que estimulan la transcripción del gen que codifica el transportador de glucosa (GLUT-4 y CAP). El papel del PPAR γ en la homeostasis de la glucosa involucra la modulación de la producción de citoquinas (TNF- α) y leptina por los adipocitos; en la obesidad se altera el metabolismo de la glucosa (a nivel muscular) y el metabolismo lipídico, modificando la respuesta de la insulina, en estas circunstancias el PPAR γ regula la expresión de los genes implicados en la homeostasis de la glucosa (GLUT-4) (172-174). El PPAR γ está regulado por la dieta y más concretamente por la ingesta de ácidos grasos, esto permite una modulación de la diferenciación de los pre-adipocitos. Una dieta rica en grasas saturadas conduce a la proliferación de células precursoras de adipocitos y a una hipertrofia del tejido adiposo, con una gran acumulación de triglicéridos. Sin embargo, las dietas ricas en AGPI, y sobre todo las ricas en omega 3 impiden la adipogénesis (175), este mecanismo estaría mediado por la regulación de la expresión génica del PPAR γ .

4.2. PPAR γ e implicaciones en el neurodesarrollo.

El PPAR γ juega un papel importante en la regulación de la inflamación a nivel del SNC y la neuro-protección (163, 176), contribuyendo al desarrollo cognitivo (163, 177). Aunque los PPARs han sido ampliamente estudiados como reguladores de los lípidos y el metabolismo de la glucosa, están implicados en el desarrollo de las funciones cognitivas y en las enfermedades neurodegenerativas (178-181), encontrándose expresados en todos los tipos de células en el cerebro. Recientes investigaciones en modelos animales han comprobado que el desarrollo cognitivo puede estar modulado a

través de los receptores nucleares del PPAR (179, 182). Aunque aún faltan más estudios que determinen el papel del PPAR γ y sus posibles co-factores en los procesos de desarrollo y protección cognitiva, por el momento todo parece indicar que su expresión génica actúa como protectora de enfermedades neurodegenerativas. La importancia del PPAR γ en la mejora cognitiva, posiblemente guarde relación con el estado nutricional de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tales como el DHA o el AA. En diferentes estudios, el PPAR γ parece tener un papel regulador y neuroprotector tanto en humanos como en animales de experimentación, favoreciendo el neurodesarrollo (183), y protegiendo el SNC durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (184-186), el Parkinson (187), la Esclerosis Múltiple o la Enfermedad de Huntington (180).

Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6 juegan un papel muy importante en el desarrollo cognitivo cerebral, estando implicados en el aprendizaje y la memoria espacial (64, 188, 189), siendo trascendental la existencia de una relación adecuada entre ellos (AA/DHA: 4:1) (190-192). Los PPARs son importantes como reguladores del metabolismo de estos lípidos, el PPAR γ se ha convertido en la clave para la interpretación de los estímulos nutricionales en los cambios de la expresión génica, especialmente de los genes implicados en el metabolismo lipídico.

De todo esto se deduce la necesidad de realizar estudios más profundos y detallados que tengan por objetivo dilucidar el papel de los factores determinantes más influyentes en el desarrollo de las estructuras y funciones cerebrales, tales como la genética, la nutrición materna, antes y durante el embarazo, el IMC materno, el desarrollo de DG o el ejercicio físico durante las etapas del desarrollo.

Bibliografía Introducción

1. Mills KL, Goddings AL, Clasen LS, Giedd JN, Blakemore SJ. The developmental mismatch in structural brain maturation during adolescence. *Developmental neuroscience*. 2014;36(3-4):147-60.
2. Prado EL, Dewey KG. Nutrition and brain development in early life. *Nutrition reviews*. 2014;72(4):267-84.
3. Ali SS. A brief review of risk-factors for growth and developmental delay among preschool children in developing countries. *Advanced biomedical research*. 2013;2:91.
4. Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. *Seminars in pediatric neurology*. 2006;13(3):158-65.
5. Dubois J, Dehaene-Lambertz G, Kulikova S, Poupon C, Huppi PS, Hertz-Pannier L. The early development of brain white matter: a review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. *Neuroscience*. 2014;276:48-71.
6. Johnson MH. Functional brain development in humans. *Nature reviews Neuroscience*. 2001;2(7):475-83.
7. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience*. 1991;14:453-501.
8. Kolb B, Whishaw IQ. Brain plasticity and behavior. *Annual review of psychology*. 1998;49:43-64.
9. Jacobs B, Schall M, Scheibel AB. A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. II. Gender, hemispheric, and environmental factors. *The Journal of comparative neurology*. 1993;327(1):97-111.
10. de Vries J, Byrne M, Kehoe E. Cognitive dissonance induction in everyday life: An fMRI study. *Social neuroscience*. 2014:1-14.
11. Elovathingal TJ, Chugani HT, Behen ME, Juhasz C, Muzik O, Maqbool M, et al. Abnormal brain connectivity in children after early severe socioemotional deprivation: a diffusion tensor imaging study. *Pediatrics*. 2006;117(6):2093-100.
12. Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H, Ullen F. Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nature neuroscience*. 2005;8(9):1148-50.
13. Juraska JM, Kopcik JR. Sex and environmental influences on the size and ultrastructure of the rat corpus callosum. *Brain research*. 1988;450(1-2):1-8.
14. Sanchez MM, Hearn EF, Do D, Rilling JK, Herndon JG. Differential rearing affects corpus callosum size and cognitive function of rhesus monkeys. *Brain research*. 1998;812(1-2):38-49.

15. Nevalainen P, Lauronen L, Pihko E. Development of Human Somatosensory Cortical Functions - What have We Learned from Magnetoencephalography: A Review. *Frontiers in human neuroscience*. 2014;8:158.
16. Scher MS. Normal and abnormal cerebrovascular development: gene-environment interactions during early life with later life consequences. *Handbook of clinical neurology*. 2013;112:1021-42.
17. Menzies L, Goddings A-L, Whitaker KJ, Blakemore S-J, Viner RM. The effects of puberty on white matter development in boys. *Developmental cognitive neuroscience*. 2015;11:116-28.
18. Costa MR, Muller U. Specification of excitatory neurons in the developing cerebral cortex: progenitor diversity and environmental influences. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:449.
19. Spear LP. Adolescent neurodevelopment. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2013;52(2 Suppl 2):S7-13.
20. Porton B, Wetsel WC, Kao HT. Synapsin III: role in neuronal plasticity and disease. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(4):416-24.
21. Gottschall PE, Howell MD. ADAMTS expression and function in central nervous system injury and disorders. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2015;44-46:70-6.
22. Cusick SE, Georgieff MK. Nutrient supplementation and neurodevelopment: timing is the key. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2012;166(5):481-2.
23. Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology*. 2014;30:503-33.
24. Chang S-E, Zhu DC, Choo AL, Angstadt M. White matter neuroanatomical differences in young children who stutter. *Brain*. 2015;138(3):694-711.
25. Milburn TF, Hipfner-Boucher K, Weitzman E, Greenberg J, Pelletier J, Girolametto L. Effects of coaching on educators' and preschoolers' use of references to print and phonological awareness during a small-group craft/writing activity. *Language, speech, and hearing services in schools*. 2015;46(2):94-111.
26. Hartley CA, Lee FS. Sensitive periods in affective development: Nonlinear maturation of fear learning. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(1):50-60.
27. Cardoso SD, Teles MC, Oliveira RF. Neurogenomic mechanisms of social plasticity. *The Journal of experimental biology*. 2015;218(Pt 1):140-9.
28. Felling RJ, Song H. Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery. *Experimental neurology*. 2015;268:37-45.
29. Stevens B, Fields RD. Response of Schwann cells to action potentials in development. *Science*. 2000;287(5461):2267-71.

30. Penhune V, de Villers-Sidani E. Time for new thinking about sensitive periods. *Frontiers in systems neuroscience*. 2014;8:55.
31. Kalia A, Lesmes LA, Dorr M, Gandhi T, Chatterjee G, Ganesh S, et al. Development of pattern vision following early and extended blindness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(5):2035-9.
32. Kolb B, Gibb R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent*. 2011;20(4):265-76.
33. Bierman KL, Nix RL, Greenberg MT, Blair C, Domitrovich CE. Executive functions and school readiness intervention: impact, moderation, and mediation in the Head Start REDI program. *Development and psychopathology*. 2008;20(3):821-43.
34. Moore JK, Linthicum FH, Jr. The human auditory system: a timeline of development. *International journal of audiology*. 2007;46(9):460-78.
35. Houston SM, Herting MM, Sowell ER. The neurobiology of childhood structural brain development: conception through adulthood. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2014;16:3-17.
36. Selemon LD. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Translational psychiatry*. 2013;3:e238.
37. Sioen I, Den Hond E, Nelen V, Van de Mieroop E, Croes K, Van Larebeke N, et al. Prenatal exposure to environmental contaminants and behavioural problems at age 7-8years. *Environment international*. 2013;59:225-31.
38. Blair C, Diamond A. Biological processes in prevention and intervention: the promotion of self-regulation as a means of preventing school failure. *Development and psychopathology*. 2008;20(3):899-911.
39. Davachi L, DuBrow S. How the hippocampus preserves order: the role of prediction and context. *Trends in cognitive sciences*. 2015;19(2):92-9.
40. Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain research*. 2015;1621:82-101.
41. Koizumi H. The concept of 'developing the brain': a new natural science for learning and education. *Brain & development*. 2004;26(7):434-41.
42. Clark J. Explaining Learning: From analysis to paralysis to hippocampus. *Educational Philosophy and Theory*. 2005;37(5).
43. Black AP, Brimblecombe J, Eyles H, Morris P, Vally H, K OD. Food subsidy programs and the health and nutritional status of disadvantaged families in high income countries: a systematic review. *BMC public health*. 2012;12:1099.

44. Elliott-Sale K, Barnett C, Sale C. Exercise interventions for weight management during pregnancy and up to 1 year postpartum among normal weight, overweight and obese women: a systematic review and meta-analysis. *British journal of sports medicine*. 2015;49(20):1336-42.
45. Davies M. A few thoughts about the mind, the brain, and a child with early deprivation. *The Journal of analytical psychology*. 2002;47(3):421-35.
46. Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, Pinnamaneni R, Foran A, Alderdice FA. Early Childhood Neurodevelopment After Intrauterine Growth Restriction: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2015;135(1):126-41.
47. Morgan G. On language acquisition in speech and sign: development of combinatorial structure in both modalities. *Frontiers in psychology*. 2014;5:1217.
48. Wellsby M, Pexman PM. Developing embodied cognition: insights from children's concepts and language processing. *Frontiers in psychology*. 2014;5:506.
49. Kim KH, Relkin NR, Lee KM, Hirsch J. Distinct cortical areas associated with native and second languages. *Nature*. 1997;388(6638):171-4.
50. Thompson RA, Nelson CA. Developmental science and the media. Early brain development. *The American psychologist*. 2001;56(1):5-15.
51. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(2):614S-20S.
52. Georgieff M, Rao R. The role of nutrition in cognitive development. *Handbook of developmental cognitive neuroscience*. 2001:491-504.
53. Kuratko CN, Barrett EC, Nelson EB, Salem N, Jr. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: a review. *Nutrients*. 2013;5(7):2777-810.
54. deRegnier RA, Long JD, Georgieff MK, Nelson CA. Using event-related potentials to study perinatal nutrition and brain development in infants of diabetic mothers. *Developmental neuropsychology*. 2007;31(3):379-96.
55. Innis SM, Lupton BA, Nelson CM. Biochemical and functional approaches to study of fatty acid requirements for very premature infants. *Nutrition*. 1994;10(1):72-6.
56. Cunnane SC, Crawford MA. Energetic and nutritional constraints on infant brain development: Implications for brain expansion during human evolution. *Journal of human evolution*. 2014;77:88-98.
57. Colombo J. Recent advances in infant cognition: implications for long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation studies. *Lipids*. 2001;36(9):919-26.
58. Lim SY, Suzuki H. Intakes of dietary docosahexaenoic acid ethyl ester and egg phosphatidylcholine improve maze-learning ability in young and old mice. *The Journal of nutrition*. 2000;130(6):1629-32.

59. Champoux M, Hibbeln JR, Shannon C, Majchrzak S, Suomi SJ, Salem N, Jr., et al. Fatty acid formula supplementation and neuromotor development in rhesus monkey neonates. *Pediatric research*. 2002;51(3):273-81.
60. Uauy R, Mena P, Wegher B, Nieto S, Salem N, Jr. Long chain polyunsaturated fatty acid formation in neonates: effect of gestational age and intrauterine growth. *Pediatric research*. 2000;47(1):127-35.
61. SanGiovanni JP, Parra-Cabrera S, Colditz GA, Berkey CS, Dwyer JT. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. *Pediatrics*. 2000;105(6):1292-8.
62. O'Connor DL, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M, Connor WE, et al. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2001;108(2):359-71.
63. Stonehouse W. Does consumption of LC omega-3 PUFA enhance cognitive performance in healthy school-aged children and throughout adulthood? Evidence from clinical trials. *Nutrients*. 2014;6(7):2730-58.
64. Delgado-Noguera MF, Calvache JA, Bonfill Cosp X. Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010(12):CD007901.
65. Doom JR, Georgieff MK. Striking while the iron is hot: Understanding the biological and neurodevelopmental effects of iron deficiency to optimize intervention in early childhood. *Current pediatrics reports*. 2014;2(4):291-8.
66. Wachs TD, Georgieff M, Cusick S, McEwen BS. Issues in the timing of integrated early interventions: contributions from nutrition, neuroscience, and psychological research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1308:89-106.
67. Doom JR, Gunnar MR, Georgieff MK, Kroupina MG, Frenn K, Fuglestad AJ, et al. Beyond stimulus deprivation: iron deficiency and cognitive deficits in postinstitutionalized children. *Child development*. 2014;85(5):1805-12.
68. Georgieff MK. The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 6):1267-71.
69. Jorgenson LA, Sun M, O'Connor M, Georgieff MK. Fetal iron deficiency disrupts the maturation of synaptic function and efficacy in area CA1 of the developing rat hippocampus. *Hippocampus*. 2005;15(8):1094-102.
70. Staffan K Berglund, Torres-Espinola Francisco Jose, Campoy C. The impact of maternal iron status on infant neurodevelopment in overweight, obese and gestational diabetes mothers. In Press. 2016

71. Ganesh D, Sagayaraj BM, Barua RK, Sharma N, Ranga U. Arnold Chiari malformation with spina bifida: a lost opportunity of folic Acid supplementation. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(12):OD01-3.
72. Vasquez AO, Suarez-Obando F. [Neural tube defects and folic acid: a historical overview of a highly successful preventive intervention.]. *Historia, ciencias, saude--Manguinhos*. 2015;0:0.
73. Barua S, Kuizon S, Junaid MA. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease. *Journal of biomedical science*. 2014;21:77.
74. Ars CL, Nijs IM, Marroun HE, Muetzel R, Schmidt M, Steenweg-de Graaff J, et al. Prenatal folate, homocysteine and vitamin B12 levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: the Generation R Study. *The British journal of nutrition*. 2016:1-9.
75. Ananthapavan J, Sacks G, Moodie M, Carter R. Economics of obesity - learning from the past to contribute to a better future. *International journal of environmental research and public health*. 2014;11(4):4007-25.
76. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414(6865):782-7.
77. Meetoo D, McGovern P, Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world. *Br J Nurs*. 2007;16(16):1002-7.
78. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiologic reviews*. 2007;29:1-5.
79. Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology clinics of North America*. 2010;39(1):1-7.
80. Ard J. Obesity in the US: what is the best role for primary care? *BMJ*. 2015;350:g7846.
81. Garcia-Labbe D, Ruka E, Bertrand OF, Voisine P, Costerousse O, Poirier P. Obesity and Coronary Artery Disease: Evaluation and Treatment. *The Canadian journal of cardiology*. 2015;31(2):184-94.
82. Mansur RB, Brietzke E, McIntyre RS. Is there a “metabolic-mood syndrome”? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015;52:89-104.
83. Ding EL, Malik VS. Convergence of obesity and high glycemic diet on compounding diabetes and cardiovascular risks in modernizing China: an emerging public health dilemma. *Globalization and health*. 2008;4:4.
84. Gersh BJ, Sliwa K, Mayosi BM, Yusuf S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *European heart journal*. 2010;31(6):642-8.

85. Campos D, Hernandez-Torres JJ, Agil A, Comino M, Lopez JC, Macias V, et al. Analysis of food advertising to children on Spanish television: probing exposure to television marketing. *Archives of medical science : AMS*. 2016;12(4):799-807.
86. Chen H, Wang Y. Do weight status and television viewing influence children's subsequent dietary changes? A National Longitudinal Study in the United States. *International journal of obesity*. 2015;39(6):931-8.
87. Schommer VA, Barbiero SM, Cesa CC, Oliveira R, Silva AD, Pellanda LC. Excess weight, anthropometric variables and blood pressure in schoolchildren aged 10 to 18 years. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2014;102(4):312-8.
88. Uebel K, Pusch K, Gedrich K, Schneider KT, Hauner H, Bader BL. Effect of maternal obesity with and without gestational diabetes on offspring subcutaneous and preperitoneal adipose tissue development from birth up to year-1. *BMC pregnancy and childbirth*. 2014;14(1):138.
89. Morgan KL, Rahman MA, Hill RA, Zhou SM, Bijlsma G, Khanom A, et al. Physical activity and excess weight in pregnancy have independent and unique effects on delivery and perinatal outcomes. *PloS one*. 2014;9(4):e94532.
90. Kaufer-Horwitz M, Toussaint G. Indicadores antropométricos para evaluar sobrepeso y obesidad en pediatría. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2008;65(6):502-18.
91. Boylan EA, McNulty BA, Walton J, Flynn A, Nugent AP, Gibney MJ. The prevalence and trends in overweight and obesity in Irish adults between 1990 and 2011. *Public health nutrition*. 2014:1-9.
92. Gravensen L, Sorensen TI, Petersen L, Sovio U, Kaakinen M, Sandbaek A, et al. Stability of the Associations between Early Life Risk Indicators and Adolescent Overweight over the Evolving Obesity Epidemic. *PloS one*. 2014;9(4):e95314.
93. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320(7244):1240-3.
94. Gilmore LA, Redman LM. Weight gain in pregnancy and application of the 2009 IOM guidelines: toward a uniform approach. *Obesity*. 2015;23(3):507-11.
95. INE: Instituto Nacional de Estadística. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Actualizado 14 Mar 2013; citado 15 Mar 2015]. Disponible en www.ine.es/prensa/np770.pdf
96. Miller BM, Brennan L. Measuring and reporting attrition from obesity treatment programs: A call to action! *Obesity research & clinical practice*. 2015;9(3):187-202.
97. Wills J, Crichton N, Lorenc A, Kelly M. Using population segmentation to inform local obesity strategy in England. *Health promotion international*. 2015;30(3):658-66.
98. Catalano PM. Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction*. 2010;140(3):365-71.

99. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology*. 2002;31(6):1235-9.
100. Hinkle SN, Schieve LA, Stein AD, Swan DW, Ramakrishnan U, Sharma AJ. Associations between maternal prepregnancy body mass index and child neurodevelopment at 2 years of age. *International journal of obesity*. 2012;36(10):1312-9.
101. Brion MJ, Zeegers M, Jaddoe V, Verhulst F, Tiemeier H, Lawlor DA, et al. Intrauterine effects of maternal prepregnancy overweight on child cognition and behavior in 2 cohorts. *Pediatrics*. 2011;127(1):e202-11.
102. Neggers YH, Goldenberg RL, Ramey SL, Cliver SP. Maternal prepregnancy body mass index and psychomotor development in children. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2003;82(3):235-40.
103. Heikura U, Taanila A, Hartikainen AL, Olsen P, Linna SL, von Wendt L, et al. Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: a study of the 20-year interval between two birth cohorts in northern Finland. *American journal of epidemiology*. 2008;167(2):169-77.
104. Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, et al. Maternal prepregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: two Southern European birth cohort studies. *International journal of epidemiology*. 2013;42(2):506-17.
105. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and child health journal*. 2013;17(2):222-9.
106. Huang L, Yu X, Keim S, Li L, Zhang L, Zhang J. Maternal prepregnancy obesity and child neurodevelopment in the Collaborative Perinatal Project. *International journal of epidemiology*. 2014;43(3):783-92.
107. Sorensen HT, Sabroe S, Olsen J, Rothman KJ, Gillman MW, Fischer P. Birth weight and cognitive function in young adult life: historical cohort study. *BMJ*. 1997;315(7105):401-3.
108. Yang S, Lynch J, Susser ES, Lawlor DA. Birth weight and cognitive ability in childhood among siblings and nonsiblings. *Pediatrics*. 2008;122(2):e350-8.
109. Veldwijk J, Scholtens S, Hornstra G, Bemelmans WJ. Body mass index and cognitive ability of young children. *Obesity facts*. 2011;4(4):264-9.
110. Schaefer CA, Brown AS, Wyatt RJ, Kline J, Begg MD, Bresnahan MA, et al. Maternal prepregnant body mass and risk of schizophrenia in adult offspring. *Schizophrenia bulletin*. 2000;26(2):275-86.
111. Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, Sipila P. Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. *The American journal of psychiatry*. 1998;155(3):355-64.

112. Kawai M, Minabe Y, Takagai S, Ogai M, Matsumoto H, Mori N, et al. Poor maternal care and high maternal body mass index in pregnancy as a risk factor for schizophrenia in offspring. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2004;110(4):257-63.
113. Rodriguez A, Miettunen J, Henriksen TB, Olsen J, Obel C, Taanila A, et al. Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: evidence from three prospective pregnancy cohorts. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(3):550-7.
114. Rodriguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2010;51(2):134-43.
115. Buss C, Entringer S, Davis EP, Hobel CJ, Swanson JM, Wadhwa PD, et al. Impaired executive function mediates the association between maternal pre-pregnancy body mass index and child ADHD symptoms. *PloS one*. 2012;7(6):e37758.
116. Van Lieshout RJ, Schmidt LA, Robinson M, Niccols A, Boyle MH. Maternal pre-pregnancy body mass index and offspring temperament and behavior at 1 and 2 years of age. *Child psychiatry and human development*. 2013;44(3):382-90.
117. Robinson M, Zubrick SR, Pennell CE, Van Lieshout RJ, Jacoby P, Beilin LJ, et al. Pre-pregnancy maternal overweight and obesity increase the risk for affective disorders in offspring. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2013;4(1):42-8.
118. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2002;55(1):65-85.
119. Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, et al. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Journal of diabetes investigation*. 2010;1(5):212-28.
120. Kaur S, Pandhi P, Dutta PD. Painful diabetic neuropathy: an update. *Annals of neurosciences*. 2011;18(4):168-75.
121. McIntyre HD, Colagiuri S, Roglic G, Hod M. Diagnosis of GDM: A suggested consensus. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2015;29(2):194-205.
122. Rojas-Carrera SI, Marquez-Celedonio FG, Lagunes-Mijangos A, Gonzalez-Arriola VM. [Early diagnostic accuracy of the O'Sullivan test in gestational diabetes]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013;51(3):336-9.
123. Moyer VA. Screening for gestational diabetes mellitus: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine*. 2014;160(6):414-20.
124. Plasencia W, Garcia R, Pereira S, Akolekar R, Nicolaides KH. Criteria for screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus in the first trimester of pregnancy. *Fetal diagnosis and therapy*. 2011;30(2):108-15.

125. Garcia-Saez G, Rigla M, Martinez-Sarriegui I, Shalom E, Peleg M, Broens T, et al. Patient-oriented Computerized Clinical Guidelines for Mobile Decision Support in Gestational Diabetes. *Journal of diabetes science and technology*. 2014;8(2):238-46.
126. Holder T, Giannini C, Santoro N, Pierpont B, Shaw M, Duran E, et al. A low disposition index in adolescent offspring of mothers with gestational diabetes: a risk marker for the development of impaired glucose tolerance in youth. *Diabetologia*. 2014;57(11):2413-20.
127. Chang Y, Chen X, Zhang ZK. Intrauterine Exposure to Maternal Diabetes is Associated with Adiposity in Children at 6 Years of Age in China. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2015;28(2):140-2.
128. Varadinova M, Metodieva R, Boyadjieva N. [Gestational and non-gestational factors for perinatal programming of insulin resistance]. *Akusherstvo i ginekologija*. 2014;53(5):36-41.
129. Innis SM. Fatty acids and early human development. *Early human development*. 2007;83(12):761-6.
130. Holme AM, Roland MC, Lorentzen B, Michelsen TM, Henriksen T. Placental glucose transfer: a human in vivo study. *PloS one*. 2015;10(2):e0117084.
131. Sesma HW, Georgieff MK. The effect of adverse intrauterine and newborn environments on cognitive development: the experiences of premature delivery and diabetes during pregnancy. *Development and psychopathology*. 2003;15(4):991-1015.
132. Georgieff MK. The effect of maternal diabetes during pregnancy on the neurodevelopment of offspring. *Minnesota medicine*. 2006;89(3):44-7.
133. Ornoy A, Wolf A, Ratzon N, Greenbaum C, Dulitzky M. Neurodevelopmental outcome at early school age of children born to mothers with gestational diabetes. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1999;81(1):F10-4.
134. Barks JD, Sun R, Malinak C, Silverstein FS. gp120, an HIV-1 protein, increases susceptibility to hypoglycemic and ischemic brain injury in perinatal rats. *Exp Neurol*. 1995;132(1):123-33.
135. Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, et al. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1121-8.
136. Dionne G, Boivin M, Seguin JR, Perusse D, Tremblay RE. Gestational diabetes hinders language development in offspring. *Pediatrics*. 2008;122(5):e1073-9.
137. DeBoer T, Wewerka S, Bauer PJ, Georgieff MK, Nelson CA. Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. *Developmental medicine and child neurology*. 2005;47(8):525-31.
138. Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Peretz E, Soriano D, Dulitzky M. Neurobehaviour of school age children born to diabetic mothers. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1998;79(2):F94-9.

139. Deregnier RA, Nelson CA, Thomas KM, Wewerka S, Georgieff MK. Neurophysiologic evaluation of auditory recognition memory in healthy newborn infants and infants of diabetic mothers. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(6):777-84.
140. Catalano PM. The impact of gestational diabetes and maternal obesity on the mother and her offspring. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2010;1(4):208-15.
141. Fraser A, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Lawlor DA. Associations of existing diabetes, gestational diabetes, and glycosuria with offspring IQ and educational attainment: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:963735.
142. Rodekamp E, Harder T, Kohlhoff R, Dudenhausen JW, Plagemann A. Impact of breast-feeding on psychomotor and neuropsychological development in children of diabetic mothers: role of the late neonatal period. *Journal of perinatal medicine*. 2006;34(6):490-6.
143. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Fahrenkrog S, Rodekamp E, Franke K, et al. Impact of early neonatal breast-feeding on psychomotor and neuropsychological development in children of diabetic mothers. *Diabetes care*. 2005;28(3):573-8.
144. Clausen TD, Mortensen EL, Schmidt L, Mathiesen ER, Hansen T, Jensen DM, et al. Cognitive function in adult offspring of women with gestational diabetes--the role of glucose and other factors. *PloS one*. 2013;8(6):e67107.
145. Nesheva D. Aspects of ancient mitochondrial DNA analysis in different populations for understanding human evolution. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2014;17(1):5-14.
146. Chatron N, Haddad V, Andrieux J, Désir J, Boute O, Dieux A, et al. Refinement of genotype-phenotype correlation in 18 patients carrying a 1q24q25 deletion. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(5):1008-17.
147. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015;26(4):193-200.
148. Zhou L, Zong L, Zhang LL, Deng C, Zhao CY. [Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter of GABAA receptor beta2 subunit gene with schizophrenia]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2015;35(2):256-9.
149. Kumar S, Kawalek A, van der Klei IJ. Peroxisomal quality control mechanisms. *Current opinion in microbiology*. 2014;22C:30-7.
150. Smith SA. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):1086-90.
151. Barnett AH. Redefining the role of thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes. *Vascular health and risk management*. 2009;5(1):141-51.
152. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell*. 2005;123(6):993-9.
153. Garcia-Calzon S, Martinez-Gonzalez MA, Razquin C, Corella D, Salas-Salvado J, Martinez JA, et al. Pro12Ala Polymorphism of the PPARgamma2 Gene Interacts With a

Mediterranean Diet to Prevent Telomere Shortening in the PREDIMED-NAVARRA Randomized Trial. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2015;8(1):91-9.

154. Galbete C, Toledo E, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Guillen-Grima F, Marti A. Pro12Ala variant of the PPAR γ 2 gene increases body mass index: An updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity*. 2013;21(7):1486-95.

155. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2005;162(2):101-14.

156. Chan KH, Niu T, Ma Y, You NC, Song Y, Sobel EM, et al. Common genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) and type 2 diabetes risk among Women's Health Initiative postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):E600-4.

157. Trombetta M, Bonetti S, Boselli ML, Miccoli R, Trabetti E, Malerba G, et al. PPAR γ 2 Pro12Ala and ADAMTS9 rs4607103 as "insulin resistance loci" and "insulin secretion loci" in Italian individuals. The GENFIEV study and the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 4. *Acta Diabetol*. 2013;50(3):401-8.

158. Wu Z, Lou Y, Jin W, Liu Y, Lu L, Lu G. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene (PPAR γ 2) is associated with increased risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(12):e53105.

159. Mao Q, Guo H, Gao L, Wang H, Ma X. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Med Rep*. 2013;8(6):1773-8.

160. West NA, Haan MN, Morgenstern H. The PPAR-gamma Pro12Ala polymorphism and risk of cognitive impairment in a longitudinal study. *Neurobiol Aging*. 2010;31(5):741-6.

161. d'Abramo C, Zingg JM, Pizzuti A, Argellati F, Pronzato MA, Ricciarelli R. In vitro effect of PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism on the deposition of Alzheimer's amyloid-beta peptides. *Brain research*. 2007;1173:1-5.

162. He W. PPAR γ 2 polymorphism and human health. *PPAR Res*. 2009;2009:849538.

163. Deplanque D. [Cell protection through PPAR nuclear receptor activation]. *Therapie*. 2004;59(1):25-9.

164. Schwanbeck R. The role of epigenetic mechanisms in Notch signaling during development. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(5):969-81.

165. Uauy R, Martinez JI, Rojas CV. [Molecular nutrition, role of the PPAR system in lipidic metabolism and its importance in obesity and diabetes mellitus]. *Revista medica de Chile*. 2000;128(4):437-46.

166. Gottlicher M, Demoz A, Svensson D, Tollet P, Berge RK, Gustafsson JA. Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochemical pharmacology*. 1993;46(12):2177-84.

167. Wang X-l, Shang X, Cui Y, Zhao X, Zhang Y, Xie M-l. Osthole inhibits inflammatory cytokine release through PPAR α/γ -mediated mechanisms in LPS-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2015;37(2):185-92.
168. Sun YN, Gao Y, Qiao SP, Wang SZ, Duan K, Wang YX, et al. Epigenetic DNA methylation in the promoters of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in chicken lines divergently selected for fatness. *Journal of animal science*. 2014;92(1):48-53.
169. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, et al. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(4):1004-9.
170. Yoo HJ, Hwang HJ, Jung TW, Ryu JY, Hong HC, Choi HY, et al. Adipose gene expression profiles related to metabolic syndrome using microarray analyses in two different models. *Diabetes & metabolism journal*. 2014;38(5):356-65.
171. Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review. *Biochemical pharmacology*. 2014;92(1):73-89.
172. Navarrete-Vazquez G, Torres-Gomez H, Hidalgo-Figueroa S, Ramirez-Espinosa JJ, Estrada-Soto S, Medina-Franco JL, et al. Synthesis, in vitro and in silico studies of a PPARgamma and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014;24(18):4575-9.
173. Zheng F, Zhang S, Lu W, Wu F, Yin X, Yu D, et al. Regulation of insulin resistance and adiponectin signaling in adipose tissue by liver X receptor activation highlights a cross-talk with PPARgamma. *PloS one*. 2014;9(6):e101269.
174. Puhl AC, Bernardes A, Silveira RL, Yuan J, Campos JL, Saidenberg DM, et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by luteolin. *Molecular pharmacology*. 2012;81(6):788-99.
175. Wojcik C, Lohe K, Kuang C, Xiao Y, Jouni Z, Poels E. Modulation of adipocyte differentiation by omega-3 polyunsaturated fatty acids involves the ubiquitin-proteasome system. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(4):590-9.
176. Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur J Pharmacol*. 2008;589(1-3):176-9.
177. Rinwa P, Kaur B, Jaggi AS, Singh N. Involvement of PPAR-gamma in curcumin-mediated beneficial effects in experimental dementia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010;381(6):529-39.
178. Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochem Int*. 2013;63(4):322-30.

179. Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC Neurosci.* 2012;13:109.
180. Katsouri L, Blondrath K, Sastre M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma cofactors in neurodegeneration. *IUBMB life.* 2012;64(12):958-64.
181. Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPARgamma activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun.* 2013;29:28-38.
182. Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem.* 2009;16(5):332-7.
183. Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC neuroscience.* 2012;13:109.
184. Jahrling JB, Hernandez CM, Denner L, Dineley KT. PPARgamma recruitment to active ERK during memory consolidation is required for Alzheimer's disease-related cognitive enhancement. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2014;34(11):4054-63.
185. Lourenco MV, Ledo JH. Targeting Alzheimer's pathology through PPARgamma signaling: modulation of microglial function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(12):5083-4.
186. Sakurai T. Targets of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist trials for the prevention of Alzheimer disease. *Archives of neurology.* 2011;68(4):542; author reply -3.
187. Shibata N, Motoi Y, Tomiyama H, Ohnuma T, Kuerban B, Tomson K, et al. Lack of Genetic Associations of PPAR-gamma and PGC-1alpha with Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease with Dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra.* 2013;3(1):161-7.
188. Rogers LK, Valentine CJ, Keim SA. DHA supplementation: current implications in pregnancy and childhood. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 2013;70(1):13-9.
189. Guesnet P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie.* 2011;93(1):7-12.
190. Buretic-Tomljanovic A, Giacometti J, Nadalin S, Rubesa G, Vulin M, Tomljanovic D. Phospholipid membrane abnormalities and reduced niacin skin flush response in schizophrenia. *Psychiatria Danubina.* 2008;20(3):372-83.

191. van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Fokkema MR, van der Iest TH, Muskiet FA. Maternal and fetal brain contents of docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) at various essential fatty acid (EFA), DHA and AA dietary intakes during pregnancy in mice. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2008;78(3):159-69.
192. Zeman M, Jirak R, Vecka M, Raboch J, Zak A. N-3 polyunsaturated fatty acids in psychiatric diseases: mechanisms and clinical data. Neuro endocrinology letters. 2012;33(8):736-48.

Capítulo 2

Justificación y Objetivos

Capítulo 2. Justificación y Objetivos

El desarrollo humano es un proceso altamente complejo, influenciado por un amplio rango de interacciones genéticas y factores ambientales. El periodo de desarrollo embrio-fetal es uno de los más vulnerables en la vida humana. Los cambios que tengan lugar en el ambiente intrauterino van a impactar sobre el desarrollo del nuevo ser, con efectos a largo plazo que alcanzarán no sólo la infancia sino también en la vida adulta. Durante la vida precoz existen diversas "*ventanas críticas*" para el desarrollo cerebral que pueden influir de forma permanente en el neurodesarrollo final del individuo; los efectos de factores ambientales, metabólicos y nutricionales desfavorables durante la gestación pueden determinar diversas alteraciones a largo plazo, incluso cambios en la estructura y función cerebral, merma de las capacidades intelectuales o trastornos de la conducta, lo cual va a tener un gran impacto en la vida del nuevo ser.

Se ha comprobado que durante la vida fetal y los primeros años de vida se produce una "*programación*" e "*imprinting*" metabólicos tempranos mediados por el estado nutricional y metabólico materno, la alimentación en los primeros 2 años de vida y otros factores ambientales socio-económicos, culturales y demográficos. Esta programación va a determinar el neurodesarrollo, pero hoy día sabemos que existe la posibilidad de modificar la evolución de efectos patológicos originados previamente, mediante correctas intervenciones dietéticas, de actividad física y en general estilos de vida saludables, y mediante la mejora de las condiciones socioeconómicas.

El desarrollo cerebral comienza en la etapa embrionaria durante el primer trimestre de la gestación, y continua a lo largo del embarazo donde van a ir aconteciendo procesos muy importantes tales como la reproducción y diferenciación celular de las distintas

neuronas, la formación de las diferentes estructuras cerebrales, o el desarrollo de los procesos de arborización dendrítica y sinaptogénesis. Durante el 2º trimestre de la gestación, y especialmente, durante el 3º, estos procesos se intensifican de una forma exponencial, y van a continuar muy activos durante los 2 primeros años de vida. Al nacer ya existe un desarrollo cerebral de alrededor del 90% con un peso cerebral de 350 gramos. Tras el nacimiento continúa el desarrollo tanto en incremento de peso (900 gramos a los dos años) y volumen cerebral, como en la especialización de las diferentes estructuras, el proceso de poda y el establecimiento de las interconexiones cerebrales más finas y adecuadas para el correcto funcionamiento cerebral. A los 5 años se alcanza un peso cerebral de 1200 g casi el total del adulto. Después, son necesarios otros 12-14 años para completar el volumen y peso total, haciéndose cada vez más especializado. Hoy día se sabe que el cerebro sigue modificándose y especializándose incluso más allá los 30 años y que tiene una enorme capacidad plástica, hasta ahora desconocida, más allá de la edad cronológica que correspondería aparentemente a su desarrollo completo (1).

El peso de la madre antes de la gestación, la ganancia de peso durante el embarazo, la dieta materna y diversas patologías metabólicas tales como la obesidad y/o la diabetes gestacional, pueden afectar al neurodesarrollo posterior de los hijos.

El seguimiento actual de las embarazadas diagnosticadas de diabetes gestacional contempla la integración en un programa de control de dieta, corrección farmacológica de la hiperglucemia en la medida necesaria, actividad física, control de la ganancia de peso y control exhaustivo del embarazo. Este protocolo establecido y aprobado por los Organismos Oficiales y Sociedades de Obstetricia y Ginecología¹ en todo el mundo

¹ *Estrategia Nacional de Salud Sexual y Reproductiva. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. 2011*

tiene por objeto la prevención del desarrollo de macrosomía fetal y las consecuencias patológicas conocidas para los hijos nacidos de madres diabéticas (*hipoglucemia neonatal, mayor riesgo de obesidad a largo plazo, alteraciones orgánicas, y alteraciones neurocognitivas, entre otras*).

Por otra parte, la epidemia de obesidad que está azotando tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo, está determinando que un alto porcentaje de mujeres en edad de procrear (>20% en Europa) presenten al llegar a la gestación un exceso de peso (2), sobrepeso/obesidad, con las co-morbilidades asociadas tales como alteraciones metabólicas relacionadas con la homeostasis de la glucemia, hipertensión, hipercolesterolemia,... Estas futuras mamás deben ser también informadas y protegidas frente a una excesiva ganancia de peso durante la gestación, el desarrollo de diabetes gestacional y el mayor riesgo de tener un embarazo complicado. Además, la estrategia de prevención debe contemplar el efecto de "*programación fetal*" comentado, pues los recientes avances científicos están demostrando que las actuaciones precoces van a tener un impacto muy alto sobre la sociedad, a nivel personal y también de salud pública, tanto para la salud como desde el punto de vista económico y de desarrollo social.

Los factores genéticos van a ser determinantes de todo el proceso de neurodesarrollo, y pueden influir en el desarrollo de diversas patologías que se van a manifestar durante la infancia, la adolescencia, la juventud o la vida adulta. La genética del propio individuo va a influir a lo largo de su vida, pero en etapas muy precoces del desarrollo como es la vida fetal, la genética materna también va a jugar un papel determinante del neurodesarrollo en su hijo. La genética materna puede ser moduladora del paso de nutrientes a través de la placenta provocando excesos o deficiencias con consecuencias

a corto, medio y largo plazo sobre el desarrollo cerebral. Además, los trastornos metabólicos maternos van a condicionar cambios adaptativos de la expresión génica tanto en la placenta como en los tejidos fetales, que determinarán el desarrollo y funcionamiento de los órganos del bebé para toda su vida.

La aplicación de nuevas estrategias para la mejora del neurodesarrollo y la prevención de la obesidad en los niños pueden jugar un papel importante en la "*reprogramación*" de la expresión génica alcanzada durante la gestación y así paliar en parte los efectos no beneficiosos provocados por factores desfavorables. Esta teoría de la *re-programación* se vislumbra en el horizonte más cercano como un arma preventiva de primer nivel en todo el mundo, por lo que numerosos investigadores y empresas están trabajando para el desarrollo de nuevas terapias avanzadas que ayuden a disminuir el impacto negativo sobre la salud y la sociedad, determinados por una errónea programación de órganos y tejidos en el feto y durante los primeros 2 años de la vida ("*los primeros "1000 días"*").

El presente trabajo se justifica por la falta de evidencia científica acerca del patrón de crecimiento y desarrollo en niños nacidos de madres con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional (3).

Los **objetivos** del presente estudio son:

- 1) Estudiar las diferencias en la ganancia de peso y evolución del embarazo entre las embarazadas con sobrepeso, obesidad y/o diabetes gestacional frente al grupo control.
- 2) Analizar los efectos de la obesidad y/o diabetes gestacional maternas sobre biomarcadores bioquímicos, metabólicos, inflamatorios e inmunológicos y su influencia sobre el crecimiento fetal.

- 3) Determinar la influencia a largo plazo de la obesidad y/o la diabetes maternas sobre el neurodesarrollo de los hijos durante el primer año y medio de vida.
- 4) Evaluar los efectos de diferentes polimorfismos genéticos del PPAR- γ Pro12-Ala, tanto en la madre como en sus hijos, sobre el neurodesarrollo de los niños.

Bibliografía –Justificación y Objetivos

1. Mills KL, Goddings A-L, Clasen LS, Giedd JN, Blakemore S-J. The developmental mismatch in structural brain maturation during adolescence. *Developmental neuroscience*. 2014;36(3-4):147-60.
2. Witteveen T, Zwart JJ, Gast KB, Bloemenkamp KW, van Roosmalen J. Overweight and severe acute maternal morbidity in a low-risk pregnant population in the Netherlands. *PloS one*. 2013;8(9):e74494.
3. Camprubi Robles M, Campoy C, Garcia Fernandez L, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Martin MJ. Maternal Diabetes and Cognitive Performance in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2015;10(11):e0142583.

Capítulo 3

Metodología

Capítulo 3. Metodología

3.1 Diseño de estudio y sujetos

El estudio PREOBE en el que se enmarca la presente Tesis Doctoral fue diseñado como un estudio prospectivo observacional de una cohorte “madre-hijo”. El reclutamiento de las embarazadas se realizó entre los años 2008 y 2012 en los Hospitales Clínico Universitario San Cecilio y Materno Infantil de Granada.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

- Embarazo único entre las 12-20 semanas de gestación (*preferentemente antes de las 20 semanas*). Algunas embarazadas se reclutaron a las 34 semanas tras el diagnóstico de diabetes gestacional.
- Edad comprendida entre los 18-45 años
- No participantes en otros estudios de investigación
- Que no tomaran ningún tratamiento farmacológico
- Que no llevaran una dieta vegana
- Que no presentaran enfermedades diagnosticadas diferentes a obesidad, sobrepeso o diabetes gestacional.

En total 474 mujeres embarazadas fueron invitadas a participar en el estudio. Diecinueve no cumplían con los criterios de inclusión, 15 eran diabéticas pre-gestacionales, 4 tenían bajo peso y 124 no vinieron a la primera visita de estudio (sin indicar el motivo). De los 124 casos de abandono temprano en su mayoría eran madres sanas normo peso (n=107), y de similares características a las madres normo peso que se quedaron en el estudio. Finalmente, 331 madres quedaron incluidas en el estudio; 269 lo hicieron antes de las 24 semanas de gestación. También se incluyeron un total de 62

mujeres con diagnóstico de diabetes gestacional en la semana 34 del embarazo (Fig. M.1).

Las embarazadas participantes fueron clasificadas en cuatro grupos según el índice de masa corporal (IMC) pre-concepcional o la presencia de diabetes gestacional.

1. **Normo peso** ($18,5 \leq \text{IMC} < 25$ y sin diagnóstico de diabetes gestacional), $n=132$
2. **Sobrepeso** ($25 \leq \text{IMC} < 30$ y sin diagnóstico de diabetes gestacional), $n=56$
3. **Obesidad** ($\text{IMC} \geq 30$ y sin diagnóstico de diabetes gestacional), $n=64$
4. **Diabetes gestacional** ($\text{IMC} \geq 18,5$), $n=79$

En el grupo de madres con diabetes gestacional se incluyeron tanto las madres reclutadas al inicio del estudio como aquellas diagnosticadas a la semana 34 de embarazo, e independientemente del IMC que tenían antes de quedarse embarazadas {peso normal ($n=32$), sobrepeso ($n=23$) y obesidad ($n=24$)}. El diagnóstico de diabetes gestacional se realizó mediante la prueba de tolerancia oral de la glucosa (PTOG), siguiendo los criterios del *National Diabetes Data Group* (1), la *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia* (SEGO) y la *3ª Conferencia Internacional sobre la Diabetes Mellitus Gestacional* (2). Tras el diagnóstico de diabetes gestacional, las embarazadas siguieron el protocolo establecido por la SEGO quedando incluidas en un programa endocrino-nutricional realizado por el médico, con el fin de optimizar el control de la glucosa mediante recomendaciones nutricionales y cambio en el estilo de vida, y cuando fue necesario recibieron tratamiento médico (*antidiabéticos orales o terapia de insulina*). Las embarazadas con sobrepeso u obesidad que no desarrollaron diabetes gestacional no recibieron ningún tipo de intervención.

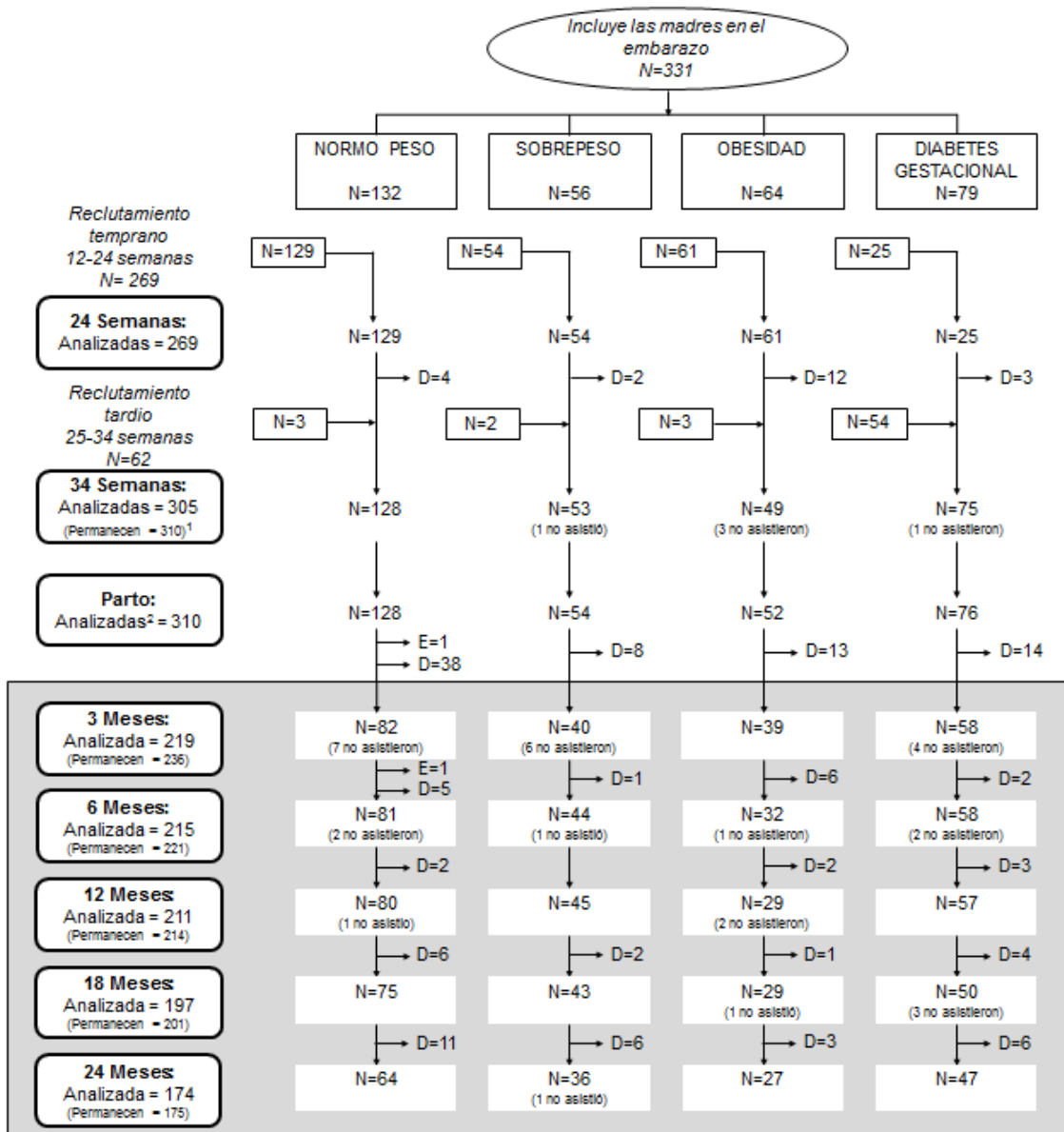


Figure M.1. En la figura se muestran los abandonos y número de visitas en cada etapa del estudio. ¹ En cada visita, algunos casos no asistieron pero permanecieron en el ensayo para las visitas posteriores. ² En el parto, los datos perinatales (peso al nacer del bebé, etc.) están disponibles en 303 casos, pero las muestras de sangre y/o de la placenta sólo en 245 casos. En 7 casos se perdieron todos los datos, pero fueron recuperados mediante entrevista telefónica. D = Abandonos y E = exclusiones (1 bebé tras el parto debido a enfermedad cardíaca congénita y 1 antes de seis meses de seguimiento, debido a inmunodeficiencia severa).

El proyecto PREOBE fue aprobado por los Comités de Bioética de Investigación de ambos hospitales (Clínico Universitario y Materno-Infantil), así como por el Comité de Ética de la Universidad de Granada. Tras recibir información detallada y antes del inicio del estudio se obtuvo el consentimiento informado por parte de todas las participantes.

3.2 Estudios realizados en las parejas madre-hijo participantes en el estudio PREOBE

Durante el seguimiento de las embarazadas e hijos participantes en el Proyecto PREOBE se realizaron numerosas exploraciones y se obtuvieron datos de diferentes características. En la Tabla M.1 quedan recogidos todos los procedimientos realizados (*historia clínica, hábitos de vida y actividad física, alimentación, antropometría fetal, materna y del niño, desarrollo cognitivo, social, conductual,..*), toma de muestras y análisis bioquímicos y genéticos estudiados hasta el momento. Igualmente, y con el consentimiento de las embarazadas participantes, se han preservado un conjunto de muestras congeladas a -80°C para futuros estudios, para los cuales se volverá a solicitar la firma del consentimiento informado en cada caso.

Tabla M.1. Descripción de procedimientos realizados durante el seguimiento de las parejas madre-hijo participantes en el estudio PREOBE

Medidas	Resultados	Tiempo de recogida
Información sobre el reclutamiento de línea de base	IMC pregestacional, la etnia, la historia clínica, la edad, la educación, la paridad, el tabaquismo, los suplementos en curso	Visita de reclutamiento, semana 24, y semana 34
Antropometría Materna	Peso, longitud, circunferencia de cintura, abdomen, etc., espesor del pliegue cutáneo del tríceps, subescapular, etc. ^a	semana 24, y semana 34
Bioimpedancia	BMR ^a , impedancia ^a , IMC ^a , FM / FMI ^a , FFM / FFMI ^a , el agua corporal ^a	semana 24, y semana 34
Ultrasonido fetal	Antropometría fetal ^a	semana 24, y semana 34
Muestras de orina	Metabólica ^a	semana 24, y semana 34
Muestras de heces	Microbiota ^b , metabólica ^a	semana 24, cercano al parto
Muestra de células de la mejilla	Microbiota ^a , genética ^{ab} , ácidos grasos ^a	Semana 34 (madre), al nacimiento (niño)
Cuestionario de alimentación	El análisis cuantitativo y cualitativo de la dieta ^a	semana 24, y semana 34
Muestras de placenta	Peso de la placenta y la circunferencia, perfil lipídico ^a , fosfolípidos ^a , expresión genética ^a , peroxidación lipídica, pTfR ^b	Parto
Cuestionario de estilo de vida	Estilo de vida y actividad física ^a	semana 24
Muestras de sangre (Madre y cordón umbilical)	Análisis directo: ESR, glucosa, lípidos ^a , urea, creatinina, ácido úrico, bilirrubina, estado del hierro, folato, TSH, amilasa, CRP, HbA1c, proteínas totales, albumina, vit B12, insulina, cortisol, IGF1 ^a , IGFBP1 ^a , y subpoblaciones de linfocitos ^a . suero congelado / plasma: Hpcidina ^b , TfR ^b , adiponectina ^a , resistina ^a , leptina, interleuquina ^a , perfiles de fosfolípidos ^a , peroxidación lipídica ^a , tocoferol ^a , retinol ^a .	Semana 24, semana 34, parto (materna y sangre de cordón umbilical)
Registros perinatales	Género, la edad gestacional, Apgar, el modo de entrega, el diagnóstico neonatal / ingreso	Nacimiento
Antropometría del niño	El peso al nacer, longitud, circunferencia de la cabeza, superior del brazo, el pecho y la cintura, índice de masa corporal, índice cintura / altura, talón-rodilla, cadera-rodilla	Nacimiento
Meconio	Microbiota ^a	Nacimiento
Leche materna	Ácidos grasos ^a , vitaminas ^a	Día 1, día 7, día 30

^aDatos sin publicar^bPublicados en Berglund, et al. 2015 (Ver capítulo de resultados).

3.2.1. Evaluación Neuropsicológica

El desarrollo motor, cognitivo, del lenguaje, socioemocional y conductual de los niños participantes en el Proyecto PREOBE se ha evaluado mediante las Escalas de Desarrollo Infantil de Bayley en su versión III. La versión III de esta batería neuropsicológica comenzó a utilizarse en el año 2005; las versiones anteriores I y II fueron utilizadas en múltiples estudios para evaluar las capacidades psicomotoras y cognitivas en niños menores de 4 años, apareciendo en numerosas publicaciones científicas.

3.2.1.1. Examen del desarrollo motor, cognitivo y del lenguaje

El análisis neuropsicológico que permiten las Escalas de Bayley III facilita la evaluación de las diferentes áreas de desarrollo cerebral. Su utilización debe ser llevada a cabo por un experto en la realización del test. En el estudio PREOBE, las exploraciones se han llevado a cabo por un único explorador, con el fin de minimizar el error que pudiera producirse por evaluaciones realizadas por diferentes examinadores. En este caso ha sido el doctorando (FJTE), psicólogo especialista acreditado para la realización de estas pruebas.

La batería neuropsicológica de Bayley III mide la capacidad de desarrollo motor, cognitivo y del lenguaje. Este test permite diferenciar entre desarrollo de motricidad fina y gruesa, y respecto al lenguaje se pueden medir 2 componentes, el lenguaje expresivo y el receptivo. Por tanto, respecto al desarrollo motor y del lenguaje se obtienen 4 medidas de puntuación escalar, a partir de las cuales se adquieren 2 medidas de puntuación compuesta. Esto nos permite obtener resultados más concretos de las diferentes áreas cerebrales en estudio. Este test se utiliza para evaluar niños de 1-42

meses de edad. El tiempo medio empleado en la administración del test fue, a los 6 meses de edad de 15-25 minutos, y de 30-45 minutos a los 18 meses. Posteriormente se realizó un ajuste de los resultados de la evaluación por edad de cada niño. Ninguno de los niños participantes en la cohorte PREOBE nació prematuro. La repetición del test en diferentes edades ha permitido hacer un análisis evolutivo de forma simple y precisa del neurodesarrollo, identificar de forma temprana retrasos del desarrollo y obtener información válida para planificar una potencial intervención. Además, el test de Bayley III facilita la identificación de las competencias y puntos fuertes del niño, así como sus áreas de mejora. Se considera que esta neurobatería es ideal para la evaluación de los niños menores de 3.5 años, sobre todo cuando se trabaja en estudios interdisciplinarios, donde diversos profesionales pueden evaluar distintas áreas del desarrollo (3).

3.2.1.2. Examen la conductual y el desarrollo socioemocional.

La escala de conducta adaptativa se engloba como un cuestionario aparte dentro del test Bayley III, el cual es completado por los padres o cuidador principal, tras unas instrucciones previas por parte del examinador. Se compone de diferentes elementos los cuales se dividen en las diferentes áreas de evaluación desde los 0-5 años de edad. Este sub-test dentro de la neurobatería es conocido como ABAS II, y evalúa el funcionamiento en las habilidades de adaptación del niño (4). Mediante la escala de conducta adaptativa se evalúan las habilidades funcionales diarias del niño; el cuestionario se divide en las siguientes áreas: Comunicación (*habla, lenguaje, escucha y comunicación no verbal*), Uso en Comunidad (*interés en actividades fuera del hogar y el reconocimiento de los espacios*), Salud y Seguridad (*precaución y alejarse del peligro*), Ocio (*juego, seguimiento de reglas y participación en la recreación en casa*),

Cuidado personal (*comer, ir al baño, bañarse*), Auto-Dirección (*autocontrol, seguimiento de instrucciones y toma de decisiones*), función pre-académica (*reconocimiento de letras, contar y dibujar formas simples*), Vida en casa (*ayudar a los adultos con tareas del hogar y el cuidado de sus pertenencias personales*), Social (*llevarse bien con otras personas, el uso de los modales, ayudar a los demás y reconocer las emociones*), Motor (*locomoción y manipulación del medio ambiente*). Las clasificaciones de todas estas áreas de habilidades se combinan para formar una serie de puntuaciones compuestas, incluyendo la Puntuación General Compuesta (GAC), que es una medida global del desarrollo de adaptación del niño.

Igualmente, dentro del ABAS II, está incluido otro cuestionario con el fin de evaluar el desarrollo socioemocional del niño, es rellenado por los padres o cuidadores principales después de que le examinador les dé instrucciones específicas para completarlo. Este formulario mide la escala socio-emocional, fue diseñado para niños desde el nacimiento hasta los 42 meses de edad, se centra en la adquisición de los hitos sociales y emocionales funcionales que representan en gran medida los patrones socio-emocionales y logros significativos del niño, no solo emociones específicas o aisladas en las habilidades sociales. Los ítems evalúan los dominios de las habilidades sociales, tales como: la auto-regulación y el interés por el mundo; comunicar las necesidades; implicar a otros y establecer relaciones; el uso de las emociones de una manera interactiva con un propósito; y el uso de señales emocionales o gestos para resolver problemas.

Igualmente, los resultados del ABAS II se ajustan por la edad cronológica del niño.

La metodología específica empleada en los diferentes artículos que se presentan en esta Memoria se explican in extenso en cada uno de ellos.

Bibliografía - Metodología

1. Group NDD. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979;28(12):1039-57.
2. Metzger BE. Summary and recommendations of the third international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 1991;40(Supplement 2):197-201.
3. Bayley N, Reuner G. Bayley scales of infant and toddler development: Bayley-III: Harcourt Assessment, Psych. Corporation San Antonio, Tex, USA; 2006.
4. Viesel K, Zibulsky J. Adaptive Behavior Assessment System—Second Edition. *Encyclopedia of Special Education*: John Wiley & Sons, Inc.; 2013.

Capítulo 4

Publicaciones

Capítulo 4. Publicaciones

1. Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE).

Staffan K. Berglund, Luz García-Valdés, Francisco J Torres-Espinola, M^a Teresa Segura, Cristina Martínez-Zaldívar, María J. Aguilar, Ahmad Agil, Jose A. Lorente, Jesús Florido, Carmen Padilla, Signe Altmäe; Acensión Marcos, M. Carmen López-Sabater, Cristina Campoy and the PREOBE team. Berglund et al. BMC Public Health (2016) 16:207. DOI 10.1186/s12889-016-2809-3

2. Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age – A Follow Up from the PREOBE Cohort

Francisco J. Torres-Espínola, Staffan K. Berglund, Luz M^a García-Valdés, M^a Teresa Segura, Antonio Jerez, Daniel Campos, Rosario Moreno-Torres, Ricardo Rueda, Andrés Catena, Miguel Pérez-García, Cristina Campoy and the PREOBE team. PLoS ONE 10 (7): e0133010. doi:10.1371/journal.pone.0133010

3. Maternal PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with infant's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age

Francisco J. Torres-Espínola, Signe Altmäe, Maria Teresa Segura, Antonio Jerez, Tania Anjos, Maribel Chisaguano, M. Carmen López-Sabater, Carmen Entrala, Juan Carlos Alvarez, Ahmad Agil, Jesús Florido, Andrés Catena, Miguel Pérez-García, Cristina Campoy. Early Human Development 91 (2015): 457–462

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE)

Staffan K. Berglund^{1,2}, Luz García-Valdés¹, Francisco J Torres-Espinola¹, M^a Teresa Segura¹, Cristina Martínez-Zaldívar¹, María J. Aguilar¹, Ahmad Agil³, Jose A. Lorente⁴, Jesús Florido⁵, Carmen Padilla⁵, Signe Altmäe^{1,6}, Acensión Marcos⁷, M. Carmen López-Sabater⁸, Cristina Campoy^{1,6*} and on behalf of the PREOBE team

Abstract

Background: Maternal overweight, obesity, and gestational diabetes (GD) have been negatively associated with offspring development. Further knowledge regarding metabolic and nutritional alterations in these mother and their offspring are warranted.

Methods: In an observational cohort study we included 331 pregnant women from Granada, Spain. The mothers were categorized into four groups according to BMI and their GD status; overweight (n:56), obese (n:64), GD (n:79), and healthy normal weight controls (n:132). We assessed maternal growth and nutritional biomarkers at 24 weeks (n = 269), 34 weeks (n = 310) and at delivery (n = 310) and the perinatal characteristics including cord blood biomarkers.

Results: Obese and GD mothers had significantly lower weight gain during pregnancy and infant birth weight, waist circumference, and placental weight were higher in the obese group, including a significantly increased prevalence of macrosomia. Except for differences in markers of glucose metabolism (glucose, HbA1c, insulin and uric acid) we found at some measures that overweight and/or obese mothers had lower levels of transferrin saturation, hemoglobin, Vitamin B12 and folate and higher levels of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, ferritin, and cortisol. GD mothers had similar differences in hemoglobin and C-reactive protein but higher levels of folate. The latter was seen also in cord blood.

Conclusions: We identified several metabolic alterations in overweight, obese and GD mothers compared to controls. Together with the observed differences in infant anthropometrics, these may be important biomarkers in future research regarding the programming of health and disease in children.

Trial registration: The trial was registered at clinicaltrials.gov, identifier (NCT01634464).

Keywords: Pregnancy, Maternal overweight, Maternal obesity, Gestational diabetes, Offspring, Fetal nutrition, Early programming, Vitamin B12, Folate, Iron status, Glucose metabolism

* Correspondence: ccampoy@ugr.es

¹Centre of Excellence for Paediatric Research EURISTIKOS, Department of Paediatrics, School of Medicine, University of Granada, Avda. De Madrid 11, 18012 Granada, Spain

⁶Department of Paediatrics, University of Granada, Avda. de la Investigación 11, 18016 Granada, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The concept of early programming of child health is an established and highly relevant research field [1–4]. Numerous experimental and epidemiological studies have shown that nutritional alterations in pre-, peri-, and postnatal stages of life may have a significant impact on the future health and development on a child. Associations have been found into adulthood with metabolic diseases, neurodevelopmental impairments, cancer, and immunological function alterations [2, 4, 5]. Obesity during pregnancy is one of the most established risk factors for negative long-term programming. In addition to its short term risks such as preterm birth, and macrosomia [6, 7], obesity have also been associated with increased risks of metabolic and immunological dysfunctions and of poor neurodevelopment [4, 5, 8–11]. Considering that a large proportion of women of reproductive age in developed countries enter pregnancy being overweight or obese, and the numbers are increasing, these described associations constitute a threat to future child health [12].

To better understand the intrauterine programming following maternal obesity, more knowledge is required. Obesity is closely correlated to the metabolic complication gestational diabetes (GD) and therefore, alterations in glucose regulation have been proposed as a candidate explaining the mechanism [13, 14]. It is unclear whether the previously observed correlations are applicable to non-diabetic overweight or obese pregnancies. Several other possible risk factors of non-optimal maternal metabolism or nutrition have also been proposed, such as maternal weight gain during pregnancy [15], alterations in the regulation of folate [16] or leptin [17], deficiency of vitamin D [18] or iron [19, 20], or influences of the fatty acids profiles [21, 22]. But for the most, the exact role of these biomarkers is still left to explore, since most previous research is based on retrospective epidemiological studies. There is also a lack of knowledge on how these metabolic markers actually differ between healthy mothers and those with overweight, obesity, and GD respectively.

To add knowledge to the field of early programming following maternal metabolic pathologies, we designed the PREOBE trial, with the overall objectives to establish a cohort of mother-child pairs and explore the short- and long-term effects of maternal overweight, obesity and GD compared to controls, on peri- and postnatal outcomes in the mother and her offspring. Maternal nutritional biomarkers, placental function and growth were monitored during pregnancy as well as the short- and long-term health and development of the offspring. In the present paper, we aimed to describe the methodology and baseline outcomes of the PREOBE study.

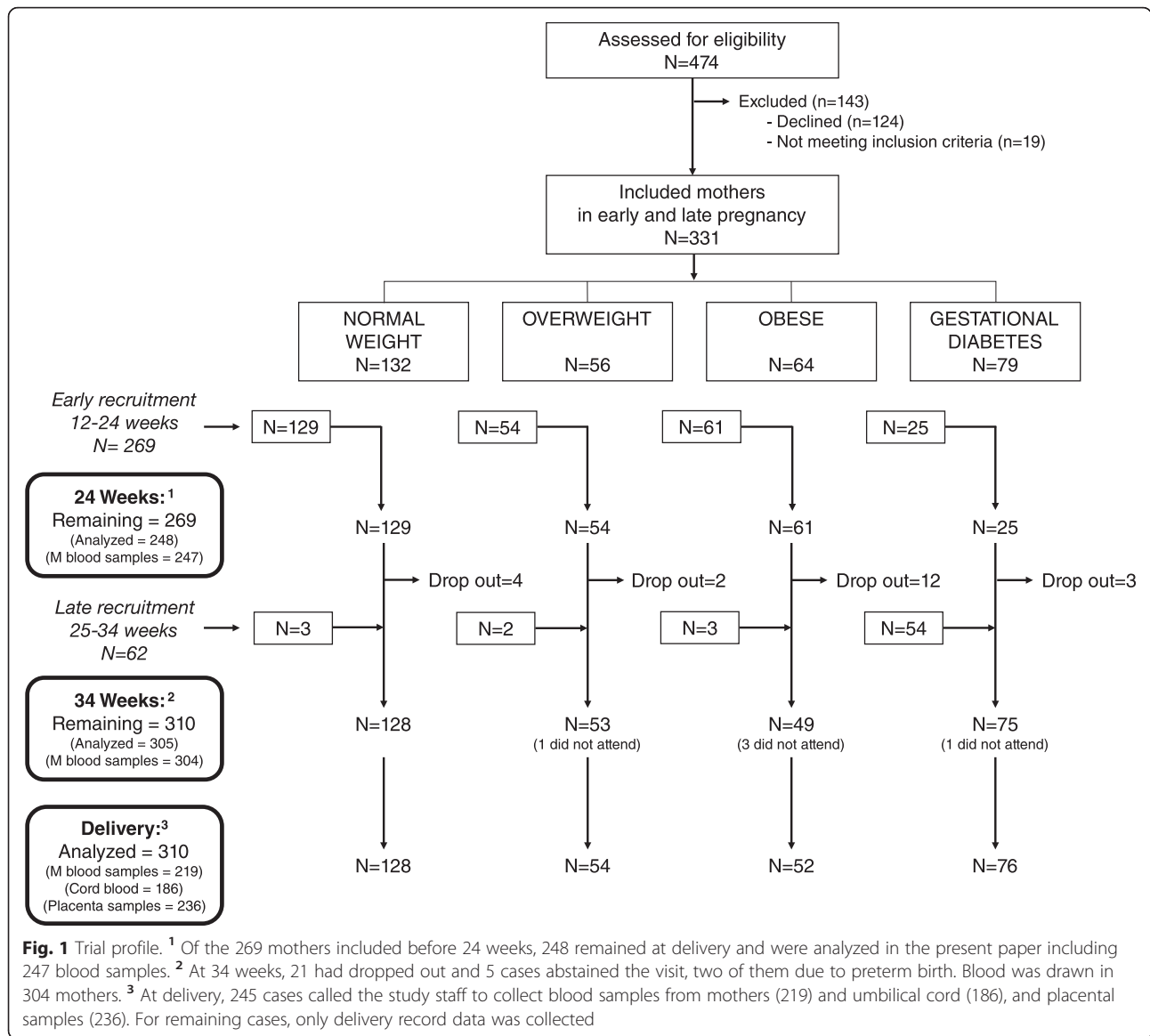
Methods

Study design and subjects

This study was designed as a prospective observational cohort study and included no interventions. The study recruitment was performed between 2008 and 2012, through a collaboration with the Clinical University Hospital San Cecilio and the Mother-Infant University Hospital of Granada, Granada, Spain and their peripheral health centers. Pregnant women attending antenatal clinics for regular check-up were approached by study staff and invited to participate in the study. The inclusion criteria were: single pregnancy at 12–34 weeks of gestation (preferably before 20 weeks), age between 18 and 45 years, no simultaneous participation in any other research study, no drug treatment, no vegan diet, and no diagnosed diseases other than obesity, overweight or gestational diabetes. In total 474 pregnant women were assessed for eligibility. Nineteen did not meet the inclusion criteria, 15 due to pre-gestational diabetes and 4 due to underweight, and 124 did not come back for the first study visit (without stating why). The 124 cases of early drop were mostly normal weight mothers without GD ($n = 107$) but they were similar in age and educational level with those who remained. Of the 331 included mothers, 269 were included before 24 weeks of gestation. However, due to the lack of mothers diagnosed with GD at that early part of gestation, another 62 were recruited after 24 weeks (Fig. 1). All included women were allocated into four different groups based on the calculated pre-gestational body mass index (BMI) and the gestational diabetic status at 34 weeks:

1. Normal weight ($18.5 \leq \text{BMI} < 25$ and no diagnosed gestational diabetes), $n = 132$
2. Overweight ($25 \leq \text{BMI} < 30$ and no diagnosed gestational diabetes), $n = 56$
3. Obese ($\text{BMI} \geq 30$ and no diagnosed gestational diabetes), $n = 64$
4. Gestational diabetes (and $\text{BMI} \geq 18.5$), $n = 79$

We actively searched for mothers in the latter three groups, and the GD group included both mothers who had already been diagnosed with GD and by those from the first three groups who developed GD between recruitment and 34 weeks and accordingly switched group. The diagnosis of GDM was made by the local clinicians at the hospital and was based on an oral glucose tolerance test (OGTT), interpreted according to the National Diabetes Data Group criteria [23] and the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus [24]. To increase the sample size, we included mothers from all three weight categories. Consequently, the GD-group included women with normal weight ($n = 32$), overweight ($n = 23$), and obesity ($n = 24$). According



to the local hospital routines at time of the study, the mothers diagnosed with GD were offered to participate in an endocrine-nutritional programme to optimize glucose control using nutritional and lifestyle recommendations. In some cases they received medical treatment including oral antidiabetics or insulin therapy if they needed it. This intervention was not part of the present study and neither monitored individually. The overweight and obese mothers without GD received no similar intervention.

Ethics, consent and permissions

The project was approved by the Bioethical Committees for Clinical Research of the Clinical University Hospital San Cecilio and the Mother-Infant University Hospital of Granada, Granada, Spain. An ethical approval was

also obtained by the Research Bioethical Committee of the University of Granada. Written informed consent was obtained from all participants at study entry, and after received full information from a research group member.

Data collection during pregnancy

The data collection procedures during pregnancy and at delivery are summarized in Table 1. At the recruitment visit, information was collected regarding maternal pre-pregnancy weight, used for calculation of the pre-pregnancy BMI, and sociodemographic and medical background including ethnicity, education, age, number of previous pregnancies/children, smoking habits, and alcohol consumption. The pregnant women were also asked about prior or current supplements of vitamins or

Table 1 Schedule of data collection, assessments and laboratory analyses in mothers and offspring in the PREOBE-study

Measure	Outcomes	Time of collection
Baseline recruitment information	Pre-gestational BMI, ethnicity, medical history, age, education, parity, smoking, ongoing supplements	Recruitment visit, 24 wk, and 34 wk
Maternal anthropometrics	Weight, length, circumference of abdomen, waist etc., skinfold thickness of triceps, subscapularis etc. ^a	24 wk, 34 wk
Bioimpedance	BMR ^a , impedance ^a , BMI ^a , FM/FMI ^a , FFM/FFMI ^a , body water ^a	24 wk, 34 wk
Fetal ultrasound	Fetal anthropometrics ^a	24 wk, 34 wk
Urine samples	Metabolomics ^a	24 wk, 34 wk
Fecal samples	Microbiota ^b , metabolomics ^a	24 wk, near delivery
Cheek cell sample	Microbiota ^a , genetics ^{ab} , fatty acids ^a	34 wk (mother), birth (infant)
Food questionnaire	Quantitative and qualitative dietary analyses ^a	24 wk, 34 wk
Placenta samples	Placental weight and circumference, Lipid profile ^a , phospholipids ^a , gene expression ^a , lipid peroxidation, pTfR ^b	Delivery
Lifestyle questionnaire	Lifestyle and physical activity ^a	24 wk
Blood samples (Mother and cord blood)	Direct analyses: ESR, glucose, lipids ^a , urea, creatinine, uric acid, bilirubin, iron status, folate, TSH, amylase, CRP, HbA1c, total protein, albumin, vit B12, insulin, cortisol, IGF1 ^a , IGFBP1 ^a , and lymphocyte subpopulations ^a . Frozen serum/plasma: Hepcidin ^b , TfR ^b , adiponectin ^a , resistin ^a , leptin, interleukins ^a , phospholipid profiles ^a , lipid peroxidation ^a , tocopherol ^a , retinol ^a .	24 wk, 34 wk, delivery (mother and cord blood)
Perinatal records	Gender, gestational age, Apgar, delivery mode, neonatal diagnoses/admission	–
Infant anthropometrics	Birth weight, length, circumference of head, upper-arm, chest and waist, BMI, waist/height index, heel-knee, hip-knee	Birth
Meconium	Microbiota ^a	Birth
Breast milk	Fatty acids ^a , vitamins ^a	day 1, day 7, day 30

^aUnpublished data^bPublished elsewhere

minerals. At 24 and 34 weeks of gestation, all pregnant mothers enrolled were called back for a visit including an anthropometric revision, bio-impedance measurements, and collection of maternal venous blood, urine, cheek cell and fecal samples. The fecal samples were analyzed for microbiota as has been described elsewhere [25]. Furthermore, maternal dietary habits and physical activity were recorded by several questionnaires, and fetal growth and development was assessed by ultrasound measurements.

Data collection at delivery

All participating mothers were instructed to contact the study center at the time of admission at the delivery ward. Whenever possible, study staff attended the delivery and measured the placental weight and circumference and collected cord blood and placental samples, immediately after cord clamping. Furthermore at delivery, a venous blood puncture was drawn from the mother. Maternal weight at delivery was collected from medical records and weight gain during pregnancy calculated. Maternal data collection also included a repeated follow up until 18 months of life including postpartum questionnaire, anthropometric and bio-impedance

measures, dietary records, and in a subsample also breast milk samples.

With regard to the offspring, the following perinatal data was collected at time of delivery: infant gender, gestational age at birth, infant anthropometrics including head, chest, mid-arm, and abdominal circumference, hip-knee, knee-heel, admission to neonatal ward, Apgar score, and mode of delivery (vaginal or caesarian section). Whenever possible, the offspring's meconium and feces at different visits within the follow-up were collected and stored for gut microbiota study. Finally at birth, cheek cells were collected and stored at -80° . The latter have been analyzed for fatty acid profiles, and different polymorphisms in genes including FADS and ELOVs and PPRG [26].

Laboratory analyses

The maternal blood samples from 24 weeks, 34 weeks, and delivery as well as the umbilical cord blood were analyzed for hematologic and biochemical markers at the laboratory of Clinical University Hospital "San Cecilio", Granada, Spain including the following: Hematological parameters (Hemoglobin [Hb] and mean corpuscular volume [MCV]), erythrocyte sedimentation rate (ESR),

serum biomarkers (glucose, cholesterol, creatinine, uric acid, ferritin, transferrin, transferrin saturation [TS], folate, thyroid-stimulating hormone [TSH], C-reactive protein [CRP], HbA1c, vitamin B12, insulin, and cortisol). The analyses also included fatty acids profile in plasma phospholipids. Apart from direct analyses above, we analyzed lymphocyte subpopulations and serum and plasma aliquots were also stored at -80°C for later analyses as described in Table 1. The placental samples were analyzed for fatty acids content, lipid pro-oxidation, phospholipid profiles, and expression of placental key genes related to energy, proteins, carbohydrates, iron and fatty acids transport and metabolism. The results are partly published elsewhere [20, 27, 28].

Statistics

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package for Windows (version 22.0; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Continuous, normally distributed variables were displayed as mean and standard deviation (SD) and explored by analysis of variance, while variables showing skew distribution were presented as median and inter quartile range (IQR) and analyzed using non-parametric rank sum tests. We used ANOVA, Kruskal-Wallis rank sum test, or Chi square test to compare the four PREOBE-groups. The comparisons were performed without confounder adjustment. In outcomes with group size in the overweight or obese group less than 20, the two groups were combined together resulting in three groups to compare. In case of significant group differences, a post hoc test was used to explore the overweight, obese and gestational diabetic groups against the normal group. The post hoc tests were adjusted for multiple comparisons by multiplying the p-value with the number intergroup comparisons (two or three). P-values <0.05 were considered statistically significant.

Results

From the 331 pregnant women included in the current study, 21 dropped out before the visit at 34 weeks. Another 5 of them did not attend the visit at 34 weeks (two of them due to preterm delivery) but remained in the study for postnatal follow-ups. Thus, 310 mother-child pairs were considered as remaining at delivery and included in the analyses of the present paper. The compliance to participate at each visit was generally low and furthermore, some women occasionally refused blood sampling. The number of cases visiting the study center, as well as the number of blood samples drawn is described in Fig. 1. At time of delivery, we were only able to participate for data collection in a subsample due to the fact that the mothers forgot to contact the research team at time of delivery. Cord blood sampling was

further limited in numbers due to the tight time limit to perform the collection.

Maternal characteristics and outcomes

The background and baseline characteristics of the mothers who completed the study, together with their laboratory and anthropometric outcomes are shown in Table 2. With regard to the sociodemographic background, we found that GD mothers were significantly older than the controls (multiple comparison adjusted value [adj. *p*] was <0.001). Furthermore, the obese group had generally lower prevalence of university education (adj. *p* <0.001). However, no significant differences were found in ethnicity, parity, smoking or alcohol intake. The average weight gain during pregnancy was significantly lower in the obese (adj. *p* <0.001) and diabetic (adj. *p* <0.001) groups. The reported intake of supplements before study entry was generally high. We found a significantly lower proportion of mothers in the obese group reporting intake of folic acid (adj. *p* = 0.015) and higher proportions of mothers in the GD group reporting intake of B12 (adj. *p* = 0.039).

The biochemical variables differed significantly in several measures. TS, Hb, vitamin B12, folate, and cortisol were lower in the overweight or obese group at some time-points, while ferritin, CRP, ESR, uric acid, HbA1c, and insulin showed higher levels in obese and/or overweight mothers compared to controls. The GD group showed lower values of Hb but higher levels in folate, CRP, ESR, glucose, and in HbA1c. Regarding creatinine and TSH no significant differences nor trends of differences were observed.

Perinatal outcomes and cord blood analyses

The perinatal data collected at delivery are presented in Table 3. The obese group had significantly higher placental (adj. *p* <0.001), and infant weight (adj. *p* = 0.003) but also higher placental/fetal weight ratio (adj. *p* = 0.018). The prevalence of macrosomia, defined as birth weight >4000 g was significantly higher in the obese group compared to the normal group with an odds ratio (95 % CI) of 4.6 (1.4–14.9), adj. *p* = 0.018. Also the mean infant waist circumferences (adj. *p* = 0.028) and chest circumferences (adj. *p* = 0.020) were higher in the obese group. The diabetic group had a higher prevalence of caesarian delivery (adj. *p* = 0.038) and the infants had a higher weight/height ratio (adj. *p* = 0.032). We observed no significant differences between any groups in gestational age at birth or in prevalence of preterm birth or LBW.

ESR in cord blood was only measured in one infant from the normal group and for this reason we could not analyze this variable. Remaining laboratory measures from cord blood are shown in Table 4. Although the

Table 2 Baseline characteristics, anthropometrics, and laboratory measures during pregnancy for the 310 mothers who remained in the PREOBE trial at delivery

	Time	N	Normal weight n = 128	Overweight n = 54	Obese n = 52	Gestational diabetes n = 76	P
Background							
Age (y)	20 wk	310	30.9 ± 4.2	32.0 ± 4.2	29.5 ± 7.8	33.7 ± 4.6 ^a	<0.001
Parity (>1)	–	306	55 (43.3 %)	24 (45.3 %)	28 (53.8 %)	35 (47.3 %)	0.637
Smoking during pregnancy	–	268	17 (14.4 %)	5 (10.2 %)	7 (15.6 %)	7 (12.3 %)	0.850
Alcohol during pregnancy	–	270	6 (5.1 %)	1 (2.0 %)	1 (2.2 %)	3 (5.3 %)	0.692
Education at university-level	–	306	68 (53.5 %)	22 (41.5 %)	11 (21.2 %) ^a	27 (36.5 %)	<0.001
Supplements during pregnancy							
Iron supplementation	–	280	46 (36.2 %)	13 (28.9 %)	10 (21.7 %)	28 (45.2 %)	0.065
Folic acid supplementation	–	260	115 (92.7 %)	38 (84.4 %)	32 (76.2 %) ^a	43 (87.8 %)	0.036
B12 supplementation	–	259	64 (51.6 %)	22 (48.9 %)	22 (52.4 %)	35 (72.8 %) ^a	0.055
Anthropometrics							
Pre-gestational BMI (kg/m ²)	0 wk	310	22.0 ± 1.7	23.7 ± 1.3 ^a	33.3 ± 2.8 ^a	27.7 ± 6.2 ^a	<0.001
Weight (kg)	0 wk	310	59.1 ± 5.6	72.3 ± 6.0 ^a	87.3 ± 9.1 ^a	72.5 ± 18.3 ^a	<0.001
	delivery	209	72.0 ± 8.8	82.2 ± 7.8 ^a	94.8 ± 11.3 ^a	77.9 ± 16.1 ^a	<0.001
Weight gain during pregnancy (kg)	delivery	209	12.5 ± 6.1	10.3 ± 5.2	7.2 ± 6.9 ^a	6.9 ± 8.2 ^a	<0.001
Iron status							
Ferritin (µg/l)	24 wk	240	18.3 (10–26)	18.3 (10–28)	22.7 (16–41) ^a	23.0 (18–30)	0.033
	34 wk	299	15.7 (9–21)	12.0 (9–19)	12.8 (9–18)	16.4 (11–29)	0.011
	delivery	199	21.0 (16–33)	19.6 (16–26)	17.4 (15–22)	22.0 (18–46)	0.005
TS (%)	24 wk	242	18.9 ± 8.6	16.6 ± 6.3	15.3 ± 5.4 ^a	20.3 ± 7.7	0.009
	34 wk	300	17.1 ± 10.9	14.9 ± 7.9	12.5 ± 5.2 ^a	19.0 ± 13.7	0.006
	delivery	200	17.6 ± 12.4	16.4 ± 11.9	13.9 ± 6.0	17.4 ± 8.4	0.376
Hb (g/l)	24 wk	222	12.6 ± 1.6	12.4 ± 1.7	12.1 ± 0.4	11.6 ± 0.8	0.136
	34 wk	288	11.8 ± 1.2	11.5 ± 1.5	11.6 ± 0.8	11.8 ± 1.1	0.421
	delivery	199	12.6 ± 2.0	11.4 ± 1.4 ^a	11.4 ± 1.4 ^a	11.6 ± 1.7 ^a	<0.001
MCV (fl)	24 wk	222	88.9 ± 4.4	88.9 ± 4.7	88.0 ± 4.1	89.3 ± 4.3	0.617
	34 wk	288	87.3 ± 5.5	87.0 ± 5.4	85.4 ± 4.1	86.6 ± 5.1	0.193
	delivery	198	86.2 ± 6.9	84.6 ± 5.3	84.1 ± 5.3	87.7 ± 4.9	0.036
Vitamins							
Vitamin B12 (pg/ml)	24 wk	59	321 ± 124	262 ± 76		309 ± 136	0.156
	34 wk	87	257 ± 91	248 ± 68		307 ± 101	0.012
	delivery	59	312 ± 98	221 ± 73 ^a		263 ± 90	0.037
Folate (ng/ml) ^b	24 wk	242	15.3 (11.5–19.3)	16.3 (10.5–19.7)	14.4 (8.4–19.8)	18.1 (13.4–20.0)	0.212
	34 wk	300	14.8 (10.2–18.0)	13.5 (7.4–19.2)	11.4 (6.2–16.3) ^a	18.2 (12.3–20.0) ^a	<0.001
	delivery	201	14.2 (9.1–18.3)	10.1 (6.0–17.4)	7.3 (5.0–14.6) ^a	15.1 (9.6–19.0)	0.001
Other biomarkers							
Glucose (g/l)	24 wk	242	80.5 ± 16.6	87.3 ± 16.6	84.8 ± 16.7	97.2 ± 24.4 ^a	<0.001
	34 wk	301	86.7 ± 18.6	88.0 ± 17.7	89.6 ± 17.8	93.5 ± 23.5	0.119
	delivery	201	82.7 ± 28.0	86.8 ± 23.7	96.9 ± 35.3	102.2 ± 33.8 ^a	0.002
Insulin (µU/ml)	24 wk	104	21.8 (6.6–39.1)	36.5 (14.1–66.2)	26.9 (16.9–54.3)	21.0 (14.1–60.8)	0.306
	34 wk	159	29.9 (12.9–51.4)	38.9 (24.3–63.3)	38.4 (22.8–71.0)	24.5 (12.5–42.1)	0.013
	delivery	110	10.0 (5.4–15.7)	14.6 (10.7–27.5) ^a		12.1 (6.7–23.0)	0.008

Table 2 Baseline characteristics, anthropometrics, and laboratory measures during pregnancy for the 310 mothers who remained in the PREOBE trial at delivery (Continued)

HbA1c (%)	24 wk	196	4.2 (4.0–4.4)	4.5 (4.2–4.9) ^a	4.8 (4.2–5.1) ^a	5.1 (4.6–5.3) ^a	<0.001
	34 wk	258	4.5 (4.3–4.8)	4.8 (4.4–5.4) ^a	5.0 (4.5–4.4) ^a	5.1 (4.7–5.5) ^a	<0.001
	delivery	180	4.6 (4.4–4.8)	5.0 (4.7–4.3) ^a	5.2 (4.5–5.5) ^a	5.2 (4.9–4.5) ^a	<0.001
Uric acid (mg/dl)	24 wk	243	3.09 ± 0.62	3.06 ± 0.75	3.53 ± 0.72 ^a	3.08 ± 0.51	<0.001
	34 wk	301	3.62 ± 0.77	3.59 ± 0.91	3.76 ± 0.69	3.87 ± 1.04	0.186
	delivery	200	4.55 ± 1.08	4.64 ± 1.41	4.64 ± 1.22	4.45 ± 0.96	0.843
Creatinine (mg/dl)	24 wk	230	0.60 ± 0.14	0.59 ± 0.10	0.56 ± 0.10	0.58 ± 0.09	0.239
	34 wk	301	0.61 ± 0.11	0.71 ± 0.62	0.59 ± 0.11	0.66 ± 0.15	0.087
	delivery	201	0.64 ± 0.11	0.69 ± 0.19	0.61 ± 0.13	0.68 ± 0.17	0.096
TSH (ng/ml)	24 wk	241	1.65 (0.98–2.08)	1.37 (1.06–2.18)	1.65 (1.11–2.32)	1.56 (1.17–2.50)	0.888
	34 wk	299	1.39 (1.05–2.04)	1.34 (1.08–1.98)	1.59 (0.89–2.17)	1.39 (1.04–2.07)	0.954
	delivery	200	2.24 (1.61–3.16)	2.15 (1.66–2.88)	2.09 (1.59–3.06)	2.17 (1.43–2.92)	0.781
CRP (mg/dl)	24 wk	71	0.27 (0.16–0.34)	0.42 (0.17–0.53) ^a		0.68 (0.35–0.90) ^a	<0.001
	34 wk	121	0.79 (0.43–1.2)	0.65 (0.39–1.0) ^a		0.96 (0.66–2.5)	0.005
	delivery	89	0.56 (0.27–0.82)	0.45 (0.28–0.83) ^a		1.2 (0.52–2.9) ^a	0.042
ESR (mm)	24 wk	91	35.7 ± 16.7	47.6 ± 16.3 ^a	47.7 ± 14.3 ^a	49.4 ± 20.1 ^a	0.020
	34 wk	136	47.9 ± 25.9	60.8 ± 12.4	55.0 ± 11.6	53.2 ± 19.0	0.118
	delivery	103	39.6 ± 22.9	54.0 ± 22.9		47.3 ± 24.0	0.060
Cortisol (µg/dl)	24 wk	104	21.0 ± 6.2	18.3 ± 5.7	17.1 ± 5.0 ^a	19.5 ± 5.4	0.050
	34 wk	160	22.6 ± 6.7	23.3 ± 6.4	23.3 ± 6.6	22.6 ± 7.1	0.934
	delivery	112	57.5 ± 26.5	42.0 ± 15.2 ^a		48.6 ± 18.2	0.007

Data are mean ± SD, n (%), or median (IQR) and p-values are ANOVA, Chi square test, or Kruskal Wallis rank sum test respectively

^aSignificantly different from normal group in a multiple-comparison-adjusted-post hoc test (p-value was multiplied with the number of post hoc analyses [two or three])

^bHighest detectable folate level was 20 ng/ml

overweight and obese groups were combined, the number of analyzed cases was low, and no significant differences were observed in the overweight/obese group compared to the normal group. There was an overall group differences in Vitamin B12-levels and a trend suggesting lower levels in the overweight/obese group. However, only 3 cases were analyzed in the normal group and consequently the difference did not reach significance (adj. $p = 0.4$). Similarly, due to low numbers analyzed, there was a non-significant trend of higher glucose and HbA1c-levels in cord blood from the GD-group (adj. $p = 0.160$ and 0.074 respectively). The only significant post-hoc comparison was observed in folate which was higher in the GD-group compared to controls (adj. $p = 0.024$).

Discussion

In the present paper we explored maternal and perinatal alterations in pregnancies following maternal overweight, obesity and GD, all suggested risk factors of non-optimal programming of long-term child health. In agreement with our hypothesis, we observed several significant differences compared to controls. All three

groups of mothers showed significant differences in levels of some of the metabolic biomarkers explored. The infants born to the obese mothers differed in their anthropometrics including higher birth—and placental weight and higher placental-neonatal weight ratio. They also had a higher risk of macrosomia, while the offspring born to women with GD showed no anthropometric differences compared to controls. The cord blood analyses were limited due to sample size and we found only that offspring born to GD mothers had higher levels of folate and a non-significant trend of higher glucose and HbA1c.

The maternal group differences observed in the present paper were mostly in accordance with previous research. The GD mothers had significantly higher age. This is a previously well described correlation [29] and may be an important confounding factor in long term studies of the offspring. Regarding maternal anthropometrics, we found slower weight gain during pregnancy in obese mothers as it has been previously described [30]. This is of clinical importance since it has been shown that maternal overweight/obesity and weight gain during pregnancy are both and independently associated

Table 3 Perinatal outcomes in pregnancies following maternal overweight, obesity, or gestational diabetes compared to controls

	N	Normal weight n = 128	Overweight n = 54	Obese n = 52	Gestational diabetes n = 76	P
Mode of delivery (vaginal)	228	95 (87.2 %)	31 (72.1 %)	26 (72.2 %)	28 (70.0 %) ^a	0.036
Placental weight (g)	227	475 ± 112	512 ± 123	571 ± 133 ^a	517 ± 116	0.001
Placental /fetal-ratio	226	0.147 ± 0.03	0.158 ± 0.04	0.164 ± 0.04 ^a	0.155 ± 0.03	0.030
Apgar score at 5 min	234	10 (10–10)	10 (10–10)	10 (10–10)	10 (10–10)	0.357
Gestational age at birth (wk)	287	39.4 ± 1.2	39.5 ± 1.4	39.8 ± 1.4	39.2 ± 1.5	0.169
Preterm birth (<37 wk)	287	2 (1.6 %)	1 (2.0 %)	2 (4.2 %)	1 (1.5 %)	0.740
Post term birth (>42 wk)	287	2 (1.6 %)	0 (0 %)	3 (6.3 %)	1 (1.5 %)	0.148
Infant gender (boy)	298	61 (48.8 %)	25 (48.1 %)	29 (59.2 %)	43 (59.7 %)	0.327
Infant birth weight (kg)	301	3.25 ± 0.39	3.29 ± 0.49	3.49 ± 0.51 ^a	3.31 ± 0.46	0.020
Low birth weight (<2500 g)	301	5 (3.9 %)	2 (3.8 %)	0 (0 %)	2 (2.8 %)	0.567
Macrosomia (>4000 g)	301	5 (3.9 %)	6 (11.3 %)	8 (16.3 %) ^a	3 (4.2 %)	0.016
Infant birth length (cm)	236	50.4 ± 1.9	50.5 ± 1.6	51.0 ± 2.3	50.1 ± 2.4	0.192
Infant BMI (m/kg ²)	236	13.0 ± 1.2	13.0 ± 1.3	13.3 ± 1.4	13.3 ± 1.6	0.464
Infant waist/height index	142	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.67 ± 0.04 ^a	0.023
Infant head circumference (cm)	200	34.4 ± 1.3	34.5 ± 1.1	34.4 ± 1.6	37.7 ± 1.4	0.606
Waist circumference (cm)	147	32.3 ± 1.9	32.4 ± 2.3	33.7 ± 2.6 ^a	33.3 ± 1.9	0.014
Upper arm circumference (cm)	191	10.9 ± 1.0	11.3 ± 1.4	11.3 ± 1.2	11.3 ± 1.2	0.214
Chest circumference (cm)	161	33.0 ± 1.9	33.1 ± 2.7	34.4 ± 2.4 ^a	33.5 ± 1.6	0.031
Hip-knee length (cm)	188	11.0 ± 1.1	10.9 ± 1.1	10.8 ± 1.4	10.8 ± 1.2	0.916
Knee-heel length (cm)	190	10.7 ± 1.1	10.8 ± 1.0	11.2 ± 1.1	11.2 ± 1.4	0.074
Admission to neonatal ward	270	11 (9.2 %)	0 (0 %)	2 (4.3 %)	2 (3.4 %)	0.098

Data are mean ± SD, n (%), or median (IQR) and p-values are ANOVA, Chi square test, or Kruskal Wallis rank sum test respectively

^aSignificantly different from normal group in a multiple-comparison-adjusted-post hoc test

with increased obesity in the offspring [15]. Considering these observations, we find it relevant to follow the present cohort and explore how the maternal age and weight gain during pregnancy correlates to later health markers of the offspring in the four groups respectively.

Higher glucose and HbA1c-levels in the mothers of the GD group were expected by definition. We also observed higher insulin and HbA1c-levels in the overweight and obese mothers, suggesting alterations also in their glucose metabolism. Interestingly, there was a trend of higher glucose and HbA1c also in the cord blood of diabetic offspring. Since insulin and HbA1c are not transferred to the fetus and maternal insulin has little effect on the placenta, the observation is most likely explained by differences in glucose transfer [14]. More specifically, it is suggested that higher glucose levels in the mother causes relatively higher levels in the fetus and consequently affect its metabolism. The relevance of these non-significant observations are unclear, however they are concurrent with the ‘in utero’ hypothesis, suggesting that an increased intrauterine exposure to glucose occurs in the fetus if the levels are altered in the mother. This hypothesis has been considered an

important key to the long-term risk for obesity [31], and we plan to analyze the correlation with long term health outcomes in the children of the PREOBE cohort.

Overweight and obesity are also associated with increased risk of iron deficiency [32], another well explored candidate for unfavorable perinatal programming [33]. Thus, the observed lower levels of TS, Hb, and ferritin at delivery were not unexpected but nevertheless interesting considering future neurodevelopmental assessments of the present cohort. The higher levels of ferritin at 24 weeks most likely reflect an increased inflammatory response in early pregnancy as discussed below. This and other analyses of iron metabolism in the obese group are further discussed and explored elsewhere [20], and we plan long-term follow ups to assess its impact on offspring neurodevelopment.

Our results demonstrated lower levels of vitamin B12 and folate in obese mothers compared to controls. This may partly be explained by differences in ongoing or recently discontinued intake of supplements at inclusion, but it may also reflect differences in dietary habits. Nevertheless, this observation is interesting and we found few previous assessments of vitamin B levels in

Table 4 Cord blood analyses

	<i>N</i>	Normal weight <i>n</i> ≤ 76	Overweight or obese <i>n</i> ≤ 62	Gestational diabetes <i>n</i> ≤ 45	<i>P</i>
Iron status					
Ferritin (µg/l)	119	168 (103–265)	163 (115–233)	139 (88–268)	0.930
TS (%)	49	60.7 ± 2.1	55.1 ± 17.7	64.3 ± 20.0	0.254
Hb (g/l)	125	16.7 ± 1.6	17.0 ± 2.4	16.3 ± 2.1	0.359
MCV (fl)	125	107.5 ± 5.4	107.0 ± 6.5	107.9 ± 3.7	0.776
Vitamins					
Vitamin B12 (pg/ml)	45	665 ± 512	436 ± 198	739 ± 333	0.005
Folate (ng/ml) ^b	150	>20 (16.6– > 20)	19.9 (15.5– > 20)	>20 (>20– > 20) ^a	0.010
Other biomarkers					
Glucose (g/l)	156	69.7 ± 21.1	66.2 ± 22.2	77.4 ± 22.4	0.050
Insulin (µU/ml)	118	3.5 (2.2–5.8)	4.4 (2.9–7.3)	5.6 (2.0–10.3)	0.126
HbA1c (%)	34	3.2 (3.0–3.5)	3.3 (3.2–3.5)	3.7 (3.3–4.4)	0.064
Uric acid (mg/dl)	132	4.92 ± 0.90	4.95 ± 1.29	4.94 ± 1.06	0.995
Creatinine (mg/dl)	131	0.60 ± 0.18	0.63 ± 0.23	0.61 ± 0.21	0.712
TSH (ng/ml)	133	11.0 (7.3–15.3)	8.4 (6.3–14.4)	8.1 (5.5–12.2)	0.270
CRP (mg/dl)	47	0.00 (0.00–0.10)	0.01 (0.00–0.03)	0.01 (0.07–0.10)	0.308
Cortisol (µg/dl)	47	13.6 ± 4.5	13.7 ± 10.3	11.6 ± 5.7	0.678

Data are mean ± SD, *n* (%), or median (IQR) and *p*-values are ANOVA, Chi square test, or Kruskal Wallis rank sum test respectively

^aSignificantly different from normal group in a multiple-comparison-adjusted-post hoc test

^bHighest detectable folate level was 20 ng/ml

obese and diabetic mothers to compare with. In one Vietnamese observational trial, authors found no association between BMI and B12 or folate [34]. Our findings are of high clinical interest since deficiencies in both vitamins are associated with maternal as well as offspring morbidity [35]. Folate deficiency is a risk factor for neural tube defects but it is also attributed a key role in fetal programming, due to its role in DNA-methylation [16]. Lower levels of vitamin B12 are associated with increased risk of neural tube defect, adiposity, increased insulin resistance, impaired neurodevelopment and altered risk of cancer in the offspring [36]. A correlation between maternal and infant B12-status was recently verified in a randomized trial from Bangladesh, suggesting that altering levels in the mother can affect the fetus [37]. Furthermore, a recent *in vitro* study showed that placental trophoblasts from GD mothers are less functional and sensitive to alterations in the mother and that leptin may inhibit their transport [38]. Considering these findings, the above described clinical relevance of B12, and the here observed differences in obese mothers, we hypothesize that un-optimal homeostasis of vitamin B12, may be an important mechanism behind negative long term effects following obese pregnancies. Further studies of the mechanisms for vitamin B transport in general and for mothers with obesity and/or GD may give further clues to early programming and are urgently warranted in this and other cohorts. Interestingly, even

though they included overweight and obese mothers, the GD group in the present study had levels of B12 that were similar to the controls. Most likely, this is due to the local routine of offering nutritional counseling to mothers diagnosed with GD, a hypothesis supported by the higher prevalence of B12 supplementation.

Another expected maternal biochemical characteristic was the increased inflammatory response, presented through higher levels of CRP at all measures and of ESR at 24 weeks of gestation both in the overweight/obese mothers and in those with GD. This finding is in accordance with the present literature regarding obesity, which states that obesity is an inflammatory disease [39]. The clinical relevance for these small differences is unclear. However, it has been discussed that inflammation is a potential mechanism for un-optimal fetal development in obese pregnancies [40] and the results here supports further studies of this field.

The overall aim of the PREOBE project is to explore the effect of these maternal metabolic pathologies in the offspring. In the present paper, we analyzed the birth characteristics and found that the infants born from obese mothers had significantly higher birth weight and waist circumference while the infants born from mothers with GD had higher waist/height index compared to controls. Of most clinical relevance was an increased risk of macrosomia in the offspring of obese mothers. Furthermore, there were significant differences between

the groups on chest circumference, showing a trend of higher levels in the obese group, even if these did not reach significance in the post hoc analyses. Altogether, the results suggest that the maternal obesity and GD contribute to small but nevertheless significant over-nutrition, further supporting the hypothesis that excess of “fuel” during pregnancy contributed to increased growth in the fetus [41]. This observation of birth weight is in line with several previous epidemiological trials [15]. We also observed a higher placental/neonatal weight ratio in the obese mothers which might suggest that placental function is compromised [42]. Other researchers have also observed increased prevalence of preterm delivery [6]. In the present paper, we found no such increased risk, possible explained by overall low prevalence (1.5–4.2 %). Neither did we observe a significant difference in infant BMI or gestational age.

A limitation with the study presented here is the heterogeneity among the mothers with GD. First, they were included in the same group independently of BMI and interactions with BMI may occur in the outcomes from this group. Secondly, the GD mothers were offered individualized nutritional recommendations and we have limited individual information regarding the compliance to this. Additional stratification of the GD mothers would have strengthened the study further but due to low sample size, we chose not to do it in the present analyses. Nevertheless, the GD group of the present study represent a common group of mothers in daily clinical practice and further knowledge regarding their metabolism during pregnancy as well as the health of their offspring, is relevant from a clinical perspective. Furthermore, since the groups were only compared to controls, the finding in the overweight and obese groups can be interpreted without a similar risk of interaction with GD. Other limitations of the study are the poor compliance rate. The dropout rate at each time of measure was high, particularly at delivery, and apart from lower power in our statistical analyses, the representativeness of the cohort may be reduced.

The main limitation of the present study is the observational design which does not allow inference of causality behind the observed differences and confounding e.g. from socioeconomic factors and normal fluctuations during pregnancy, may have occurred. However, the aims of the present baseline analyses were to identify differences and to generate candidates for future research. In that perspective, we find the results interesting and relevant. We explored our cohort using a wide variety of biomarkers and other assessments and found several interesting alterations that might hold important clues to the programming mechanisms, whether they are confounded by other factors or not. E.g., the observations in B12 levels are not described previously and prompt

important future research. Above, we discussed the observations made in the present analyses, but due to the amount of data recorded, we also aim further secondary analyses to explore and discuss each group of biomarkers in detail. Furthermore, due to stored serum, placental samples, and DNA, the study enables future additional analyses. But above all, due to the planned follow ups, we are able to explore their correlation to long term health in the offspring.

Conclusions

Maternal overweight, obesity and GD are associated with alterations in nutrition, anthropometrics, and biochemical markers of the pregnant women. The effect on the fetus is yet unclear but we observed higher body weight and increased risk of macrosomia in the offspring to mothers with obesity. Based on the alterations observed and previous research of early programming, we identified several possible candidates for future research including; markers of glucose metabolism, inflammation, and iron status, and levels of vitamin B12 and folate. Except for mechanistic studies, there is a need of long-term studies aiming to explore if any of these markers are associated with long term health in the offspring. To contribute, we plan to follow the PREOBE cohort up to 7.5 years of age.

Abbreviations

BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; GD: gestational diabetes; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; TS: transferrin saturation; TSH: thyroid-stimulating hormone.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

SB analyzed the data, wrote the first draft and was responsible for the statistical analyses. LGV, FJTE, MTS, CMZ, and MJA coordinated and conducted the data collection and participated in data analysis. AA, JAL, JF, CP, SA, AM, and CLS participated in study design, and in the data collection. CC was the principal investigator, responsible for design and coordination of the research. She had the primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript. The present manuscript will be part of a Ph.D. thesis accomplished by FJTE.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge the women and children who participated in the study and also the obstetricians, pediatricians and technicians of the EURISTIKOS team at the University of Granada, Spain. This study was granted by Spanish Ministry of Innovation and Science. Junta de Andalucía: Excellence Projects (P06-CTS-02341); Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-40254-C03-01); Research post-doctoral fellowship from the Alfonso Martín Escudero Foundation; MyNewGut FP7 EU Project (Grant agreement n° 613979); DynaHEALTH EU Project HORIZON 2020 (Grant agreement n°: 633595-2); Marie Curie post-doctoral fellowship (FP7, no. 329812, NutriOmics); The first author received Post Doc scholarships from Henning and Johan Throne-Holst's foundation, and the Swedish Research Council for Health, Working life and Welfare (FORTE, ref 2014–2648). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The PREOBE team: Cristina Campoy, *University of Granada, Spain*; Luz M^a García-Valdés, *University of Granada, Spain*; Francisco J Torres-Espinola,

University of Granada, Spain; M^a Teresa Segura, University of Granada, Spain; Cristina Martínez-Zaldívar, University of Granada, Spain; Tania Anjos, University of Granada, Spain; Antonio Jerez, University of Granada, Spain; Daniel Campos, University of Granada, Spain; Rosario Moreno-Torres, University of Granada, Spain; Pilar Brandi, University of Granada, Spain; M^a José Aguilar, University of Granada, Spain; Iryna Rusanova, University of Granada, Spain; Jole Martino, University of Granada, Spain; Signe Altmäe, University of Granada, Spain; Tomás Cerdó, University of Granada, Spain; Jesús Florido, University of Granada, Spain; Carmen Padilla, University of Granada, Spain; M^a Teresa Miranda, University of Granada, Spain; Andrés Catena, University of Granada, Spain; Miguel Pérez-García, University of Granada, Spain; Jose A. Lorente, University of Granada, Spain; Juan C. Alvarez, University of Granada, Spain; Ahmad Agil, University of Granada, Spain; Ascensión Marcos, ICTAN-CSIC—Madrid. Spain; Esther Nova, ICTAN-CSIC—Madrid. Spain; M^a Carmen López-Sabater, University of Barcelona, Spain; Lorgen, S.L., University of Barcelona, Spain; Carmen Entrala, University of Barcelona, Spain; Harry McArdle, University of Aberdeen, UK; Michael Symonds, University of Nottingham, UK; Berthold Koletzko, Ludwig-Maximilians University of Munich, Germany; Hans Demmelmair, Ludwig-Maximilians University of Munich, Germany; Olaf Uhl, Ludwig-Maximilians University of Munich, Germany; Gernot Desoye, University of Graz, Austria; Ricardo Rueda, Abbott Laboratories; Staffan K Berglund, University of Umeå, Sweden.

Author details

¹Centre of Excellence for Paediatric Research EURISTIKOS, Department of Paediatrics, School of Medicine, University of Granada, Avda. De Madrid 11, 18012 Granada, Spain. ²Department of Clinical Sciences, Pediatrics, Umeå University, 901 85 Umeå, Sweden. ³Department of Pharmacology, University of Granada, Avda. de la Investigación 11, 18016 Granada, Spain. ⁴Department of Legal Medicine, University of Granada, Avda. de la Investigación 11, 18016 Granada, Spain. ⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Granada, Avda. de la Investigación 11, 18016 Granada, Spain. ⁶Department of Paediatrics, University of Granada, Avda. de la Investigación 11, 18016 Granada, Spain. ⁷Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Food Sciences, José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain. ⁸Department of Nutrition and Bromatology, University of Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain.

Received: 19 September 2015 Accepted: 2 February 2016

Published online: 01 March 2016

References

- Barker DJ. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *Proc Nutr Soc.* 1992;51(2):135–44.
- Symonds ME, Stephenson T, Gardner DS, Budge H. Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(1):53–63.
- Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.* 1995; 25(7):457–63.
- Hanley B, Dijane J, Fewtrell M, Grynberg A, Hummel S, Junien C, et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics—a review of present priorities and future opportunities. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl 1:S1–S25. doi:10.1017/S0007114510003338.
- Shaw J. Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. *Pediatr Diabetes.* 2007;8 Suppl 9:7–15. doi:10.1111/j.1399-5448.2007.00329.x.
- Sharashova EE, Anda EE, Grijbovski AM. Early pregnancy body mass index and spontaneous preterm birth in northwest Russia: a registry-based study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14:303. doi:10.1186/1471-2393-14-303.
- Taebe M, Sadat Z, Saberi F, Kalahroudi MA. Early pregnancy waist-to-hip ratio and risk of preeclampsia: a prospective cohort study. *Hypertens Res.* 2015;38(1):80–3. doi:10.1038/hr.2014.133.
- Amemiya S, Dobashi K, Urakami T, Sugihara S, Ohzeki T, Tajima N. Metabolic syndrome in youths. *Pediatr Diabetes.* 2007;8 Suppl 9:48–54. doi:10.1111/j.1399-5448.2007.00332.x.
- Van Lieshout RJ. Role of maternal adiposity prior to and during pregnancy in cognitive and psychiatric problems in offspring. *Nutr Rev.* 2013;71 Suppl 1:S95–S101. doi:10.1111/nure.12059.
- Rizzo GS, Sen S. Maternal obesity and immune dysregulation in mother and infant: A review of the evidence. *Paediatr Respir Rev.* 2014. doi:10.1016/j.prv.2014.10.005.
- Fall CH. Evidence for the intra-uterine programming of adiposity in later life. *Ann Hum Biol.* 2011;38(4):410–28. doi:10.3109/03014460.2011.592513.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet.* 2014;384(9945):766–81. doi:10.1016/s0140-6736(14)60460-8.
- Stenninger E, Flink R, Eriksson B, Sahlen C. Long-term neurological dysfunction and neonatal hypoglycaemia after diabetic pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;79(3):F174–9.
- Larque E, Ruiz-Palacios M, Koletzko B. Placental regulation of fetal nutrient supply. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16(3):292–7. doi:10.1097/MCO.0b013e32835e3674.
- Starling AP, Brinton JT, Glueck DH, Shapiro AL, Harrod CS, Lynch AM, et al. Associations of maternal BMI and gestational weight gain with neonatal adiposity in the healthy start study. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(2):302–9. doi:10.3945/ajcn.114.094946.
- Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(6):279–89. doi:10.1016/j.tem.2013.01.010.
- Sarr O, Yang K, Regnault TR. In utero programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction. *J Pregnancy.* 2012;2012:134758. doi:10.1155/2012/134758.
- Reichetzeder C, Chen H, Foller M, Slowinski T, Li J, Chen YP, et al. Maternal vitamin D deficiency and fetal programming—lessons learned from humans and mice. *Kidney Blood Press Res.* 2014;39(4):315–29. doi:10.1159/000355809.
- Georgieff MK, Landon MB, Mills MM, Hedlund BE, Faassen AE, Schmidt RL, et al. Abnormal iron distribution in infants of diabetic mothers: spectrum and maternal antecedents. *J Pediatr.* 1990;117(3):455–61.
- García-Valdes L, Campoy C, Hayes H, Florido J, Rusanova I, Miranda MT, et al. The impact of maternal obesity on iron status, placental transferrin receptor expression and hepcidin expression in human pregnancy. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(4):571–8. doi:10.1038/ijo.2015.3.
- Long NM, Rule DC, Zhu MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity upregulates fatty acid and glucose transporters and increases expression of enzymes mediating fatty acid biosynthesis in fetal adipose tissue depots. *J Anim Sci.* 2012;90(7):2201–10. doi:10.2527/jas.2011-4343.
- Hibbeln JR, Davis JM, Steer C, Emmett P, Rogers I, Williams C, et al. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet.* 2007;369(9561):578–85. doi:10.1016/s0140-6736(07)60277-3.
- National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 1979;28(12):1039–57.
- Metzger BE. Summary and recommendations of the third international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes.* 1991;40 Suppl 2:197–201.
- Santacruz A, Collado MC, García-Valdes L, Segura MT, Martín-Lagos JA, Anjos T, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr.* 2010; 104(1):83–92. doi:10.1017/s0007114510000176.
- Torres-Espínola FJ, Altmäe S, Segura MT, Jerez A, Anjos T, Chisaguano M, et al. Maternal PPARG Pro12Ala polymorphism is associated with infant's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age. *Early Hum Dev.* 2015;91(8):457–62.
- Uhl O, Demmelmair H, Segura MT, Florido J, Rueda R, Campoy C, et al. Effects of obesity and gestational diabetes mellitus on placental phospholipids. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;109(2):364–71. doi:10.1016/j.diabres.2015.05.032.
- Martino J, Sebert S, Segura MT, García-Valdes L, Florido J, Padilla MC et al. Maternal body weight and gestational diabetes differentially influence placental and pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; jc20152590. doi:10.1210/jc.2015-2590.
- American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2004;27 Suppl 1:S88–90.
- Siega-Riz AM, Gray GL. Gestational weight gain recommendations in the context of the obesity epidemic. *Nutr Rev.* 2013;71 Suppl 1:S26–30. doi:10.1111/nure.12074.

31. Koletzko B, Symonds ME, Olsen SF. Programming research: where are we and where do we go from here? *Am J Clin Nutr*. 2011;94(6 Suppl):2036s–43s. doi:10.3945/ajcn.111.018903.
32. Cao C, O'Brien KO. Pregnancy and iron homeostasis: an update. *Nutr Rev*. 2013;71(1):35–51. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00550.x.
33. Georgieff MK. The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1267–71.
34. Laillou A, Yakes E, Le TH, Wieringa FT, Le BM, Moench-Pfanner R, et al. Intra-individual double burden of overweight and micronutrient deficiencies among Vietnamese women. *PLoS One*. 2014;9(10), e110499. doi:10.1371/journal.pone.0110499.
35. Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2 Suppl):S101–11. discussion S12–5.
36. Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(1):2–7. doi:10.1038/ejcn.2013.232.
37. Siddiqua TJ, Ahmad SM, Ahsan KB, Rashid M, Roy A, Rahman SM et al. Vitamin B12 supplementation during pregnancy and postpartum improves B12 status of both mothers and infants but vaccine response in mothers only: a randomized clinical trial in Bangladesh. *Eur J Nutr*. 2015. doi:10.1007/s00394-015-0845-x.
38. Araujo JR, Correia-Branco A, Moreira L, Ramalho C, Martel F, Keating E. Folic acid uptake by the human syncytiotrophoblast is affected by gestational diabetes, hyperleptinemia, and TNF-alpha. *Pediatr Res*. 2013; 73(4 Pt 1):388–94. doi:10.1038/pr.2013.14.
39. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):4–12.
40. Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed Res Int*. 2014;2014:418975. doi:10.1155/2014/418975.
41. Koletzko B, Brands B, Poston L, Godfrey K, Demmelmair H. Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(3):371–8. doi:10.1017/s0029665112000596.
42. Wallace JM, Horgan GW, Bhattacharya S. Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. *Placenta*. 2012;33(8):611–8. doi:10.1016/j.placenta.2012.05.006.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age – A Follow Up from the PREOBE Cohort

Francisco J. Torres-Espinola¹, Staffan K Berglund^{1,2}, Luz M^a García-Valdés¹, M^a Teresa Segura¹, Antonio Jerez^{1,3}, Daniel Campos¹, Rosario Moreno-Torres¹, Ricardo Rueda⁴, Andrés Catena⁵, Miguel Pérez-García⁵, Cristina Campoy^{1,3*}, PREOBE team[¶]

1 Centre of Excellence for Paediatric Research EURISTIKOS, University of Granada, Granada, Spain, **2** Department of Clinical Sciences, Pediatrics, Umeå University, Umeå, Sweden, **3** Department of Paediatrics, University of Granada, Granada, Spain, **4** R&D Department, Abbott Laboratories, Granada, Granada, Spain, **5** Mind, Brain and Behaviour International Research Centre (CIMCYC), University of Granada, Granada, Spain

[¶] Membership of the PREOBE group is provided in the Acknowledgments.

* ccampoy@ugr.es



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Torres-Espinola FJ, Berglund SK, García-Valdés LM, Segura MT, Jerez A, Campos D, et al. (2015) Maternal Obesity, Overweight and Gestational Diabetes Affect the Offspring Neurodevelopment at 6 and 18 Months of Age – A Follow Up from the PREOBE Cohort. PLoS ONE 10(7): e0133010. doi:10.1371/journal.pone.0133010

Editor: Olivier Baud, Hôpital Robert Debré, FRANCE

Received: May 4, 2015

Accepted: June 23, 2015

Published: July 24, 2015

Copyright: © 2015 Torres-Espinola et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This study was funded by Spanish Ministry of Innovation and Science. Junta de Andalucía: Excellence Projects (P06-CTS-02341); Spanish Ministry of Education (Grant no. SB2010-0025); Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-40254-C03-01); Further support was received by Abbott Laboratories, Granada, Spain. The funders had no role in study design, data

Abstract

Background

Brain development in fetal life and early infancy is critical to determine lifelong performance in various neuropsychological domains. Metabolic pathologies such as overweight, obesity, and gestational diabetes in pregnant women are prevalent and increasing risk factors that may adversely affect long-term brain development in their offspring.

Objective

The objective of this research was to investigate the influence of maternal metabolic pathologies on the neurodevelopment of the offspring at 6 and 18 months of life.

Design

This was a prospective case-control study of 331 mother- and child pairs from Granada, Spain. The mothers were included during pregnancy into four groups according to their pre-gestational body mass index and their gestational diabetes status; overweight (n:56), obese (n:64), gestational diabetic (n:79), and healthy normal weight controls (n:132). At 6 months and 18 months we assessed the children with the Bayley III scales of neurodevelopment.

Results

At 6 months (n=215), we found significant group differences in cognition composite language, and expressive language. Post hoc test revealed unexpectedly higher scores in the

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The study was registered at www.ClinicalTrials.gov, identifier: [NCT01634464](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01634464).

Competing Interests: The study was funded in part by Abbott Laboratories, Granada, Spain. There are no relevant declarations relating to employment, consultancy, patents, products in development, or marketed products to declare. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

obese group compared to the normal weight group and a similar trend in overweight and diabetic group. The effects on language remained significant after adjusting for confounders with an adjusted odds ratio for a value above median in composite language score of 3.3 (95% CI: 1.1, 10.0; $p=0.035$) for children of obese mothers. At 18 month ($n=197$), the offspring born to obese mothers had lost five points in language composite scores and the previous differences in language and cognition was replaced by a suggestive trend of lower gross motor scores in the overweight, obese, and diabetic groups.

Conclusions

Infants of obese mothers had a temporary accelerated development of cognition and language, followed by a rapid deceleration until 18 months of age, particularly of language scores. This novel observation prompts further confirmative studies to explore possible placental and neurodevelopmental mechanisms involved.

Introduction

The rates of obesity and diabetes have experienced exceptional increase during recent years in the developed world. In parallel, studies of how these diseases affect human health are prioritized [1, 2]. One important field of research is the influence of these pathologies on pregnant women and their offspring. It is well described that excessive weight before pregnancy, particularly in combination with rapid weight gain during pregnancy, can determine the occurrence of gestational diabetes [3], a well-known risk factor both to the mother and the fetus [4]. Gestational diabetes but also pre-gestational overweight and obesity in general, have been suggested to interact with the infant micronutrient status, birth anthropometrics and even with the offspring's neurodevelopment [4–8].

Brain development in fetus and in early years of life is critical to determine lifelong performance in various neuropsychological domains such as cognition, language, and motor functions. It has been observed that the last trimester of pregnancy is un-arguably the most important period of neuronal determination, synaptogenesis and dendritic arborization [9–11]. Thus, differences in the intrauterine environment at different stages of fetal life, may substantially determine long term neurodevelopment and brain performance [7, 9, 12, 13]. Maternal metabolic pathologies are possible examples of such differences.

In recent years, several studies have suggested that children born to mothers with gestational diabetes present language delay, impaired recognition memory, poor motor development and neuropsychological impairment at different stages of childhood [4, 8, 14–19]. Furthermore, neurodevelopment of children is associated to maternal weight gain during pregnancy, to maternal pre-pregnancy body mass index (BMI) and to obesity [5, 20–22]. However, these studies show diverging results and as recently concluded in two reviews, most of them did not prospectively explore the effects on neurodevelopment before 20 months of life [23, 24]. The effect of obesity, overweight, and diabetes on the infants' early neurodevelopment, requires further knowledge since it may be an important predictor of psychological problems in adulthood, adult intelligence quotient (IQ), aging, and problems in executive functions [7, 25–27]. Furthermore, there is a gap in previous research considering the isolated effect of gestational diabetes and obesity respectively [23, 24].

The PREOBE study is a case control prospective cohort trial exploring pregnant women with obesity, overweight and gestational diabetes and their offspring compared to healthy, normal weight mothers. The objective of the present work was to investigate the influence of these pathologies on the offspring's neurodevelopment at 6 and 18 months of life.

Subjects and Methods

The general objective of this prospective cohort study was to study peri- and postnatal influence of maternal overweight, obesity and gestational diabetes. The pregnant women were recruited between 2007 and 2012 through collaboration with the two University tertiary Hospitals in Granada, the "San Cecilio" and Mother-Infant Hospital (Spain). In total, 331 healthy, pregnant women with singleton pregnancies and age between 18 and 45 years were included between 12 to 34 weeks of pregnancy. The mothers were actively included into four different groups based on their calculated pre-gestational BMI and their gestational diabetes status: Healthy normal weight group ($18.5 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$; $n = 132$), overweight group ($25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$; $n = 56$), obese group ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$; $n = 64$), and gestational diabetes group ($\text{BMI} \geq 18.5 \text{ kg/m}^2$; $n = 79$). The latter group was formed both by mothers included with already diagnosed gestational diabetes and by those from the first three groups who developed gestational diabetes during the study and accordingly switched group. Consequently, the gestational diabetic group included 23 with overweight and 24 with obesity. According to the present hospital routines, the mothers diagnosed of gestational diabetes were offered to participate in an endocrine-nutritional programme to optimize glucose control using nutritional and lifestyle recommendations and in some cases medical treatment. The overweight and obese mothers without gestational diabetes received no similar intervention.

The study exclusion criteria were: simultaneous participation in any other research study, any kind of drug treatment, diagnosed diseases other than obesity, overweight or gestational diabetes (e.g. pre-gestational diabetes, hypertension or preeclampsia, fetal intrauterine growth retardation, maternal infection during pregnancy, hypo/hyperthyroidism, hepatic diseases and renal disease), and vegan diet. The 310 "mother-infant" pairs who remained at delivery, defined the four final PREOBE-groups: Normal weight group ($n = 128$), overweight group ($n = 54$), obese group ($n = 52$) and gestational diabetes group ($n = 76$). In the present research, another 2 cases were excluded after delivery due to congenital disorder in the offspring (Fig 1).

Baseline and background characteristics of the pregnant women were recorded using questionnaires and medical records including age, pre-gestational weight, height and BMI, educational level, parity, smoking habits and alcohol consumption during pregnancy. Similarly, the medical records of the infants were reviewed for information regarding sex, birth weight, birth length, birth head circumference, Apgar scores, gestational age at birth, and placental weight. Furthermore at three months of age, mothers were interviewed by an expert pediatrician (AJ) about the infant diet. The pediatrician categorized the feeding mode into breastfeeding, formula or mixed type of feeding.

The present follow-up was conducted at 6 and 18 months after delivery and included an anthropometric revision, health questionnaires and medical assessments of the child. To further exclude or correct for possible confounding effects, mothers were assessed with the Intelligence test of Catell (Factor G) to obtain mothers' IQ. Factor G is a standardized validated test available in Spanish with a population mean of 100 points and a standard deviation of 15 points.

Assessments of infant neurodevelopment at 6 and 18 months of age were conducted using the Bayley Scales of Infant Development, Third Edition (BSID-III). The BSID-III measures infant development across five domains: cognitive skills, receptive language, expressive

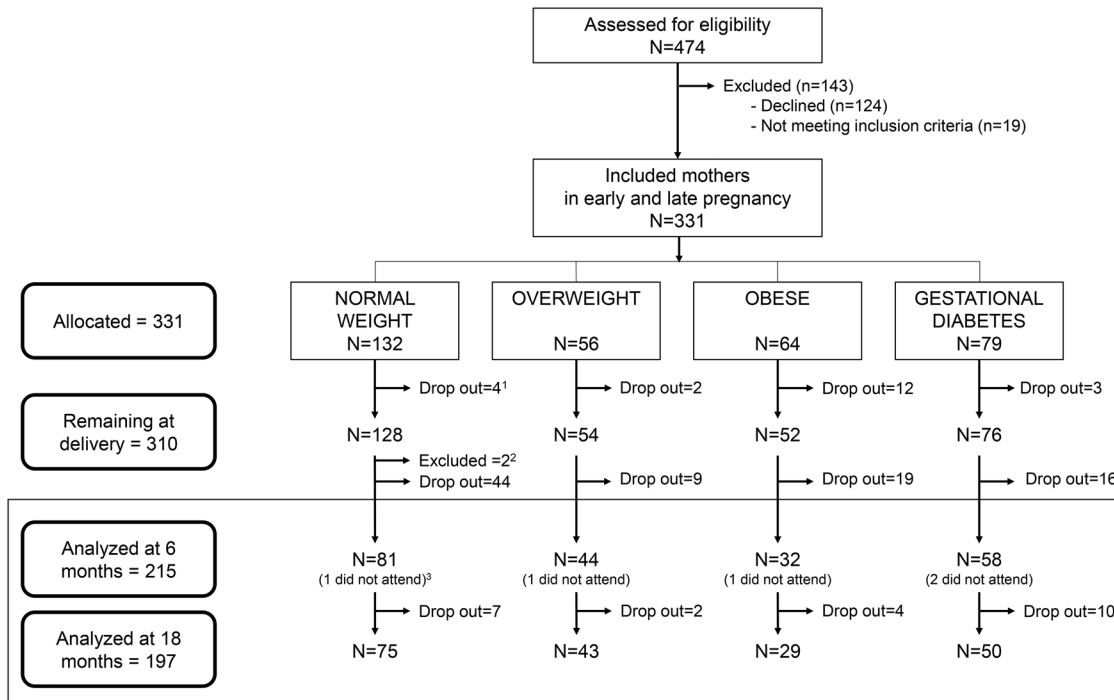


Fig 1. Trial profile of the neurodevelopmental follow-up. The study included 331 pregnant women at different stages of pregnancy but before 34 weeks of gestation. Included mothers were allocated to four different groups based on their pre-gestational BMI and their gestational diabetes status. ¹In total 21 mothers dropped out of the study before delivery without giving a reason. The 310 mother-child pairs who remained at delivery constituted the four PREOBE-groups in the present trial. ²During early infancy, two children were excluded due to diagnosed congenital disorder (heart disease and immunodeficiency) and until 6 months, another 88 were lost to follow up giving no reason. ³Five children did not attend to the 6 months Bayley test but came to the test at 18 months.

doi:10.1371/journal.pone.0133010.g001

language, fine motor, and gross motor development [28, 29]. The BSID-III was always performed in the research center by the same licensed pediatric psychologist (FJTE). The approximate total time with each test was 15–25 minutes at 6 months and 30–45 minutes at 18 months. Mothers also filled in the BSID-III questionnaire assessing the infant’s social emotional behavior.

Ethics statement

The research was approved by the Bioethical Committees for Clinical Research of the Clinical University Hospital San Cecilio and the Mother-Infant University Hospital of Granada. An ethical approval was also obtained by the Research Bioethical Committee of the University of Granada. Written informed consent was obtained from all participants at study entry.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package for Windows (version 20.0; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistics were mean and standard deviation for normal variables, median and interquartile range for non-normal ones, and absolute frequencies and percentages for those categorical. Comparisons of continuous variables were conducted using analysis of variance (ANOVA) or in cases of non-normally distributed variables, non-parametric rank-sum test. Chi-Square test was applied to test group differences between categorical variables. In cases of significant group differences, Bonferroni corrected post hoc comparisons were used to identify significant pairwise group differences.

To assess the predictive value of the maternal pathologies, the Bayley scores were all dichotomized using the 50th percentile and a logistic regression model was used to calculate the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) for having a value above median for the overweight group, the obese group and the gestational diabetes group respectively, using the normal weight group as a reference.

Finally, confounding effects on the Bayley outcomes were examined using the following approach: All registered baseline or background factors were compared between the groups. Variables showing significant group differences were adjusted for in univariate general linear models (ANCOVA) and in multivariate logistic regression models respectively. However, due to lack of background data in some cases, the adjusted models included fewer cases and both the unadjusted and adjusted group effects were presented.

Results

Of the 308 mother-child pairs remaining after exclusions and drop outs at end of pregnancy, 215 were examined with the Bayley test at 6 months. At the follow up at 18 months, 5 of the missing cases came back to the study but another 23 had dropped out resulting in 197 assessed cases at the second Bayley testing (Fig 1). In Table 1, background and baseline factors were compared among the PREOBE-groups. We observed significant differences between the study groups in maternal age, weight gain during pregnancy, placental weight, maternal educational level, and as expected by group definitions, in pre-conceptional maternal BMI. The skewed variables, except BMI, were adjusted for in the analyses of group effects on the Bayley scores below. The analyzed children included 3 born late preterm, one from obese, one from overweight and one from the diabetic group. They were all assessed at corrected age.

The results of the Bayley tests at 6 and 18 months compared among the four PREOBE-groups are presented in Tables 2 and 3. At 6 months of age, we found significant group differences in the composite scores of language and cognition as well as in the subscale of expressive language. The post hoc analyses demonstrated significantly higher scores in the children born to obese mothers compared to those born to healthy normo-weight mothers. (Bonferroni corrected $p = 0.013$, 0.008 , and 0.031 for composite language, composite cognition, and expressive language respectively). A similar, non-significant trend was observed in the overweight and diabetic group. At 18 months of age the results were different. None of the significant differences observed at 6 months remained. Instead, a significant difference was found between the study groups in the gross motor score. However, except for a *trend* of higher gross motor scores in the infants born to the normal weight group compared to the gestational diabetes group (Bonferroni-corrected $p = 0.070$, uncorrected $p = 0.020$), no pairwise group differences were significant in a Bonferroni post hoc test. The significant differences in composite language and expressive language scores at 6 months and in gross motor scores at 18 months remained in the univariate general linear model adjusting for the possible confounders (*maternal age, maternal education, placental weight, and weight gain during pregnancy*), but not the effect on cognition at 6 months. However, only 156 and 147 cases at 6 months and 18 months respectively were included in these models since background data were missing in some cases.

The logistic regression models, calculating the ORs for a value above median for the obese-, overweight- and gestational diabetes groups, respectively, with the normal weight group as a reference are presented in Table 4. At 6 months, the models revealed an increased chance in the obese group vs. the normal weight group of having the cognitive composite score, a composite language score, and a receptive language score above the median. A similar increased chance was seen in the overweight group with regard to composite language score. When the logistic regression models were adjusted for the four background variables, a significant group

Table 1. Baseline and background characteristics of the mother-child pairs who participated in the neurodevelopmental follow up at 6 months of age (n = 215), including group comparisons among the four PREOBE-groups.

		Normal weight n = 81	Overweight n = 44	Obese n = 32	Gestational Diabetes n = 58	P ¹
Maternal Age (y) ²		31.0±3.8 ^{a,b}	32.7±3.9 ^{a,c}	30.1±4.2 ^b	34.0±4.2 ^c	< 0.001
Weight Gain During Pregnancy (kg) ³		13.0±5.9 ^a	10.3±4.9 ^{a,b}	7.9±6.3 ^b	7.0±8.6 ^{b,c}	< 0.001
Maternal educational level ⁴	Primary/Secondary	42.5% ^a	55.8% ^{a,b}	84.4% ^b	57.9% ^a	0.001
	University/Doctor	57.5% ^a	44.2% ^{a,b}	15.6% ^b	42.1% ^a	0.001
Maternal IQ (points) ³		110.1±13.4	104.2±11.4	105.4±11.4	102.9±13.2	0.074
Pre-conceptional maternal BMI (kg/m2) ³		22.0±1.7 ^a	27.2±1.4 ^b	33.1±2.7 ^c	28.0±6.6 ^b	< 0.001
No of siblings ⁴	0	58.8%	53.5%	40.6%	52.6%	0.387
	≥1	41.2%	46.5%	59.4%	47.4%	0.387
Smoking ⁴	no	83.1%	92.7%	90.3%	93.8%	0.235
	yes	16.9%	7.3%	9.7%	6.2%	0.235
Alcohol consumption during pregnancy ⁴	No	95.8%	97.6%	96.8%	93.8%	0.827
	yes	4.2%	2.4%	3.2%	6.2%	0.827
Placental weight (g) ³		483±117 ^a	509±123 ^{a,b}	560±136 ^b	522.3±120 ^{a,b}	0.037
Birth weight (g) ³		3284±378	3290±520	3481±533	3311±408	0.176
Birth length (cm) ³		50.5±1.8	50.4±1.7	51.2±2.4	50.1±2.3	0.141
Birth Head Circumference (cm) ³		34.4±1.3	34.5±1.1	34.4±1.8	34.6±1.5	0.807
Sex ⁴	Boy	49.4% ^a	45.5% ^a	53.1% ^a	55.2% ^a	0.782
	Girl	50.6% ^a	54.5% ^a	46.9% ^a	44.8% ^a	0.782
Infant type of feeding at 3 months ⁴	Breast-fed	57.7%	53.8%	35.5%	42.3%	0.212
	Infant formula	22.5%	30.8%	48.4%	36.5%	0.212
	Mixed	19.7%	15.4%	16.1%	21.2%	0.212
Gestational Age (wk) ³		39.5±1.1	39.5±1.4	39.9±1.5	39.4±1.2	0.410
Apgar 1min ²		9 (0)	9 (0)	9 (0)	9 (0)	0.218
Apgar 5 min ²		10 (0)	10 (0)	10 (0)	10 (0)	0.748
Admitted to NICU ⁴	No	93.5%	100.0%	100.0%	100.0%	0.053
	Yes	6.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.053

¹ P-values for overall differences between PREOBE-groups. Analysis of variance for normally distributed variables, Kruskal-Wallis rank-sum test for non-normal continuous variables and Chi-square test for proportions. Values who do not share the same suffix (abc) are significantly different in a Bonferroni post hoc test.

Data are:

²Median and Interquartile Range for non-normally distributed continuous variables;

³Mean ± Standard Deviation for normally distributed continues variables;

⁴Percentage for proportions.

doi:10.1371/journal.pone.0133010.t001

effects remained in the odds for overweight and obese group compared to the normal weight group in having a composite language score above the median.

At 18 months, the unadjusted analyses yielded significantly lower odds for children born to mothers with pre-gestational obesity in having a gross motor score above the median and for the offspring of gestational diabetic mothers compared to normal group in having a high score of expressive language, composite language and gross motor scores. However, the differences did not remain significant in the adjusted models. Interestingly, when analyzing all groups together, a gross motor score at 18 months below or equal to median was positively associated with a composite language score above median at 6 months of age. Risk Ratio (95% CI) was 1.4 (1.1–1.7), p = 0.019.

Table 2. Effects of maternal pre-pregnancy overweight, obesity or gestational diabetes on infant's Bayley scores¹ at 6 months of age compared to those born to healthy normoweight pregnant women (controls).

Bayley scores at 6 mo	Normal weight n = 81	Overweight n = 44	Obese n = 32	Gestational Diabetes n = 58	P _{unadj}	P _{adj}
Composite language	104.9 ± 10.1 ^a	109.0 ± 9.8 ^{ab}	111.0 ± 8.9 ^b	108.1 ± 8.6 ^{ab}	0.009	0.022
Expressive language	10.0 ± 1.9 ^a	10.7 ± 2.0 ^{ab}	11.1 ± 1.8 ^b	10.4 ± 1.7 ^{ab}	0.024	0.010
Receptive language	11.6 ± 2.2	12.2 ± 2.2	12.6 ± 2.3	12.3 ± 2.1	0.131	0.351
Composite motor	105.8 ± 11.2	104.5 ± 11.1	106.6 ± 11.1	103.7 ± 12.6	0.620	0.852
Fine motor	12.5 ± 2.2	12.4 ± 2.2	12.9 ± 1.9	12.0 ± 2.2	0.254	0.373
Gross motor	9.4 ± 2.7	9.0 ± 2.8	9.3 ± 2.4	9.2 ± 3.0	0.926	0.912
Composite cognitive	107.5 ± 7.9 ^a	109.1 ± 8.0 ^{ab}	112.8 ± 7.1 ^b	108.4 ± 7.9 ^{ab}	0.014	0.264
Composite socio-emotional	101.1 ± 15.6	101.2 ± 16.5	94.4 ± 18.7	99.4 ± 13.6	0.199	0.469

Data are mean ± SD

¹ Infants' neurodevelopment assessed using the BSID-III: Bayley Scales of Infant Development, Third Edition

P_{unadj} = Analysis of variance (ANOVA). Values not sharing the same suffix (abc) were significantly different in a Bonferroni post hoc test.

P_{adj} = Analysis of covariance (ANCOVA) for the group differences using univariate general linear model including main effects from the following possible confounder: Maternal age, maternal education, placental weight, and weight gain during pregnancy (n = 153).

doi:10.1371/journal.pone.0133010.t002

As a last secondary analysis, the raw differences in Bayley III scores between 6 and 18 months of age were calculated for each variable and presented in Table 5. In composite language scores, the change in the obese group was significantly different compared to normal weight group (Bonferroni corrected p = 0.019). In average, the obese groups lost five points while the group of normal weight mothers showed an increase of three points.

Discussion

In the present case control study, we explored the effect of being born to a mother with pre-gestational overweight or obesity, or with gestational diabetes on child neurodevelopment. The unique study design made it possible to explore the effect of obesity, and overweight separated

Table 3. Effects of maternal pre-pregnancy overweight, obesity or gestational diabetes on infant's Bayley scores¹ at 18 months of age compared to those born to healthy normo-weight pregnant women (controls).

Bayley scores at 18 mo	Normal weight n = 75	Overweight n = 43	Obese n = 29	Gestational Diabetes n = 50	P _{unadj}	P _{adj}
Composite language	107.9 ± 9.3	106.2 ± 8.2	105.5 ± 8.8	106.0 ± 6.5	0.463	0.357
Expressive language	10.7 ± 1.9	10.4 ± 2.0	10.4 ± 2.1	10.4 ± 1.5	0.785	0.552
Receptive language	11.9 ± 1.8	11.9 ± 1.1	11.4 ± 1.3	11.6 ± 1.4	0.316	0.442
Composite motor	118.1 ± 10.2	115.4 ± 8.0	114.1 ± 10.0	115.0 ± 7.5	0.125	0.098
Fine motor	13.0 ± 2.3	12.9 ± 1.9	12.7 ± 2.3	12.9 ± 1.7	0.951	0.633
Gross motor	13.0 ± 2.1 ^a	12.1 ± 1.9 ^a	11.9 ± 1.9 ^a	12.0 ± 1.9 ^a	0.015	0.041
Composite cognitive	120.3 ± 11.5	123.4 ± 11.3	121.6 ± 9.6	121.8 ± 10.8	0.551	0.763
Composite socio-emotional	102.8 ± 15.2	102.8 ± 17.8	98.1 ± 17.1	102.1 ± 15.8	0.583	0.941

Data are mean ± SD

¹ Infants' neurodevelopment assessed using the BSID-III: Bayley Scales of Infant Development, Third Edition.

P_{unadj} = Analysis of variance (ANOVA). Values not sharing the same suffix (abc) were significantly different in a Bonferroni post hoc test.

P_{adj} = Analysis of covariance (ANCOVA) for the group differences using univariate general linear model including main effects from the following possible confounder: Maternal age, maternal education, placental weight, and weight gain during pregnancy (n = 147).

doi:10.1371/journal.pone.0133010.t003

Table 4. Logistic regression models assessing the odds of having the different Bayley scale scores at 6 and 18 months of age above the median. ORs are presented for infants born to mothers with overweight, obesity and gestational diabetes respectively using infants born to mothers with normal weight and no gestational diabetes as reference.

	Overweight				Obesity				Gestational Diabetes			
	Unadjusted		Adjusted ¹		Unadjusted		Adjusted ¹		Unadjusted		Adjusted ¹	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Bayley scores at 6 months												
Cognitive composite score > P50 ²	1.385 (0.649–2.955)	0.400	1.543 (0.628–3.793)	0.344	2.923 (1.258–6.793)	0.013*	2.310 (0.777–6.866)	0.132	1.314 (0.653–2.647)	0.444	1.407 (0.533–3.715)	0.491
Receptive language score > P50	2.038 (0.942–4.410)	0.071	1.674 (0.665–4.212)	0.274	2.366 (1.012–5.534)	0.047*	1.620 (0.536–4.900)	0.393	1.893 (0.925–3.874)	0.081	1.543 (0.571–4.169)	0.393
Expressive language score > P50	1.593 (0.761–3.336)	0.217	1.919 (0.780–4.722)	0.156	2.126 (0.924–4.891)	0.076	2.635 (0.866–8.016)	0.088	0.826 (0.412–1.654)	0.589	0.680 (0.246–1.883)	0.458
Composite language score > P50	2.375 (1.111–5.075)	0.026*	2.756 (1.099–6.910)	0.031*	2.692 (1.159–6.249)	0.021*	3.297 (1.087–10.003)	0.035*	1.676 (0.826–3.401)	0.152	1.786 (0.658–4.848)	0.255
Fine motor score > P50	1.077 (0.517–2.244)	0.843	1.233 (0.509–2.986)	0.643	1.385 (0.608–3.154)	0.438	2.029 (0.677–6.080)	0.207	0.875 (0.445–1.721)	0.699	0.762 (0.292–1.986)	0.577
Gross motor score > P50	1.262 (0.603–2.640)	0.536	1.572 (0.643–3.843)	0.321	1.075 (0.471–2.456)	0.863	1.160 (0.392–3.434)	0.789	1.382 (0.702–2.723)	0.349	1.364 (0.519–3.583)	0.529
Composite motor score > P50	0.910 (0.432–1.916)	0.804	1.058 (0.427–2.625)	0.903	1.160 (0.510–2.638)	0.724	1.137 (0.380–3.400)	0.818	0.864 (0.435–1.714)	0.675	0.701 (0.256–1.921)	0.490
Composite socio emotional score > P50	1.151 (0.543–2.441)	0.714	1.530 (0.625–3.747)	0.352	0.635 (0.261–1.546)	0.317	0.706 (0.225–2.213)	0.550	1.158 (0.563–2.382)	0.691	1.348 (0.510–3.565)	0.547
Bayley scores at 18 months												
Cognitive composite score > P50	2.231 (0.986–5.045)	0.054	2.457 (0.914–6.606)	0.075	1.086 (0.396–2.974)	0.873	0.978 (0.242–3.957)	0.976	1.919 (0.870–4.233)	0.106	2.337 (0.773–7.068)	0.133
Receptive language score > P50	0.648 (0.281–1.492)	0.308	0.669 (0.251–1.785)	0.422	0.393 (0.134–1.150)	0.088	0.460 (0.121–1.747)	0.254	0.532 (0.234–1.208)	0.131	0.518 (0.167–1.611)	0.256
Expressive language score > P50	0.571 (0.243–1.339)	0.198	0.626 (0.222–1.766)	0.376	0.848 (0.338–2.127)	0.725	0.678 (0.190–2.414)	0.549	0.359 (0.147–0.877)	0.025*	0.634 (0.198–2.030)	0.443
Composite language score > P50	0.904 (0.426–1.919)	0.792	1.145 (0.472–2.781)	0.764	0.480 (0.200–1.155)	0.101	0.335 (0.104–1.080)	0.067	0.442 (0.212–0.922)	0.030*	0.663 (0.244–1.796)	0.418
Fine motor score > P50	1.162 (0.537–2.516)	0.702	1.414 (0.556–3.598)	0.467	0.936 (0.381–2.300)	0.885	1.034 (0.313–3.416)	0.956	1.185 (0.567–2.475)	0.651	1.056 (0.367–3.040)	0.919
Gross motor score > P50	0.566 (0.265–1.208)	0.141	0.540 (0.217–1.344)	0.185	0.354 (0.142–0.878)	0.025*	0.333 (0.104–1.063)	0.063	0.405 (0.193–0.850)	0.017*	0.638 (0.232–1.756)	0.385
Composite motor score > P50	0.739 (0.347–1.575)	0.434	0.678 (0.271–1.693)	0.405	0.628 (0.261–1.507)	0.297	0.351 (0.107–1.157)	0.085	0.744 (0.362–1.530)	0.421	0.694 (0.251–1.919)	0.481

(Continued)

Table 4. (Continued)

	Overweight				Obesity				Gestational Diabetes			
	Unadjusted		Adjusted ¹		Unadjusted		Adjusted ¹		Unadjusted		Adjusted ¹	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Composite socio emotional score > P50	1.151 (0.543–2.440)	0.714	1.002 (0.409–2.457)	0.996	0.635 (0.261–1.546)	0.317	0.974 (0.327–2.901)	0.962	1.158 (0.563–2.382)	0.691	1.641 (0.607–4.438)	0.329

All models use the normal weight group as reference

¹ Logistic regression model adjusted for maternal age, maternal educational level, placental weight, and weight gain during pregnancy.

² ORs for a value of Bayley score above the median.

* p < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0133010.t004

from the effect of gestational diabetes. An unexpected finding, was that children born to mothers with pre-gestational obesity had significantly higher scores in both cognitive and language development at 6 months of age. The difference was observed both when analyzed as continuous and categorical variables, even though our absolute numbers were low. Furthermore, the effect remained for language development even after adjusting for possible confounding background variables. At 18 months, the children born to obese mothers had reduced their scores significantly compared to normal weight group, and the absolute values were similar. Instead there was a minor difference between groups in gross motor scores, this time in favor of those born to mothers with normal pre-gestational weight compared to the other three groups.

Following the suggestion by Barker et al. that condition in fetal and postnatal life could contribute by “early programming” to later disease, several intrauterine and postnatal conditions have been identified, that associate with increased health problems and disease later in life [30]. Some of the most studied fetal conditions are maternal obesity and diabetes and how they contribute to later health in the offspring. Apart from several studies regarding risk of obesity and cardiovascular disease in the offspring, another substantial amount studies have been published about their effect on child neurodevelopment. The impact of this research field is great,

Table 5. Raw difference¹ in Bayley III scores between 6 and 18 months of age in the four PREOBE-groups.

	Normal weight n = 74	Overweight n = 42	Obese n = 28	Gestational Diabetes n = 48	P ²
Composite language	3.0 ± 13.4 ^a	-2.9 ± 13.0 ^{ab}	-5.1 ± 11.7 ^b	-1.5 ± 9.5 ^{ab}	0.008
Expressive language	0.7 ± 2.6 ^a	-0.4 ± 2.8 ^a	-0.7 ± 2.9 ^a	0.06 ± 1.9 ^a	0.043
Receptive language	0.3 ± 2.9	-0.3 ± 2.2	-1.0 ± 2.4	-0.6 ± 2.4	0.091
Composite motor	12.0 ± 13.4	10.9 ± 13.9	7.9 ± 15.5	10.2 ± 13.7	0.601
Fine motor	0.5 ± 3.0	0.6 ± 2.4	-0.1 ± 3.0	0.7 ± 2.7	0.654
Gross motor	3.5 ± 2.8	2.9 ± 3.1	2.6 ± 3.2	2.6 ± 2.9	0.328
Composite cognitive	12.4 ± 12.1	14.1 ± 10.5	9.8 ± 8.8	12.7 ± 12.5	0.496
Composite socio-emotional	1.8 ± 14.9	1.7 ± 21.3	2.7 ± 18.5	0.6 ± 15.4	0.965

Data are mean ± SD.

¹ The raw difference was calculated as the change in the score from 6 to 18 months.

² P-values for overall differences between PREOBE-groups using ANOVA. Values not sharing the same suffix (abc) were significantly different in a Bonferroni post hoc test.

doi:10.1371/journal.pone.0133010.t005

considering the high and increasing prevalence of obesity and metabolic syndrome in the population. The results from previous studies are diverging and the populations examined vary. Furthermore and in contrast to the present paper, post previous research did not separate the effects of obesity, overweight and gestational diabetes respectively.

Previous published studies of the effects of maternal obesity and overweight reported impairment in various domains of neurodevelopment [5, 31–33]. Neggers et al. showed in a study of children from low income Afro-American families ($n = 355$, mean age 5.3 years), that obesity in the mothers predicted in a covariate adjusted model, lower child IQ and nonverbal scores compared to normal weight controls [5]. Similarly, Heikura et al. identified obesity in mothers aside with socioeconomic factors as the major risk factors for mental disability in a large Finish cohort ($n > 21,000$) born 1986 and assessed for IQ at a mean age of 11.5 years [31], and Tanda et al. found a similar effect on cognitive scores [32]. In the largest study of the present topic, Huang et al. retrospectively analyzed over 30,000 mother-child pairs from US where the offspring were assessed by the validated intelligence test (WISC) at seven years of age. After adjusting for several background factors they showed a U-shaped association between maternal pre-pregnancy BMI and child IQ [33].

The research on the effect of obesity and overweight was reviewed in two recent papers by Van Lieshout et al 2010 and 2013. They summarized the result of in total 23 trials assessing this topic at different ages and populations. Authors concluded that the offspring of obese and overweight mothers may have an increased risk of cognitive and attention problems but the lack of data prompts further research and a causality still remains to be proven [23, 24]. A different conclusion was made in a recent paper by Brion et al. who stated that there is an association but it is confounded by sociodemographic effects [20].

The present findings at 6 months of life were unexpected and stand in complete contrast to the above reviewed literature. No previous trial has reported increased scores in any neurobehavioral assessment of obese and overweight mothers' offspring. Considering the relatively low numbers analyzed in the present paper, and the fact that the observational design causes a risk for false positive results, we suggest caution in interpreting this finding. Nevertheless, none of the above papers assessed infants of this age and our novel findings may be, apart from a type I error, a previously not discovered early increase in neurodevelopmental abilities in this subgroup. Furthermore, a dose-response support for such effect is given by the similar, but non-significant trend in the overweight group.

The drop in neurodevelopmental scores seen in the obese group between 6 and 18 months (Table 4), particularly in language scores, suggests that the increased scores observed are, if valid, temporary and represent a short term effect. This may even indicate that the temporary increase is a part of a specific neurodevelopmental profile that in the long term is non-favorable, and a key clinical biomarker to the poorer neurodevelopmental abilities observed by others. Further support for this hypothesis is the fact that a high composite language score at 6 months positively correlated with a low gross motor score at 18 months. We can only speculate on the mechanisms behind such a temporary increase. It may be driven by increased nutrient supply from the placenta or breast milk in obese pregnancies, enabling rapid synaptogenic growth in the first months of life, but with potential negative long term effects. But our sample was small and the lack of serum samples from the growing infant limits further analyses of biomarkers for growth and neurodevelopment. The findings could be associated with differences in maternal inflammation, iron status or fatty acid profiles. However, to establish such a mechanism requires further analyses and larger sample sizes, both to confirm the hereby suggested profile of neurodevelopment, and to explore the possible mechanisms.

Our cross sectional results at 18 months are less surprising. We observed no significant differences in children born to obese and overweight mothers when analyzing continuous

variables at 18 months of age, except a trend of lower scores in gross motor scores (Table 3). The logistic regressions revealed an increased risk of low motor scores in the obese group but the results did not remain significant in confounder adjusted analyses. Due to low power and the fact that most previous negative effects of overweight and obesity have been observed in later age, these results should be interpreted with caution. However, the results are opposite to 2 other previous larger trials, assessing small children with the Bayley test battery in offspring's of maternal obesity and overweight. They both suggested significant negative effect of maternal obesity and overweight on cognitive scores but not on motor development [21, 34]. Hinkle et al. found in children born to obese mothers, a confounder adjusted reduction of 2–3 points in mental developmental index (MDI) at 2 years of age when assessed with Bayley II [34]. Similarly, Casas et al. analyzed over 2000 mother-child pairs and found a significant dose-dependent association between maternal BMI and lower cognitive scores in the offspring's at 11–22 months of age. Obesity was associated with a decrease in Bayley cognitive scores of -2.7 and -3.7 points respectively [21]. However, none of these examined the neurodevelopment under two years of age and none explored overweight and obesity separated from gestational diabetes. Hence, our results also at 18 months therefore stand without suitable comparison to other previous research.

Effects of maternal diabetes have been targeted for repeated research during the last decades. The previous literature, suggests convincing evidence that offspring of diabetic mothers are at risk of impaired neurodevelopment [4, 15–17]. Dionne et al. compared children of diabetic mothers ($n = 221$) and controls ($n = 2612$) with regard to language development from 18 months to 7 years in two Canadian birth cohorts. They found that infants of diabetic mothers scored significantly lower in expressive language scores at several time points including at 18 months of age [17]. However, negative effects have also been reported in overall cognitive scores [15].

At 18 months follow-up, we found, in unadjusted regression analyses, that the children born to mothers with gestational diabetes had impaired scores in the domains of gross motor development but also in expressive language and composite language scores. This is in concordance with the previous literature even though the effect could not be confirmed in the subpopulation analyzed when adjusted for confounders. But we found no significant effect on cognitive scores of having a mother with gestational diabetes. This could be due to lack of power but it may also reflect the fact that the effects of diabetic mothers on development are delayed beyond 18 months of age. Actually, at 6 months the scores of cognition and language were rather higher than lower compared to the normal group, similar to the significant finding seen in the obese group. We can only speculate that the previously not observed temporary increase discussed above, also may occur in those infants born to diabetic mothers. The diabetic mothers in the present paper included obese, overweight and normal weight mothers. These subgroups may affect their offspring differently. We found no such differences (data not shown) but the study was underpowered for those analyses and the results cannot be further discussed. Further confounding effects in the gestational diabetic group is the nutritional and lifestyle recommendations that they received. These might have decreased possible adverse effects and explain why we found larger difference in the obese group.

The major limitation of our study is the large drop outs between delivery and 6 months. This caused a low study sample compared to previous research on long term effects and increased the risk of confounded results. Nevertheless, several of our observed differences remained significant in adjusted analyses and furthermore, the characteristics of our four groups were similar in most background and baseline measures, supporting that our findings, particularly on language development at 6 months, may represent a causal association. Our study was also limited by that fact that we only assess the Bayley scores. Several previous studies

have reported negative effects on affective and behavioral problems, ADHD and even on anorexia nervosa, but in older children [22, 35–37]. In future follow ups of the present cohort, such outcomes need to be assessed in addition to further cognitive measures. More detailed data regarding feeding in infancy would further improve similar studies since several nutritional circumstances may confound the results.

Conclusions

The results obtained in this study confirmed that offspring to mothers with metabolic pathologies differ in their neurodevelopmental profile and evolution. At 18 months there was a trend of reduces scores in several domains, partly in agreement with previous research. However, we also observed a temporary increase in cognitive and language performance at 6 months, particularly in the offspring to obese mothers. This novel finding prompts further confirmative and mechanistic studies to explore the effect that the metabolic pathologies have on the fetus, the newborn and the grown up child, since it might give a clue to the pathophysiology of this increasing child health problem. We plan further follow-up of the present cohort to study the long-term effects.

Supporting Information

S1 File. Trend statement checklist.

(PDF)

S2 File. Study protocol.

(PDF)

Acknowledgments

The authors want to acknowledge the women and children who participated in the study and also the obstetricians, pediatricians and technicians of the EURISTIKOS team at the Department of Pediatrics at the University of Granada, Spain.

Members of the PREOBE team include: *University of Granada, Spain: EURISTIKOS Excellence Centre for Paediatric Research. Department of Paediatrics: Cristina Campoy (PI), Luz M^a García-Valdés, Francisco J Torres-Espínola, M^a Teresa Segura, Cristina Martínez-Zaldívar, Tania Anjos, Antonio Jerez, Daniel Campos, Rosario Moreno-Torres, M^a José Aguilar, Iryna Rusanova, Jole Martino, Signe Altmäe; Department of Obstetrics and Gynecology: Jesús Florido, Carmen Padilla; Department of Biostatistics: M^a Teresa Miranda; Mind, Brain and Behavior International Research Centre: Andrés Catena, Miguel Pérez-García; Department of Legal Medicine: Jose A. Lorente, Juan C. Alvarez; Department of Pharmacology: Ahmad Agil; ICTAN-CSIC-Madrid, Spain: Ascensión Marcos, Esther Nova, Department of Nutrition and Bromatology. University of Barcelona, Spain: M^a Carmen López-Sabater; Lorgen, S.L.: Carmen Entrala; Rowett Institute, University of Aberdeen, UK: Harry McArdle, University of Nottingham, UK: Michael Symonds; Ludwig-Maximilian University of Munich, Germany: Berthold Koletzko, Hans Demmelmair, Olaf Uhl; University of Graz, Austria: Gernot Desoye; Abbott Laboratories: Ricardo Rueda; University of Umeå, Sweden: Staffan K Berglund.*

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FJTE CC. Performed the experiments: FJTE AJ LMGV MTS DC RMT. Analyzed the data: FJTE SKB AC MPG RR CC. Wrote the paper: FJTE SKB CC.

References

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011; 377 (9765):557–67. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)62037-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62037-5) PMID: [21295846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21295846/)
2. Global Database On Body Mass Index. 2011. Available: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>.
3. Herring SJ, Oken E, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Stuebe AM, Kleinman KP, et al. Weight gain in pregnancy and risk of maternal hyperglycemia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009; 201(1):61 e1–7. doi: [10.1016/j.ajog.2009.01.039](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.01.039)
4. Sesma HW, Georgieff MK. The effect of adverse intrauterine and newborn environments on cognitive development: the experiences of premature delivery and diabetes during pregnancy. *Development and psychopathology*. 2003; 15(4):991–1015. PMID: [14984135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14984135/)
5. Neggers YH, Goldenberg RL, Ramey SL, Cliver SP. Maternal prepregnancy body mass index and psychomotor development in children. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2003; 82(3):235–40. PMID: [12694119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12694119/)
6. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010; 299(3):R711–22. doi: [10.1152/ajpregu.00310.2010](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2010) PMID: [20631295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631295/)
7. Tomalski P, Johnson MH. The effects of early adversity on the adult and developing brain. *Current opinion in psychiatry*. 2010; 23(3):233–8. doi: [10.1097/YCO.0b013e3283387a8c](https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3283387a8c) PMID: [20308900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20308900/)
8. Deregner RA, Nelson CA, Thomas KM, Wewerka S, Georgieff MK. Neurophysiologic evaluation of auditory recognition memory in healthy newborn infants and infants of diabetic mothers. *The Journal of pediatrics*. 2000; 137(6):777–84. doi: [10.1067/mpd.2000.109149](https://doi.org/10.1067/mpd.2000.109149) PMID: [11113833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113833/)
9. Cusick SE, Georgieff MK. Nutrient supplementation and neurodevelopment: timing is the key. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2012; 166(5):481–2. doi: [10.1001/archpediatrics.2012.199](https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2012.199)
10. Aylward GP. Neurodevelopmental outcomes of infants born prematurely. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*. 2014; 35(6):394–407. doi: [10.1097/01.DBP.0000452240.39511.d4](https://doi.org/10.1097/01.DBP.0000452240.39511.d4) PMID: [25007063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25007063/)
11. Jacobs R, Harvey AS, Anderson V. Executive function following focal frontal lobe lesions: impact of timing of lesion on outcome. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2007; 43(6):792–805. PMID: [17710830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17710830/)
12. Hadders-Algra M. Prenatal and early postnatal supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids: neurodevelopmental considerations. *The American journal of clinical nutrition*. 2011; 94(6 Suppl):1874S–9S. doi: [10.3945/ajcn.110.001065](https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001065) PMID: [21525202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525202/)
13. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American journal of clinical nutrition*. 2007; 85(2):614S–20S. PMID: [17284765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17284765/)
14. Clausen TD, Mortensen EL, Schmidt L, Mathiesen ER, Hansen T, Jensen DM, et al. Cognitive function in adult offspring of women with gestational diabetes—the role of glucose and other factors. *PLoS One*. 2013; 8(6):e67107. doi: [10.1371/journal.pone.0067107](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067107) PMID: [23840595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23840595/)
15. Fraser A, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Lawlor DA. Associations of existing diabetes, gestational diabetes, and glycosuria with offspring IQ and educational attainment: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Experimental diabetes research*. 2012; 2012:963735. doi: [10.1155/2012/963735](https://doi.org/10.1155/2012/963735) PMID: [22927834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22927834/)
16. DeBoer T, Wewerka S, Bauer PJ, Georgieff MK, Nelson CA. Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. *Developmental medicine and child neurology*. 2005; 47(8):525–31. PMID: [16108452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16108452/)
17. Dionne G, Boivin M, Seguin JR, Perusse D, Tremblay RE. Gestational diabetes hinders language development in offspring. *Pediatrics*. 2008; 122(5):e1073–9. doi: [10.1542/peds.2007-3028](https://doi.org/10.1542/peds.2007-3028) PMID: [18977957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18977957/)
18. Nielsen GL, Andersen E, Lundbye-Christensen S. Maternal blood glucose in diabetic pregnancies and cognitive performance in offspring in young adulthood: a Danish cohort study. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. 2010; 27(7):786–90. doi: [10.1111/j.1464-5491.2010.03024.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03024.x)
19. Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Wolf A, Dulitzky M. School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2001; 14 Suppl 1:681–9.
20. Brion MJ, Zeegers M, Jaddoe V, Verhulst F, Tiemeier H, Lawlor DA, et al. Intrauterine effects of maternal prepregnancy overweight on child cognition and behavior in 2 cohorts. *Pediatrics*. 2011; 127(1): e202–11. doi: [10.1542/peds.2010-0651](https://doi.org/10.1542/peds.2010-0651) PMID: [21187310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187310/)

21. Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, et al. Maternal pre-pregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: two Southern European birth cohort studies. *International journal of epidemiology*. 2013; 42(2):506–17. doi: [10.1093/ije/dyt002](https://doi.org/10.1093/ije/dyt002) PMID: [23569191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23569191/)
22. Rodriguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2010; 51(2):134–43. doi: [10.1111/j.1469-7610.2009.02133.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02133.x) PMID: [19674195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19674195/)
23. Van Lieshout RJ. Role of maternal adiposity prior to and during pregnancy in cognitive and psychiatric problems in offspring. *Nutrition reviews*. 2013; 71 Suppl 1:S95–101. doi: [10.1111/nure.12059](https://doi.org/10.1111/nure.12059) PMID: [24147931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24147931/)
24. Van Lieshout RJ, Taylor VH, Boyle MH. Pre-pregnancy and pregnancy obesity and neurodevelopmental outcomes in offspring: a systematic review. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2011; 12(5):e548–59. doi: [10.1111/j.1467-789X.2010.00850.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00850.x)
25. Langie SA, Lara J, Mathers JC. Early determinants of the ageing trajectory. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012; 26(5):613–26. doi: [10.1016/j.beem.2012.03.004](https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.03.004)
26. Braun K. [Synaptic reorganization in early childhood experience and learning processes: relevance for the development of psychological diseases]. *Zeitschrift für klinische Psychologie, Psychiatrie und Psychotherapie / im Auftrag der Gorres-Gesellschaft*. 1996; 44(3):253–66. PMID: [8779245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8779245/)
27. Laucht M, Esser G, Schmidt MH, Ihle W, Löffler W, Stohr RM, et al. ["Risk children": the importance of biological and psychosocial risks for child development in the first two years of life]. *Praxis der Kinderpsychologie und Kinderpsychiatrie*. 1992; 41(8):274–85. PMID: [1279655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1279655/)
28. Albers CA, Grieve AJ. Bayley scales of infant and toddler development, third edition. *J Psychoeduc Assess*. 2007; 25(2):180–90. doi: [10.1177/0734282906297199](https://doi.org/10.1177/0734282906297199)
29. Bayley N, editor. *Bayley Scales of infant and toddler Development- Third Edition*. San Antonio: TX: Harcourt Assessment; 2006.
30. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology*. 2002; 31(6):1235–9. PMID: [12540728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12540728/)
31. Heikura U, Taanila A, Hartikainen AL, Olsen P, Linna SL, von Wendt L, et al. Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: a study of the 20-year interval between two birth cohorts in northern Finland. *American journal of epidemiology*. 2008; 167(2):169–77. doi: [10.1093/aje/kwm291](https://doi.org/10.1093/aje/kwm291) PMID: [18024987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024987/)
32. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and child health journal*. 2013; 17(2):222–9. doi: [10.1007/s10995-012-0964-4](https://doi.org/10.1007/s10995-012-0964-4) PMID: [22350633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22350633/)
33. Huang L, Yu X, Keim S, Li L, Zhang L, Zhang J. Maternal prepregnancy obesity and child neurodevelopment in the Collaborative Perinatal Project. *International journal of epidemiology*. 2014; 43(3):783–92. doi: [10.1093/ije/dyu030](https://doi.org/10.1093/ije/dyu030) PMID: [24569381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24569381/)
34. Hinkle SN, Schieve LA, Stein AD, Swan DW, Ramakrishnan U, Sharma AJ. Associations between maternal prepregnancy body mass index and child neurodevelopment at 2 years of age. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36(10):1312–9. doi: [10.1038/ijo.2012.143](https://doi.org/10.1038/ijo.2012.143)
35. Robinson M, Zubrick SR, Pennell CE, Van Lieshout RJ, Jacoby P, Beilin LJ, et al. Pre-pregnancy maternal overweight and obesity increase the risk for affective disorders in offspring. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2013; 4(1):42–8. doi: [10.1017/S2040174412000578](https://doi.org/10.1017/S2040174412000578) PMID: [25080181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25080181/)
36. Van Lieshout RJ, Schmidt LA, Robinson M, Niccols A, Boyle MH. Maternal pre-pregnancy body mass index and offspring temperament and behavior at 1 and 2 years of age. *Child psychiatry and human development*. 2013; 44(3):382–90. doi: [10.1007/s10578-012-0332-z](https://doi.org/10.1007/s10578-012-0332-z) PMID: [22983494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983494/)
37. Favaro A, Tenconi E, Santonastaso P. Perinatal factors and the risk of developing anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Archives of general psychiatry*. 2006; 63(1):82–8. doi: [10.1001/archpsyc.63.1.82](https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.1.82) PMID: [16389201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16389201/)



Maternal *PPARG* Pro12Ala polymorphism is associated with infant's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age



Francisco J. Torres-Espínola^a, Signe Altmäe^{a,b}, Maria Teresa Segura^a, Antonio Jerez^b, Tania Anjos^a, Maribel Chisaguano^c, M. Carmen López-Sabater^{d,e}, Carmen Entrala^f, Juan Carlos Alvarez^g, Ahmad Agil^h, Jesus Floridoⁱ, Andres Catena^{j,k}, Miguel Pérez-García^{k,l}, Cristina Campoy^{a,b,*}

^a Centre of Excellence for Paediatric Research EURISTIKOS, University of Granada, Granada, Spain

^b Department of Paediatrics, University of Granada, Granada, Spain

^c Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador

^d Department of Nutrition and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^e CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^f Lorgen G.P., S.L. BIC Granada, PTS, Granada, Spain

^g Department of Legal Medicine, University of Granada, Granada, Spain

^h Department of Pharmacology, University of Granada, Granada, Spain

ⁱ Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Granada, Granada, Spain

^j Department of Experimental Psychology, University of Granada, Granada, Spain

^k Mind, Brain and Behaviour Research Centre (CIMCYC), University of Granada, Granada, Spain

^l Department of Personality, Neuropsychology and Behaviour, University of Granada, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2015

Received in revised form 30 April 2015

Accepted 5 May 2015

Available online xxxx

Keywords:

Early programming

PPAR γ

PPARG polymorphism

Neurodevelopment

ABSTRACT

Background: Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) are ligand activated transcription factors with crucial functions in lipid homeostasis, glucose metabolism, anti-inflammatory processes, placental development, and are involved in cognitive functions and neurodegenerative diseases. Polymorphisms in PPAR genes are shown to influence the activity of these receptors.

Aims: 1) To examine the association of *PPARG* Pro12Ala polymorphism in pregnant women and their offspring on infant's neurodevelopmental outcomes during the first 18 months of life; 2) to determine the influence of Pro12Ala polymorphism on fatty acid concentrations in plasma phospholipids and placental tissue.

Study design: 138 mother–infant pairs from the PREOBE observational study were genotyped for *PPARG* Pro12Ala. Plasma phospholipids and placental fatty acid concentrations were measured at delivery. Infants' neuropsychological assessment at 6 and 18 months of age was performed using Bayley III.

Results: The effect of Pro12Ala on infant's neurodevelopmental outcomes was detected at 18 months, but not at 6 months of age. 18 months old infants born to mothers with wild-type Pro12 genotype had better cognitive (OR = 5.11, 95% CI: 1.379–18.96, $p = 0.015$), language (OR = 3.41, 95% CI: 1.35–11.24, $p = 0.044$), and motor development scores (OR = 4.77, 95% CI: 1.243–18.33, $p = 0.023$) than the Ala allele carriers. Pro12Ala variants did not seem to affect fatty acids concentrations in blood nor in placenta at delivery.

Conclusions: Infants born to mothers with Pro12 genotype have better neurodevelopmental outcomes at 18 months of age than Ala allele carriers, indicating a long-term transplacental action of PPAR γ variants on foetal brain development.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: Ala, Alanine; AA, Arachidonic acid; BMI, Body mass index; BSDIII, Bayley Scales of Infant and Toddlers Development, Third Edition; C.I, Confidence intervals; DHA, Docosahexaenoic acid; DNA, Deoxyribonucleic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; IQ, Intelligence quotient; LC-PUFAs, Long-chain polyunsaturated fatty acids; OR, Odds ratio; PPARs, Peroxisome proliferator activated receptors; *PPARG*, Peroxisome proliferator activated receptor gamma gene; PPAR γ , Peroxisome proliferator activated receptor gamma; Pro, Proline; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; SNP, Single nucleotide polymorphism.

* Corresponding author at: Department of Paediatrics, School of Medicine, University of Granada, Avda. De Madrid, 11, 18012-Granada, Spain. Tel.: +34 629308695.

E-mail address: ccampoy@ugr.es (C. Campoy).

1. Introduction

Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) are ligand activated transcription factors with crucial functions in lipid homeostasis, glucose metabolism, anti-inflammatory processes, and placental development [1,2]. To date, three isotypes, PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ , have been identified in many species, including humans and rodents [3].

PPARs have been widely studied in regards to lipid and glucose metabolism; however, there is growing evidence indicating that PPARs are involved in cognitive functions and neurodegenerative

diseases [4–7]. PPARs are expressed in all cell types of the brain [4], and recent findings in animal models demonstrate that cognitive performance can be enhanced through PPAR nuclear receptors [5,8].

PPAR γ is a member of the PPARs, playing an important role in the regulation of central nervous system inflammation and neuroprotection [9,10] contributing to cognitive performance [10,11]. The PPAR γ gene, *PPARG*, is localized in chromosome 3p25 and encodes 3 isoforms: PPAR γ 1, PPAR γ 2, and PPAR γ 3. Several genetic variations in *PPARG* have been identified to date, PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism (rs1801282) being the most extensively studied. The C to G missense polymorphism results in a Proline (Pro) to Alanine (Ala) substitution in the protein, which leads to reduced DNA-binding affinity and impaired transcriptional activity in target genes [12,13]. This Pro12Ala polymorphism has been associated, though with inconsistency, with increased BMI [14], obesity [15], type II diabetes mellitus [16,17], coronary artery disease [18], breast cancer susceptibility [19], and others, including cognitive impairment and neurodegenerative disease [20–22].

In this study, we set out to examine the association of *PPARG* Pro12Ala polymorphism in pregnant women and their offspring on infant's neurodevelopmental outcomes during the first 18 months of life. Additionally, the influence of the Pro12Ala polymorphism on fatty acids concentrations in blood and in placenta at delivery was examined.

2. Materials and methods

2.1. Study design and study population

From a total of 331 pregnant women in the PREOBE study, 138 pregnant women and their offspring were eligible for the present study. The PREOBE study (*Role of Nutrition and Maternal Genetics on the Programming of Development of Fetal Adipose Tissue*), is an observational cohort study on healthy normo-weight women (pre-conceptional body mass index (BMI) $18.5 \leq \text{BMI} < 25$), overweight ($25 \leq \text{BMI} < 30$), obese ($\text{BMI} \geq 30$), and women who develop gestational diabetes, performed at the Clinical University Hospital 'San Cecilio' and "Mother-Infant" Hospital in the city of Granada, Spain (the study has been registered at www.ClinicalTrials.gov, NLM identifier: NCT01634464 2012).

The inclusion criteria were singleton pregnancy, gestation between 12 and 20 weeks at enrollment, and intention to deliver in one of the two obstetrical centers mentioned. All mothers participating in other research studies, receiving drug treatment or supplements of DHA or of folate for more than the first 3 months of pregnancy, accompanying other disorders such as hypertension, pre-eclampsia, fetal intrauterine growth retardation, infections, hypo- or hyperthyroidism, hepatic renal diseases, or those following an extravagant diet or vegan diet were excluded. Maternal age, pre-conceptional BMI, parity, smoking and alcohol habits, socio-demographic information, parent's study level, maternal IQ, weight gain during pregnancy, mode of delivery, placental weight, gestational age, Apgar score, neonatal anthropometry (birth weight, birth length, and head circumference) and sex was recorded. After giving birth, the women were encouraged to breastfeed their infants. Type of infant feeding and introduction of beikost and solid foods were recorded up to 18 months of age.

2.2. Measurements

Mothers and their offspring were genotyped for *PPARG* Pro12Ala polymorphism; study participants were asked to participate in the neurologic assessment of their babies at 6 and 18 months of age. At 6 months, 138 infants from those "mother–baby" were examined by the Bayley Scales of Infant and Toddlers Development, Third Edition (Bayley III) test. At 18 months, 129 babies were examined again neurologically using the Bayley III. There were no differences in the dropout rates between the study groups. Potential cofounders were assessed by means of standardized questionnaires containing information on children's health status. The study protocol was approved by the

medical ethics committees of all centers participating in the study. After a careful explanation of the study details, written informed consent was obtained from all participating women.

2.3. Sample collection for DNA analysis

Maternal venous blood was collected at delivery using Vacutainer system. Venous umbilical cord blood was sampled immediately after clamping the cord. The blood was collected using Vacutainer blood collection tubes 3.0 ml, 7.5% EDTA, and was stored at -80°C until the moment of the analysis.

2.4. Genotyping *PPARG* Pro12Ala polymorphism

Mothers and infants were genotyped for the Pro12Ala polymorphism in the exon 3 of the *PPARG* gene (rs1801282 C/G). Genomic DNA was extracted from whole blood using phenol chloroform extraction protocol, and all samples were quantified using the electrophoresis in 0.8% agarose gel. Genotyping was performed using TaqMan® SNP Genotyping Assay C_1129864_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Real-time PCR was conducted in accordance with TaqMan® SNP Genotyping Assays manufacturers' instruction kit and manual (Applied Biosystems, Foster City), using 5 ng of purified genomic DNA as template. Amplification was performed during 40 cycles with denaturation temperature of 95°C and annealing temperature of 60°C .

2.5. Blood and placenta sample collections for fatty acid analysis

Venous blood for plasma phospholipid fatty acid analysis was collected from mothers at delivery and umbilical cord and placed in tubes containing EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, USA), was centrifuged at 3000 r.p.m. for 10 minutes and one aliquot was kept at -80°C until analysis.

Placenta samples were collected and weighed immediately after delivery. A visual inspection of the placenta for necrosis or any other abnormality was made by the clinicians. A piece of 1 g was excised from the middle of the radius of the placenta (distance between the insertion of the umbilical cord and the periphery), and was immediately frozen and stored at -80°C for lipid analysis. Samples were obtained from identical locations of the placental plate, as regional variations in the levels of lipid content have been reported [23].

2.6. Fatty acids analysis of plasma phospholipids

Fatty acids composition of plasma phospholipids were determined using the method developed by Bondia et al. [24]. Plasma lipids were extracted using dichloromethane/methanol (2:1), and phospholipids were isolated by solid-phase extraction with the use of aminopropyl columns. Analysis of fatty acid methyl esters from plasma phospholipids was performed by fast gas chromatography with a flame ionization detector. Results were expressed as percentages by weight (wt %) of total detected fatty acids.

2.7. Fatty acid analysis of placental tissue

Placental lipids from 0.2 to 0.3 g of tissue were analyzed as described by Klingler et al. [25]. Briefly, after thawing, samples were washed several times in 0.9% saline solution to eliminate blood residues as much as possible. Homogenization and lipid extraction were performed in 3 ml chloroform:methanol (2:1) containing butylhydroxytoluol, tripentadecanoin, and dipentadecanoylphosphatidylcholine (internal standards). Lipid fractions were isolated by thin layer chromatography using heptane, di-isopropylether, and acetic acid (60:40:3, by vol) as mobile phase. Fatty acid methyl-esters from placental phospholipids and triglycerides fractions were obtained by reaction with methanolic

HCl. Fatty acid methyl-esters were analyzed by capillary gas–liquid chromatography on a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a BPX70 column (SGE, Weiterstadt, Germany, length: 25 m, inner diameter: 0.22 mm) and identified by comparison with authentic standards (Nu-Chek-Pre, Elysian, MN). Results are expressed as percentages by weight (wt %) of total detected fatty acids.

2.8. Assessments of infant neurodevelopmental outcome

The neuropsychological assessment of infants at 6 and 18 months of age was performed using Bayley Scales of Infant and Toddlers Development, Third Edition (BSID III) test. This test is specifically designed for children for 1–42 months of age [26,27].

Four directly assessed scales were measured: cognitive, language, motor development, and social development. The language scale explores two branches of the development, the receptive and expressive language. The motor scale permits the examination of both developmental skills, fine and gross motricity. The socio-emotional development was evaluated by the mother at the same moment during examination using a questionnaire. The scaled score and composite score was calculated for each scale and was adjusted for each child and age (days), using the correction manual tables.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package for Windows (version 20.0; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Normal distribution of the data was assessed using the Shapiro–Wilk test. Continuous normal variables are displayed as mean and standard deviation, and those not following a normal distribution by median

and interquartile amplitude. For categorical variables, absolute frequencies and percentages are shown. Maternal age, pre-conceptional BMI, diabetic condition, parity, smoking and alcohol habits, socio-economic status, parent's study level, maternal IQ, weight gain during pregnancy, mode of delivery, placental weight, gestational age, Apgar score, neonatal anthropometry (birth weight, birth length, and head circumference), sex, and type of feeding during early life were considered as possible confounders. In order to determine the possible effect of the confounding factors over the obtained results, Student t-test for continuous normal variables was performed. For variables not following a normal distribution, Wilcoxon or Kruskal–Wallis test was performed. Chi-square test was applied to determine the association between categorical or categorized variables. Further, logistic regression analysis was conducted in order to determine the adjusted odds ratio relating the influence of *PPARG* polymorphism studied and other variables on infant's neurodevelopmental outcomes (cognitive, language, motor, and social domains); in this case, the domains were dichotomized above and below the median value. $P < 0.05$ was considered as minimum level of significance.

3. Results

3.1. *PPARG* Pro12Ala polymorphism in study groups

PPARG rs1801282 C/G genotype distribution among our study population was as follows: 118 women (85.5%) had major CC genotype, 20 women (14.5%) carried the heterozygous genotype of CG, and there were no women with GG genotype. The respective allele frequencies among women were 92.8% (C) and 7.2% (G). Among infants, 120 had homozygous major CC genotype, 16 infants had CG heterozygous genotype, and one infant had GG genotype, with allele frequencies of 94% (C) and 6% (G). *PPARG* rs1801282 C/G distribution within the study

Table 1

Characteristics of the individuals studied taking into account maternal *PPARG* Pro12Ala (rs1801282 C/G) genotypes.

		CC (n = 118)	CG (n = 20)	p
Maternal age ^a		31.98 ± 4.52	31.70 ± 4.37	0.623 ^b
Weight gain during pregnancy ^a		9.38 ± 7.08	8.90 ± 6.69	0.245 ^b
Educational level ^c	Primary/secondary	36.30%	36.80%	0.963 ^d
	University/doctor	63.70%	63.20%	
Maternal IQ ^e		108 (18)	100 (25)	0.681 ^b
Maternal pre-conceptional BMI ^a		26.54 ± 5.13	26.21 ± 5.25	0.806 ^b
Gestational diabetes ^c	Yes	70.30%	75.00%	0.671 ^d
	No	29.70%	25.00%	
Parity ^c	0	57.60%	35.00%	0.060 ^d
	≥1	42.40%	65.00%	
Smoking during pregnancy ^c	no	76.90%	83.30%	0.570 ^d
	<5 cigarettes	17.30%	16.70%	
	≥5 cigarettes	5.80%	0.00%	
Alcohol consumption during pregnancy ^c	No	41.30%	55.60%	0.509 ^d
	Yes	58.70%	44.40%	
Placental weight ^a		517.28 ± 131.37	472.22 ± 113.68	0.174 ^f
Birth weight ^a		3320.76 ± 420.16	3544.74 ± 477.99	0.042 ^f
Birth length ^a		50.46 ± 2.12	50.28 ± 2.67	0.920 ^f
Birth head circumference ^a		34.56 ± 1.44	34.46 ± 1.49	0.993 ^f
Sex ^c	Boy	45.80%	60.00%	0.239 ^d
	Girl	54.20%	40.00%	
Infant type of feeding ^c	Breast-fed	46.00%	55.50%	0.711 ^d
	Infant formula	36.00%	27.80%	
	Mixed	18.00%	16.70%	
Gestational age ^a		39.51 ± 1.23	39.60 ± 1.18	0.821 ^d
Apgar 1 ^e		9 (0)	9 (0)	0.805 ^b
Apgar 5 ^e		10 (0)	10 (0)	0.064 ^b

n: number of cases; level of significance: $p < 0.05$; BMI: body mass index.

^a Mean ± standard deviation.

^b Mann–Whitney U test.

^c Percentage.

^d Chi-square test.

^e Median and interquartile amplitude.

^f Student t-test.

participants was in Hardy–Weinberg equilibrium (in mothers $\chi^2 = 0.84$, $p = 0.36$; in infants $\chi^2 = 0.06$, $p = 0.47$).

In general, maternal and child's characteristics did not differ between individuals with maternal or infant's CC or CG genotype (see Table 1 and Supplementary Table 1). Only maternal Pro12Ala polymorphism was associated with infant's birth weight ($p = 0.042$) (Table 1). Women with CG genotype had significantly heavier newborns than women with CC genotype (3544.74 ± 477.99 g vs 3320.76 ± 420.16 g). Thus, in the further analyses, the only potential confounder included in the models was birth weight. The other potential confounders were not included as they did not affect the model (see Table 1 and Supplementary Table 1).

3.2. PPARC Pro12Ala polymorphism and fatty acids concentration at delivery

No effect of Pro12Ala polymorphism on fatty acids concentrations in plasma phospholipids in mothers, umbilical cord, and in placenta at delivery was observed. α -Linolenic acid in placental phospholipids seemed to be influenced by the infant's genotype ($p = 0.039$), but as there was only one infant with GG genotype (while CC $n = 64$, CG $n = 9$), no conclusions could be drawn (Supplementary Table 2).

3.3. PPARC Pro12Ala polymorphism and infant's neurodevelopmental outcomes

Maternal genotype did not seem to influence child's neurodevelopmental outcomes at 6 months of age, but statistically significant associations of maternal Pro12Ala genotype and child's neurodevelopmental outcomes at 18 months of age were observed (Table 2). Significantly higher scores were obtained in cognitive domain (both scaled cognitive and cognitive composite scores, 15(4) vs 13(4), $p = 0.004$ and 125(15) vs 115(20), $p = 0.004$), language domain (scaled receptive language, 12(2) vs 10.5(2), $p = 0.004$), and motor domain (scaled fine motor and motor composite scores, 13(3) vs 11.5(2), $p = 0.010$ and 115(14) vs 111(8), $p = 0.007$), while no differences were detected in social-emotional development among children with maternal CC genotype when compared to children with maternal CG genotype. Association analysis of infant's Pro12Ala polymorphism did not show any effect on their neurodevelopment outcomes at 6 months and 18 months of age.

The influence of Pro12Ala polymorphisms on infant's neurodevelopment outcomes in cognitive, language, and motor development at

Table 3

Logistic regression analysis of the effect of maternal PPARC Pro12Ala genotype on their infants' neurodevelopmental outcomes at 18 months of age ($n = 129$).

PPARG (CC)	B	p	Odds ratio (95% CI)
Cognitive Composite Score	1.632	0.015	5.11 (1.379–18.96)
Language Composite Score	1.227	0.044	3.412 (1.035–11.24)
Motor Composite Score	1.563	0.023	4.775 (1.243–18.33)

Dichotomized Cognitive Composite Score, Language Composite Score, and Motor Composite Score for binary logistic regression below and above the median. Adjusted by birth weight. Risk variable: PPARC CG genotype.

18 months of age, after conducting a logistic regression analysis, showed OR = 5.11, 95% CI: 1.379–18.96, $p = 0.015$ (Table 3). Those results indicate that mothers with PPARC Pro12 genotype (CC) present 5.1 times more odds of having an infant with higher cognitive composite score at 18 months of age than women with CG genotype. The same result was observed for the language composite and motor composite scores (OR = 3.41; 95% CI: 1.35–11.24, $p = 0.044$ and OR = 4.77; 95% CI: 1.243–18.33, $p = 0.023$, respectively).

4. Discussion

In this study, we found that infants of mothers with the PPARC wild type Pro12 genotype outscored the Ala allele carriers in cognitive, language, and motor development, but not on socio-emotional one at 18 months of age, regardless of maternal obesity and/or gestational diabetes. Moreover, no effect of child's own Pro12Ala polymorphism on the neurodevelopmental outcomes was observed. Further, Pro12Ala variants did not seem to affect fatty acids concentrations in plasma phospholipids and in placenta at delivery in the current study.

To the best of our knowledge, this is the first study in which PPARC Pro12Ala variation in relation to infant's neurodevelopment has been investigated. Our study results of maternal Pro12Ala effect, but not that of infant's own genotypes, on infant's neurodevelopment indicates that intrauterine metabolically mediated mechanisms influence child's neurodevelopment on the postnatal stage. Further, it seems that the effect of maternal Pro12Ala polymorphism can be better observed at long-term intervals (18 months rather than 6 months). PPARC has been shown to have specific function in regulating the expression of genes involved in neurotransmission, and therefore, it can play important roles in learning and memory formation [28], especially formation of long-term memory [5].

Table 2

Effects of maternal PPARC Pro12Ala (rs1801282 C/G) polymorphism on infant's Bayley test III scores at 6 and 18 months of age.

	Neurodevelopment at 6 months			Neurodevelopment at 18 months		
	CC (n = 118)	CG (n = 20)	p	CC (n = 113)	CG (n = 16)	p
	Median (IQA) ^a			Median (IQA) ^a		
Cognitive development						
Scaled Cognitive Score	12 (3)	11 (2)	0.384	15 (5)	13 (4)	0.004*
Cognitive Composite Score	110 (15)	105 (10)	0.402	125 (15)	115 (20)	0.004*
Language development						
Scaled Receptive Language Score	12 (3)	12 (3)	0.916	12 (2)	10.5 (2)	0.004*
Scaled Expressive Language Score	10 (2)	10 (4)	0.526	11 (2)	11 (2)	0.949
Language Composite Score	106 (16)	106 (17)	0.444	109 (9)	103 (8)	0.065
Motor development						
Scaled Fine Motor Score	12 (3)	13 (3)	0.496	13 (3)	11.5 (2)	0.010*
Scaled Gross Motor Score	9 (3)	8 (5)	0.425	12 (3)	12 (2)	0.172
Motor Composite Score	103 (16)	103 (20)	0.913	115 (14)	111 (8)	0.007*
Social-Emotional development						
Scaled Social-Emotional Score	10 (4)	10 (5)	0.918	10 (5)	11.50 (5)	0.110
Social-Emotional Composite Score	100 (20)	100 (25)	0.918	100 (24)	107.50 (24)	0.109

Mann–Whitney U test was used. Infants' neurodevelopment assessed using the BSID-III: Bayley Scales of Infant Development, Third Edition.

* Level of significance $p < 0.05$.

^a IQA: Interquartile amplitude.

The effect of maternal PPAR γ variants during pregnancy on fetal neurodevelopment may have a long-term influence on children development. Indeed, PPAR γ is strongly expressed in human placenta [29], having central role in placental development and function [30,31]. PPAR γ acts as negative regulator of trophoblastic invasion of uterine endometrium and is involved in secretion of reproductive hormones by trophoblasts [31]. Furthermore, PPAR γ plays a role in supplying nutrients to the embryo as a regulator of metabolic function, regulating fatty acid storage and glucose metabolism [30]. The genes activated by PPAR γ stimulate lipid uptake and adipogenesis by fat cells. Regulation of lipid transfer to the fetus is an essential role of the placenta and depends on lipid incorporation from maternal circulation as well as from the lipid metabolic pathways within the placenta [32,33]. The extreme importance of fatty acids, especially n-3 and n-6 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) on fetal brain development has been very well established [34–36], being crucial for neurogenesis, neurotransmission, and protection against oxidative stress [36]. There is a growth spurt in the grey matter of the human brain during the last trimester of pregnancy and the first postnatal months, with a large increase in the cerebral content of arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA). Several studies have shown that low dietary n-3 PUFA and low plasma DHA concentrations decreased n-3 PUFA in the brain and in turn resulted in cognitive impairment and behavioral defects [37,38]. Therefore, maternal *PPARG* 12Ala variant that results in reduced PPAR γ activity might lead to impaired lipid's transfer to the fetus, which in turn would negatively affect fetal brain development. This hypothesis nevertheless needs to be confirmed by future studies.

Other placental mechanisms could also be involved in maternal PPAR γ influence on fetal neurodevelopment. PPAR γ contributes to placental development and thus to the materno-fetal transfer of oxygen and different nutrients (in addition to fatty acids) that enable prenatal fetal growth, including brain development. The positive relation of PPAR γ placental expression and fetal and placental weights was demonstrated in a recent study [39]. It is known that nutrients are vital to prenatal brain development, not only for morphological development, but also for brain neurochemistry and neurophysiology, where nutrition can have a long-lasting influence [36].

In the current study, however, we were not able to detect any clear differences in the placental and fatty acid plasma phospholipid concentrations at delivery between the different mothers/newborn infants Pro12Ala genotypes. The lack of association between the polymorphism and fatty acid concentrations in the placenta could be a result of the sample preparation, being a mixture of the maternal and fetal side of the placenta; another explanation could be the limited sample number available for the fatty acid analysis (especially among Ala allele carriers), having probably not enough power to detect the differences.

In conclusion, our study results show that infants born to mothers with the Pro12 genotype have better neurodevelopmental outcomes at 18 months of age than those born to mothers with the Ala allele carriers, indicating long-lasting effects of mother's PPAR γ variants on fetal brain development. The *PPARG* 12Ala variant results in decreased receptor activity, which might lead to aberrant lipid transfer to the fetus and thus negatively affect fetal brain development. Nevertheless, in the present study, the Pro12Ala genotype did not seem to affect fatty acid plasma phospholipids concentrations at delivery or in the placenta. The results presented in this study need to be replicated; we consider that the impact of *PPARG* Pro12Ala polymorphism on neurodevelopment merits further investigation.

Funding sources

This study was funded by Spanish Ministry of Innovation and Science. Junta de Andalucía: Excellence Projects (P06-CTS-02341) (registered in www.ClinicalTrials.gov, identifier: NCT01634464); Marie Curie post-doctoral fellowship (FP7, no. 329812, NutriOmics); Spanish Ministry of Education (grant no. SB2010-0025).

Conflict of interest statement

The authors state that they do not have any conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the women and their children who participated in the study and to the pediatricians, technicians, obstetricians, and psychologists of the EURISTIKOS team at the Department of Paediatrics at the University of Granada, Spain. The results of this article are likely to be included in the Doctoral Thesis of F.J.T-E in the context of the Genetic, Nutritional and Environmental Factors for Growth and Development Doctoral Program at the University of Granada.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.05.001>.

References

- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409–35.
- Capobianco E, Martinez N, Fornes D, Higa R, Di Marco I, Basualdo MN, et al. PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2013;377:7–15.
- Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell* 2005;123:993–9.
- Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochem Int* 2013;63:322–30.
- Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC Neurosci* 2012;13:109.
- Katsouri L, Blondrath K, Sastre M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma cofactors in neurodegeneration. *IUBMB Life* 2012;64:958–64.
- Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPARgamma activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun* 2013;29:28–38.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem* 2009;16:332–7.
- Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur J Pharmacol* 2008;589:176–9.
- Deplanque D. Cell protection through PPAR nuclear receptor activation. *Therapie* 2004;59:25–9.
- Rinwa P, Kaur B, Jaggi AS, Singh N. Involvement of PPAR-gamma in curcumin-mediated beneficial effects in experimental dementia. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2010;381:529–39.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998;20:284–7.
- Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogens: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:136–49.
- Galbete C, Toledo E, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Guillen-Grima F, Marti A. Pro12Ala variant of the PPAR2 gene increases body mass index: an updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:1486–95.
- Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162:101–14.
- Chan KH, Niu T, Ma Y, You NC, Song Y, Sobel EM, et al. Common genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARG) and type 2 diabetes risk among Women's Health Initiative postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E600–4.
- Trombetta M, Bonetti S, Boselli ML, Miccoli R, Trabetti E, Malerba G, et al. PPAR2 Pro12Ala and ADAMTS9 rs4607103 as "insulin resistance loci" and "insulin secretion loci" in Italian individuals. The GENFIEV study and the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 4. *Acta Diabetol* 2013;50:401–8.
- Wu Z, Lou Y, Jin W, Liu Y, Lu L, Lu G. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene (PPARGgamma2) is associated with increased risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7:e53105.
- Mao Q, Guo H, Gao L, Wang H, Ma X. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Med Rep* 2013;8:1773–8.

- [20] West NA, Haan MN, Morgenstern H. The PPAR-gamma Pro12Ala polymorphism and risk of cognitive impairment in a longitudinal study. *Neurobiol Aging* 2010;31:741–6.
- [21] d'Abramo C, Zingg JM, Pizzuti A, Argellati F, Pronzato MA, Ricciarelli R. In vitro effect of PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism on the deposition of Alzheimer's amyloid-beta peptides. *Brain Res* 2007;1173:1–5.
- [22] He W. PPARgamma2 polymorphism and human health. *PPAR Res* 2009;2009:849538.
- [23] Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 2008;29:1–14.
- [24] Bondia-Pons I, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *J Chromatogr A* 2006;1116:204–8.
- [25] Klingler M, Demmelmair H, Larque E, Koletzko B. Analysis of FA contents in individual lipid fractions from human placental tissue. *Lipids* 2003;38:561–6.
- [26] Bayley N. 3rd ed. San Antonio: TX: Harcourt Assessment; 2006.
- [27] Albers CA, Grieve AJ. Bayley scales of infant and toddler development, third edition. *J Psychoeduc Assess* 2007;25:180–90.
- [28] Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 2004;123:131–45.
- [29] Tugwood JD, Aldridge TC, Lambe KG, Macdonald N, Woodyatt NJ. Peroxisome proliferator-activated receptors: structures and function. *Ann N Y Acad Sci* 1996;804:252–65.
- [30] Schaiff WT, Knapp Jr FF, Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology* 2007;148:3625–34.
- [31] Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 2009;27:246–57.
- [32] Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006;65(Suppl. 3):59–64.
- [33] Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2010;44:1125–71.
- [34] Krauss-Etschmann S, Shadid R, Campoy C, Hoster E, Demmelmair H, Jimenez M, et al. Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1392–400.
- [35] Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr* 2012;107(Suppl. 2):S85–S106.
- [36] Anjos T, Altmäe S, Emmett P, Tiemeier H, Closa-Monasterolo R, Luque V, et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr* 2013;52:1825–42.
- [37] Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 2010;21:364–73.
- [38] Noaghiul S, Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *Am J Psychiatry* 2003;160:2222–7.
- [39] Diaz M, Bassols J, Lopez-Bermejo A, Gomez-Roig MD, de Zegher F, Ibanez L. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): relation to placental and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1468–72.

Capítulo 5

Discusión General

Capítulo 5: Discusión

La Memoria de Tesis Doctoral que se presenta ha permitido un avance en el conocimiento del impacto de la Obesidad y la Diabetes gestacional sobre el crecimiento y desarrollo de los niños, y los estudios realizados han tratado de dar un paso adelante en el conocimiento de los mecanismos implicados en tales procesos.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto el índice de masa corporal (IMC) pregestacional de la embarazada como el desarrollo de Diabetes Gestacional, con o sin sobrepeso/obesidad maternas, van a alterar los procesos metabólicos fisiológicos maternos y pueden determinar alteraciones de la composición corporal y del neurodesarrollo. Además, la presencia de polimorfismos genéticos tales como el del PPAR γ Pro12Ala pueden modificar la regulación placentaria de transferencia materno-fetal de ácidos grasos y por tanto, tendrían un efecto programado a largo plazo modulando el neurodesarrollo del niño.

En el presente estudio se ha comprobado que el sobrepeso, la obesidad y la diabetes gestacional maternas se asocian a alteraciones nutricionales, antropométricas y bioquímicas en las embarazadas. El efecto sobre el feto aún no está claro, pero se ha comprobado que los niños nacidos de madres obesas tienen un mayor peso al nacimiento, mayor perímetro de la cintura y más riesgo de macrosomía. Según las alteraciones observadas y teniendo en cuenta investigaciones anteriores sobre *Early Programming*, se han identificado algunos candidatos que deberían ser estudiados en profundidad en futuros estudios, incluyendo los marcadores del metabolismo de la glucosa, la vitamina B12 y el ácido fólico. Se necesitan estudios a largo plazo que exploren si alguno de estos marcadores están asociados a la salud a largo plazo de los niños.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los hijos de madres con patologías metabólicas difieren en el perfil y evolución del neurodesarrollo cognitivo; a los 18 meses de edad estos niños muestran una tendencia a reducir las puntuaciones de diferentes dominios cerebrales. Sin embargo, también se ha observado un incremento temporal en el desarrollo cognitivo y del lenguaje a los 6 meses de edad, particularmente en los niños nacidos de madres obesas. Este nuevo hallazgo necesita ser confirmado con más estudios, y además, precisa de estudios que exploren los mecanismos implicados en el efecto de las patologías metabólicas maternas sobre el feto, el recién nacido y el niño, lo que facilitaría la oportunidad de intervención sobre los mecanismos fisiopatológicos de este problema de salud infantil en continuo aumento.

Nuestros resultados demuestran que los niños nacidos de madres con el genotipo Pro12 muestran un mejor neurodesarrollo a los 18 meses de edad, respecto a aquellos nacidos de madres portadoras del alelo Ala, lo que indicaría un efecto de programación del cerebro fetal, con consecuencias a largo plazo dependiente de las diferentes variantes maternas de PPAR γ . A pesar de que la variante PPAR γ 12Ala determina un descenso de la actividad del receptor del PPAR γ , lo cual provocaría una alteración de la transferencia materno-fetal de lípidos, con la consecuente alteración del desarrollo del cerebro fetal, en el presente estudio el genotipo Pro12Ala no parece afectar a la concentración de ácidos grasos de los fosfolípidos del plasma en el momento del parto, ni tampoco en la placenta. No obstante, este primer paso para comprender los mecanismos implicados en las alteraciones del neurodesarrollo observadas en los niños debe ser confirmado mediante otros estudios.

5.1 Asociación negativa del sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional con el crecimiento y desarrollo del niño.

Los efectos del IMC pre-concepcional y/o diabetes gestacional sobre el desarrollo de la gestación se han convertido en un tema de estudio de máximo interés en los últimos años, especialmente por las consecuencias que estas patologías maternas parecen conllevar en sus hijos, afectando a su salud y neurodesarrollo a largo plazo (1-4). Además, numerosos factores nutricionales y ambientales van a influir de forma decisiva en el crecimiento y desarrollo fetal (*estado nutricional/ingesta dietética, hábitos de vida, actividad física de la madre, etc...*). Como ya se ha referido, las embarazadas obesas van a presentar alteraciones del estado nutricional, especialmente de glucosa y micronutrientes como es el caso del hierro o determinadas vitaminas; por otra parte, el proceso inflamatorio mantenido que acompaña a la obesidad también va a determinar una alteración de su sistema inmunitario que a su vez repercutirá sobre el desarrollo fetal. En su conjunto, este “mal ambiente intrauterino” afectará de forma negativa, y en menor o mayor medida, el crecimiento y desarrollo fetal (5).

Siguiendo la teoría de la programación temprana de Barker et al. (6), los cambios metabólicos *in útero* establecen patrones fisiológicos y estructurales a largo plazo que pueden «programar» la salud durante la vida adulta, teoría popularmente conocida como la «Hipótesis de Barker» (7). La evidencia experimental y clínica sugiere que patologías como la hipertensión arterial, obesidad, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes *mellitus* tipo 2 o las enfermedades mentales y del comportamiento, pueden «programarse» durante las primeras etapas del desarrollo fetal y manifestarse en etapas tardías, tras interactuar con el estilo de vida y otros factores de riesgo adquiridos con el medio ambiente.

Los hábitos alimentarios de la madre antes y durante el embarazo pueden ejercer un efecto positivo o negativo en el desarrollo fetal; no se sabe con exactitud cómo estos hábitos junto a la presencia de patologías metabólicas maternas pueden afectar a largo plazo el crecimiento y desarrollo de los niños y desde hace varios años está suscitando un gran interés en la comunidad científica. Se ha establecido una “ventana de oportunidad” para la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles de alta prevalencia.

Actualmente, en la literatura se pueden encontrar algunos estudios relacionando el efecto negativo a largo plazo de la obesidad y los diferentes tipos de diabetes sobre el neurodesarrollo de los niños. Estos efectos negativos afectarían tanto al desarrollo cognitivo (8-11), como al desarrollo del lenguaje (12, 13) y del comportamiento (11, 14, 15). Otros estudios incluso han publicado la existencia de una asociación entre la obesidad materna y el desarrollo de enfermedades psiquiátricas en la edad adulta (16-22).

El efecto de la obesidad materna sobre el feto en desarrollo aún no está totalmente claro, pero en el presente trabajo se ha observado un mayor peso y un aumento del riesgo de desarrollar macrosomía. Además, los bebés nacidos de embarazadas obesas y con diabetes gestacional mostraron una circunferencia de la cintura mayor al nacimiento. Los resultados obtenidos sugieren que tanto la obesidad como la diabetes gestacional en la embarazada determinan un paso excesivo materno-fetal de sustratos energéticos desde la madre al feto. En las embarazadas con sobrepeso y obesidad se han identificado varios candidatos posibles causantes las alteraciones descritas, entre ellos biomarcadores del metabolismo de la glucosa (*aumento de glucosa, insulina y HbA1c*), inflamación (*niveles altos de PCR*) y estado de hierro (*aumento del riesgo de deficiencia de hierro*), así como niveles más bajos de vitamina B12 y ácido fólico.

Estos resultados sugieren que tanto la obesidad como la diabetes gestacional maternas contribuyen de forma significativa a una sobrenutrición fetal, lo que apoyaría la hipótesis de Freinkel sobre los efectos de un exceso de “energía” durante la gestación como causa del aumento de peso fetal (23). Esta observación del mayor peso al nacimiento concuerda con los datos aportados por estudios epidemiológicos previos (24). También se ha comprobado en el presente estudio un mayor índice peso placentario/peso neonatal en los hijos de madres obesas, lo que sugiere la implicación de la función placentaria (25).

Por otra parte, las embarazadas obesas mostraron una menor ganancia de peso durante la gestación, tal y como se ha descrito en otros estudios (26). Esta observación es importante desde el punto de vista clínico, pues se ha observado que ambos el sobrepeso/obesidad maternos así como la ganancia de peso durante la gestación están asociados de forma independiente al incremento de riesgo de obesidad en los niños (24).

Es de destacar los altos niveles de insulina y HbA1c en las embarazadas con sobrepeso y obesidad, incluso sin diabetes gestacional, que sugieren la alteración del metabolismo de la glucosa y un mayor riesgo de desarrollo de obesidad en los hijos (27) y de alteraciones del neurodesarrollo. Igualmente, las bajas concentraciones de hierro (28, 29), vitamina B12 (30) y ácido fólico (31, 32) demostradas en las embarazadas obesas, han sido bien estudiadas como candidatas para una programación precoz desfavorable y se asocian a morbilidad en embarazadas y en sus hijos. La deficiencia de ácido fólico y vitamina B12 se asocian al aumento de riesgo de defectos del tubo neural, adiposidad, aumento de la resistencia a la insulina, alteraciones del neurodesarrollo y mayor riesgo de cáncer en los hijos (30, 32).

5.1.1. Factores confusores del neurodesarrollo en los niños.

En los estudios realizados en el presente trabajo, se decidió incluir como posibles variables confusoras aquellas que se consideraron por su alta citación en numerosos estudios o por su importancia e influencia sobre los resultados, pudiendo explicar por sí solas los resultados obtenidos.

Algunos estudios en los que se han evaluado los factores confusores más influyentes sobre el desarrollo cognitivo en los niños, han comprobado que la *edad materna*, el *nivel educativo de la madre*, así como el *IQ materno* son variables fundamentales que pueden tener un gran peso en los resultados (33-35). El peso ganado durante el embarazo también se considera un factor a tener en cuenta al haberse relacionado con el neurodesarrollo fetal (36). Las variables confusoras relacionadas con la madre, que se han introducido en los modelos del estudio han sido: *edad materna, ganancia de peso en la gestación, nivel educativo materno, IQ materno, IMC pre-concepcional, número de hijos, consumo de tabaco y/o alcohol antes y durante el embarazo, desarrollo de diabetes gestacional y el peso de la placenta*.

Respecto a los factores de los niños potencialmente confusores, las variables introducidas en los modelos estadísticos llevados a cabo en el presente estudio son: *edad gestacional, Apgar 1'-5', peso y longitud al nacimiento, sexo, destino después del parto, y tipo de alimentación a los 3 meses*. Estudios previos han comprobado efectos directos del peso al nacimiento sobre el neurodesarrollo (37).

5.2. Efectos de las patologías metabólicas maternas sobre el neurodesarrollo de sus hijos

En el presente estudio se han obtenido unos resultados inesperados sobre el neurodesarrollo de los niños a los 6 meses de edad; los hijos de madres con obesidad obtienen puntuaciones más altas en las *capacidades cognitivas y del lenguaje*, efecto que se mantuvo después de ajustar por las variables confusoras. Sin embargo, a los 18 meses de edad estas diferencias desaparecen, y los niños nacidos de madres obesas muestran puntuaciones similares a las obtenidas en hijos de madres sanas con normopeso, e incluso más bajas (*tasa de cambio negativa*). Esta ralentización del neurodesarrollo a los 18 meses de edad, hace notar la posible importancia del mayor neurodesarrollo a los 6 meses como marcador clínico predictor de un desarrollo pobre o desfavorable a largo plazo. Esta teoría se ve apoyada por la correlación positiva establecida entre las altas puntuaciones en el dominio del lenguaje a los 6 meses y puntuaciones más bajas en motricidad gruesa a los 18 meses. Este efecto observado a los 6 meses sugiere el papel determinante de las alteraciones metabólicas maternas, y permite especular sobre la posible implicación del exceso de transferencia materno-fetal de nutrientes o a través de la lactancia materna en los hijos de madres obesas, en una etapa muy crítica del desarrollo, que permitiría una rápida sinaptogénesis en los primeros meses de vida, pero con posibles efectos negativos a largo plazo.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio son opuestos a los publicados en otros estudios realizados en niños de más de dos años; no obstante, en estos estudios no se identificó de forma exclusiva el IMC como variable independiente y los grupos estaban constituidos por embarazadas con diabetes gestacional con o sin sobrepeso (10, 38).

En el caso de los hijos de madres diabéticas, a los 18 meses, obtuvieron puntuaciones más bajas en motricidad gruesa y en lenguaje (*expresivo y compuesto*), a pesar de haber estado sometidas a un programa de control dietético y haber recibido el tratamiento necesario para controlar la diabetes durante la gestación. Estos resultados están en concordancia con la literatura a pesar de que el efecto no se pudo confirmar tras ajustar por los factores de confusión (8, 39, 40). Sin embargo, no se han demostrado efectos significativos de la diabetes gestacional sobre el desarrollo cognitivo. Estos resultados podrían deberse a la falta de potencia estadística en la muestra analizada, pero también pueden reflejar la posibilidad de que los efectos de la diabetes gestacional puedan aparecer en edades posteriores a la analizada.

5.3. Papel del polimorfismo PPAR γ (Pro12Ala) materno sobre el neurodesarrollo de los hijos.

El estudio que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral, en el que se relaciona las variantes genéticas del gen PPAR γ y el neurodesarrollo es el primero de este tipo en la literatura. A los 18 meses de edad, y no a los 6 meses, los niños nacidos de madres con el genotipo natural PPAR γ y el alelo Pro12 obtuvieron mayores puntuaciones en los dominios del desarrollo *motor, cognitivo y del lenguaje*, respecto a las madres portadoras del alelo Ala, independientemente de la presencia de obesidad materna y/o diabetes gestacional. No se observó ningún efecto del polimorfismo Pro12Ala del niño en los resultados de neurodesarrollo, ni a los 6, ni a los 18 meses de edad. Además, las variantes del Pro12Ala no afectan a las concentraciones de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma, ni a las concentraciones en fosfolípidos y triglicéridos en el tejido placentario. Estos resultados podrían explicarse por el papel establecido del

PPAR γ en la regulación de la expresión de los genes implicados en la neurotransmisión, y por lo tanto, en un posible papel importante en el aprendizaje y la formación de la memoria (41), especialmente de la memoria a largo plazo (42).

Se han identificado determinados nutrientes como esenciales para el desarrollo cerebral, entendiendo como neurodesarrollo no solo el desarrollo morfológico, sino también la neuroquímica y neurofisiología cerebral, donde la nutrición puede tener una influencia duradera (43). Los genes activados por el PPAR γ modulan el suministro de nutrientes al embrión, regulando el almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa (44). Además, los genes activados por PPAR γ estimulan la absorción de lípidos y la adipogénesis por las células grasas. La regulación de la transferencia materno-fetal de lípidos es un papel esencial de la placenta y depende en mayor medida de la incorporación de los lípidos que se encuentran en la circulación materna, así como de las vías metabólicas de lípidos dentro de la placenta (45, 46). La importancia de los ácidos grasos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega 3 y omega 6 en el desarrollo cerebral del feto está bien establecida (43, 47, 48), siendo estos nutrientes esenciales para la neurogénesis, la neurotransmisión y la protección contra el estrés oxidativo (43). El último trimestre de embarazo y los primeros meses de vida después del parto, son etapas muy importantes para el desarrollo de la materia gris en el cerebro humano, donde se produce un gran aumento en el contenido cerebral de ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Varios estudios han demostrado que una dieta baja en ácidos grasos omega 3 y bajas concentraciones de DHA en los fosfolípidos del plasma disminuyeron las concentraciones de omega 3 en el cerebro, y a su vez se produjo un deterioro cognitivo y conductual (49, 50). Por lo tanto, se podría especular que la variante materna del PPAR γ 12Aa, que resulta en una actividad más reducida del PPAR γ , podría dar lugar a

una menor transferencia materno-fetal de lípidos, el cual a su vez podría verse afectado negativamente en su desarrollo cerebral.

Por otra parte, el PPAR γ contribuye al desarrollo de la placenta y de este modo a la transferencia materno-fetal de oxígeno y nutrientes, permitiendo el adecuado crecimiento y neurodesarrollo fetal. En un estudio reciente se ha demostrado la existencia de una asociación positiva entre la expresión del PPAR γ en la placenta y el peso placentario y del recién nacido (51). En el estudio presentado en esta tesis, sin embargo, no hemos podido detectar diferencias claras en las concentraciones de ácidos grasos presentes en la placenta ni en los de fosfolípidos del plasma materno y de cordón umbilical entre los diferentes grupos de estudio dependiendo del genotipo Pro12A1a.

5.4. Limitaciones de los estudios presentados

La mayor limitación de los estudios presentados en esta tesis es el gran abandono de casos entre el nacimiento y los 6 meses de vida; esto causa una reducción de la muestra más e incrementa el riesgo de que las variables confusoras alteren los resultados. No obstante, varias de las diferencias observadas permanecen después del ajuste por las variables confusoras, además, las características de los cuatro grupos de estudio fueron similares, incluso dependiendo del polimorfismo genético del PPAR γ de la madre, lo que apoya los resultados obtenidos en relación al desarrollo cognitivo y del lenguaje a los 18 meses de edad en los niños estudiados, si bien es cierto que también podría darse una relación casual.

Los estudios también pueden verse limitados por el hecho de que solo evaluamos las puntuaciones del test Bayley. Estudios anteriores han informado de efectos negativos en

dominios afectivos y del comportamiento, TDAH e incluso trastornos alimentarios, pero siempre en niños mayores que los estudiados en el presente trabajo (15, 21, 52).

Además, la falta de asociación entre el polimorfismo del PPAR γ y las concentraciones de ácidos grasos en la placenta, podrían ser el resultado de la preparación de la muestra (*mezcla del lado materno y fetal de la placenta*); otra explicación podría ser la limitada muestra disponible para los análisis de los ácidos grasos (especialmente entre los portadores del alelo Ala), no habiendo suficiente poder estadístico para detectar diferencias entre los grupos de estudio.

Los datos obtenidos en el presente estudio abren la puerta a futuros estudios que confirmen estos resultados y que puedan explicar los mecanismos que determinan los efectos clínicos observados, para poder establecer acciones preventivas y diseñar posibles tratamientos.

Bibliografía - Discusión

1. Bider-Canfield Z, Martinez MP, Wang X, Yu W, Bautista MP, Brookey J, et al. Maternal obesity, gestational diabetes, breastfeeding and childhood overweight at age 2 years. *Pediatric obesity*. 2016.
2. Aguilar Cordero MJ, Baena Garcia L, Rodriguez Blanque R, Latorre Garcia J, Mur Villar N, Sanchez Lopez AM. [Maternal Diabetes Mellitus and Its Impact on Child Neurodevelopment; Systematic Review]. *Nutricion hospitalaria*. 2015;32(6):2484-95.
3. Jo H, Schieve LA, Sharma AJ, Hinkle SN, Li R, Lind JN. Maternal prepregnancy body mass index and child psychosocial development at 6 years of age. *Pediatrics*. 2015;135(5):e1198-209.
4. Shaw J. Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. *Pediatric diabetes*. 2007;8 Suppl 9:7-15.
5. Williams TC, Drake AJ. What a general paediatrician needs to know about early life programming. *Archives of disease in childhood*. 2015;100(11):1058-63.
6. Barker DJ. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1992;51(2):135-44.
7. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology*. 2002;31(6):1235-9.
8. Neggers YH, Goldenberg RL, Ramey SL, Cliver SP. Maternal prepregnancy body mass index and psychomotor development in children. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2003;82(3):235-40.
9. Heikura U, Taanila A, Hartikainen AL, Olsen P, Linna SL, von Wendt L, et al. Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: a study of the 20-year interval between two birth cohorts in northern Finland. *American journal of epidemiology*. 2008;167(2):169-77.
10. Hinkle SN, Schieve LA, Stein AD, Swan DW, Ramakrishnan U, Sharma AJ. Associations between maternal prepregnancy body mass index and child neurodevelopment at 2 years of age. *International journal of obesity*. 2012;36(10):1312-9.
11. Brion MJ, Zeegers M, Jaddoe V, Verhulst F, Tiemeier H, Lawlor DA, et al. Intrauterine effects of maternal prepregnancy overweight on child cognition and behavior in 2 cohorts. *Pediatrics*. 2011;127(1):e202-11.
12. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes*. 2009;10 Suppl 12:3-12.
13. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and child health journal*. 2013;17(2):222-9.

14. Rodríguez A, Miettunen J, Henriksen TB, Olsen J, Obel C, Taanila A, et al. Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: evidence from three prospective pregnancy cohorts. *International journal of obesity*. 2008;32(3):550-7.
15. Rodríguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2010;51(2):134-43.
16. Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, Sipila P. Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. *The American journal of psychiatry*. 1998;155(3):355-64.
17. Schaefer CA, Brown AS, Wyatt RJ, Kline J, Begg MD, Bresnahan MA, et al. Maternal prepregnant body mass and risk of schizophrenia in adult offspring. *Schizophrenia bulletin*. 2000;26(2):275-86.
18. Wahlbeck K, Forsen T, Osmond C, Barker DJ, Eriksson JG. Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth, and thinness during childhood. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(1):48-52.
19. Kawai M, Minabe Y, Takagai S, Ogai M, Matsumoto H, Mori N, et al. Poor maternal care and high maternal body mass index in pregnancy as a risk factor for schizophrenia in offspring. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2004;110(4):257-63.
20. Van Lieshout RJ, Schmidt LA, Robinson M, Niccols A, Boyle MH. Maternal pre-pregnancy body mass index and offspring temperament and behavior at 1 and 2 years of age. *Child psychiatry and human development*. 2013;44(3):382-90.
21. Robinson M, Zubrick SR, Pennell CE, Van Lieshout RJ, Jacoby P, Beilin LJ, et al. Pre-pregnancy maternal overweight and obesity increase the risk for affective disorders in offspring. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2013;4(1):42-8.
22. Buss C, Entringer S, Davis EP, Hobel CJ, Swanson JM, Wadhwa PD, et al. Impaired executive function mediates the association between maternal pre-pregnancy body mass index and child ADHD symptoms. *PloS one*. 2012;7(6):e37758.
23. Koletzko B, Chourdakis M, Grote V, Hellmuth C, Prell C, Rzehak P, et al. Regulation of early human growth: impact on long-term health. *Annals of nutrition & metabolism*. 2014;65(2-3):101-9.
24. Starling AP, Brinton JT, Glueck DH, Shapiro AL, Harrod CS, Lynch AM, et al. Associations of maternal BMI and gestational weight gain with neonatal adiposity in the Healthy Start study. *The American journal of clinical nutrition*. 2015;101(2):302-9.
25. Wallace JM, Horgan GW, Bhattacharya S. Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. *Placenta*. 2012;33(8):611-8.

26. Siega-Riz AM, Gray GL. Gestational weight gain recommendations in the context of the obesity epidemic. *Nutrition reviews*. 2013;71 Suppl 1:S26-30.
27. Koletzko B, Symonds ME, Olsen SF. Programming research: where are we and where do we go from here? *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(6 Suppl):2036S-43S.
28. Cao C, O'Brien KO. Pregnancy and iron homeostasis: an update. *Nutrition reviews*. 2013;71(1):35-51.
29. Georgieff MK. The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 6):1267-71.
30. Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *European journal of clinical nutrition*. 2014;68(1):2-7.
31. Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013;24(6):279-89.
32. Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food and nutrition bulletin*. 2008;29(2 Suppl):S101-11; discussion S12-5.
33. Martínez ÁC. Pautas de crianza y desarrollo socioafectivo en la infancia. *Diversitas*. 2010;6(1):111-21.
34. Saha S, Barnett AG, Foldi C, Burne TH, Eyles DW, Buka SL, et al. Advanced paternal age is associated with impaired neurocognitive outcomes during infancy and childhood. *PLoS medicine*. 2009;6(3):e40.
35. Patra K, Greene MM, Patel AL, Meier P. Maternal Education Level Predicts Cognitive, Language, and Motor Outcome in Preterm Infants in the Second Year of Life. *American journal of perinatology*. 2016.
36. Hinkle SN, Albert PS, Sjaarda LA, Grewal J, Grantz KL. Trajectories of maternal gestational weight gain and child cognition assessed at 5 years of age in a prospective cohort study. *Journal of epidemiology and community health*. 2016;70(7):696-703.
37. Grootendorst-van Mil NH, Verhulst FC, Tiemeier H. [The association of gestational duration and birth weight with child IQ: The Generation R Study]. *Tijdschrift voor psychiatrie*. 2015;57(12):886-91.
38. Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, et al. Maternal pre-pregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: two Southern European birth cohort studies. *International journal of epidemiology*. 2013;42(2):506-17.
39. Fraser A, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Lawlor DA. Associations of existing diabetes, gestational diabetes, and glycosuria with offspring IQ and educational attainment: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:963735.

40. DeBoer T, Wewerka S, Bauer PJ, Georgieff MK, Nelson CA. Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. *Developmental medicine and child neurology*. 2005;47(8):525-31.
41. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004;123(1):131-45.
42. Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, Vidyadaran S, Othman F, Farjam AS, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC neuroscience*. 2012;13:109.
43. Anjos T, Altmae S, Emmett P, Tiemeier H, Closa-Monasterolo R, Luque V, et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *European journal of nutrition*. 2013;52(8):1825-42.
44. Schaiff WT, Knapp FF, Jr., Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology*. 2007;148(8):3625-34.
45. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Hormone research*. 2006;65 Suppl 3:59-64.
46. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free radical research*. 2010;44(10):1125-71.
47. Krauss-Etschmann S, Shadid R, Campoy C, Hoster E, Demmelmair H, Jimenez M, et al. Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(5):1392-400.
48. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *The British journal of nutrition*. 2012;107 Suppl 2:S85-106.
49. Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21(5):364-73.
50. Noaghiul S, Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *The American journal of psychiatry*. 2003;160(12):2222-7.
51. Diaz M, Bassols J, Lopez-Bermejo A, Gomez-Roig MD, de Zegher F, Ibanez L. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): relation to placental and fetal growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(8):E1468-72.
52. Favaro A, Tenconi E, Santonastaso P. Perinatal factors and the risk of developing anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Archives of general psychiatry*. 2006;63(1):82-8.

Capítulo 6

Conclusiones

Capítulo 6. Conclusiones

1. El Índice de Masa Corporal (IMC) materno pre-concepcional y la Diabetes gestacional determinan alteraciones nutricionales, antropométricas y bioquímicas en las embarazadas, que pueden comprometer el curso de la gestación. Entre las alteraciones nutricionales observadas, caben destacar las modificaciones del metabolismo de la glucosa y las deficiencias de vitamina B12 y ácido fólico en las embarazadas obesas al final de la gestación.
2. Los hijos de madres obesas tienen un mayor peso al nacimiento, mayor perímetro de la cintura y presentan mayor prevalencia de macrosomía.
3. Se confirma que los recién nacidos de madres con patologías metabólicas se diferencian en la evolución y el perfil de neurodesarrollo.
4. Se comprueba un aumento temporal en el rendimiento cognitivo y del lenguaje a los 6 meses de edad en los hijos de madres obesas.
5. A los 18 meses, las diferencias observadas en los hijos de madres obesas a los 6 meses desaparecen, mostrando puntuaciones similares a las obtenidas en hijos de madres sanas con normopeso, e incluso más bajas; es decir, acontece una *tasa de cambio negativa*. Esta ralentización en el desarrollo entre los 6 y 18 meses, sugiere la posible importancia del mayor neurodesarrollo a los 6 meses como marcador clínico predictor de un desarrollo pobre o desfavorable a largo plazo; esta teoría se ve apoyada por la correlación positiva establecida en estos niños entre las altas puntuaciones en el dominio del lenguaje a los 6 meses y puntuaciones más bajas en motricidad gruesa a los 18 meses.
6. A pesar de que las embarazadas diagnosticadas de diabetes gestacional estuvieron sometidas a un programa de control dietético y metabólico, y recibieron el

tratamiento médico más adecuado, a los 18 meses de edad sus hijos obtuvieron puntuaciones más bajas en motricidad gruesa y en el desarrollo del lenguaje, tanto en su componente de expresión como en las puntuaciones compuestas.

7. Independientemente de la condición metabólica materna, los niños nacidos de madres con el genotipo Pro12 obtienen mejores resultados en su neurodesarrollo a los 18 meses de edad, respecto a los nacidos de madres con el genotipo Ala; el efecto se comprueba en motricidad, cognición y lenguaje, indicando la influencia a largo plazo del polimorfismo PPAR γ materno sobre el desarrollo cerebral de los hijos.