

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRÍA,
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**INVESTIGACIÓN *IN VIVO* DE LA TRANSFERENCIA
PLACENTARIA DE ÁCIDOS GRASOS MARCADOS CON
CARBONO 13 EN HUMANOS**

TESIS DOCTORAL EUROPEA

ALFONSO GIL SÁNCHEZ
MURCIA, 2011

Memoria presentada por el licenciado
Alfonso Gil Sánchez
para optar al grado de Doctor en Medicina
con mención de “Doctorado Europeo”

Alfonso Gil Sánchez

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por:

Prof. Dra. Dña. Elvira Larqué Daza
Departamento de Fisiología Animal
Universidad de Murcia

Prof. Dr. D. Juan José Parrilla Paricio
Departamento de Cirugía, Pediatría y Obstetricia
Universidad de Murcia

Prof. Dr. D. Berthold V. Koletzko
Department of Paediatrics
Nutrition and Metabolism Division
Ludwig Maximilians Universität of München (Germany)



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Facultad de
Biología

D^a. Elvira Larqué Daza, Profesor Titular de Universidad del Área de Biología en el Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Investigación in vivo de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con carbono 13 en humanos", realizada por D. Alfonso Gil Sánchez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de enero de 2011



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIDAD DOCENTE DE
FISIOLÓGIA ANIMAL



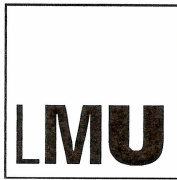
UNIVERSIDAD DE
MURCIA

El Prof. JUAN JOSÉ PARRILLA PARICIO, Catedrático de Universidad del Área de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Murcia

CERTIFICA que **D. ALFONSO GÍL SÁNCHEZ** ha realizado la Tesis Doctoral titulada *“Investigación in vivo de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con carbono 13 en humanos”* bajo su dirección.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo la presente certificación en Murcia, a quince de enero de dos mil once.

Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Servicio de Cirugía General, 3ª Planta. Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca”
Campus Universitario Ciencias de la Salud. 30120 El Palmar. Murcia
Teléfono 968369687-77. FAX 968395537



KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK
IM DR. V. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL



Klinikum der Universität München · Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital, Lindwurmstr. 4, 80337 München

Dr. Alfonso Gil Sánchez



Dr. von Haunersches
Kinderspital

Univ.-Prof. Dr. Berthold Koletzko
Sekretariat: Birgit Kessler
Telefon +49 (0)89 5160 - 2826
Telefax +49 (0)89 5160 - 7742
office.koletzko@med.uni-muenchen.de

www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Lindwurmstraße 4, D-80337 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

München, 06.10.2010

D. Berthold V. Koletzko, Profesor Titular de Universidad del Área de
Pediatria en el Departamento de Pediatria, Children's Hospital, Dr. von
Haunersches Kinderspital, Ludwig Maximilian Univ. of Munich, AUTORIZA:

Le presentación de la Tesis Doctoral titulada „Investigación in vivo
de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con carbono 13 en
humanos“, realizada por D. Alfonso Gil Sánchez, bajo mi inmediata dirección y
supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la
Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de Septiembre de 2010

Klinikum der Universität München
Dr. von Haunersches Kinderspital
Univ.-Prof. Dr. med. Berthold Koletzko
Abt. Stoffwechsel & Ernährung
Lindwurmstr. 4 - D-80337 München
T. 089/51 60-28 11, F. 089/51 60-77 42

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik:
öffentl. Verkehr:

Prof. Dr. D. Reinhardt
U3, U6, Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. PASCUAL PARRILLA PARICIO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL AREA DE CIRUGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRIA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

INFORMA: Que la Tesis Doctoral titulada *“Investigación in vivo de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con carbono 13 en humanos”*, ha sido realizada por **D. Alfonso Gil Sánchez**, bajo la inmediata dirección y supervisión de los profesores Elvira Larqué Daza, Juan José Parrilla Paricio y Berthold V. Koletzko y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia a quince de enero de dos mil once.

**CLINIC OF OBSTETRICS
AND GYNAECOLOGY**

Medical-University-Graz

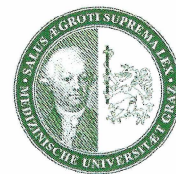
G. Desoye

Auenbruggerplatz 14
A-8036 Graz

Tel +43-316-385-84605

Fax +43-316-385-12506

gernot.desoye@medunigraz.at



Graz, June 8, 2010

To whom it may concern

The dissertation submitted by **Alfonso Gil Sánchez** to obtain the Ph.D. Degree in Medicine from the University of Murcia entitled "In vivo investigation of human placental transfer of ^{13}C -labelled fatty acids" is an original work.

The general objective of the present Doctoral Thesis was to deepen in the knowledge and understanding of the mechanism involved in the placental transfer of fatty acids to the fetus.

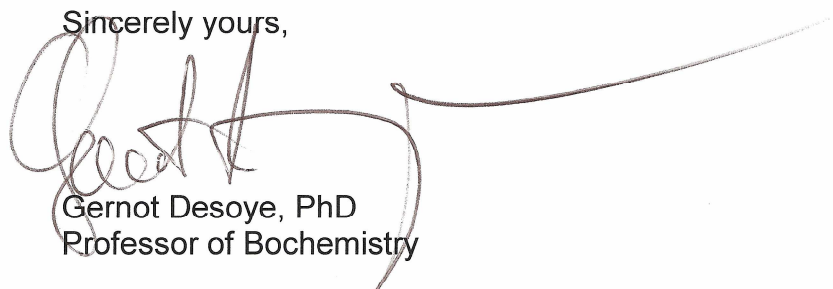
To reach this objective, eleven pregnant women undergoing elective caesarean section were recruited for the study. Twelve hours before delivery, the subjects received one oral dose of uniformly ^{13}C -labeled fatty acids. ^{13}C -Fatty acids from placenta tissue and from maternal and fetal plasma were measured by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. The concentration of the ^{13}C -labeled fatty acids, the ratio of distribution of ^{13}C -tracer between placental tissue and maternal plasma was calculated and the tracer fatty acid transfer from the mother to the neonate was estimated. The study demonstrates the preferential enrichment of long chain polyunsaturated fatty acids over parent essential fatty acids in the placenta and a preferential docosahexaenoic acid transfer from maternal plasma to cord plasma.

The scientific quality of this research work has to be highlighted and this has been expressed through the publication of the work in a very prestigious journal: The American Journal of Clinical Nutrition. I agree with a favourable recommendation as a European thesis.

In conclusion, the doctoral thesis submitted by Mr Alfonso Gil Sánchez fulfils the European standards to obtain the Ph.D. degree.

If you have any further questions please do not hesitate in contact me either by phone (+43-316-385-84605) or by e-mail gernot.desoye@medunigraz.at

Sincerely yours,



Gernot Desoye, PhD
Professor of Biochemistry



Graz, 8 de junio de 2010

A quien pueda interesar

La Tesis presentada por Alfonso Gil Sánchez para obtener el grado de Doctor por la Universidad de Murcia titulada "Investigación *in vivo* de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con ¹³carbono en humanos" es un trabajo original.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue profundizar en el conocimiento y entendimiento de los mecanismos envueltos en la transferencia placentaria de ácidos grasos al feto.

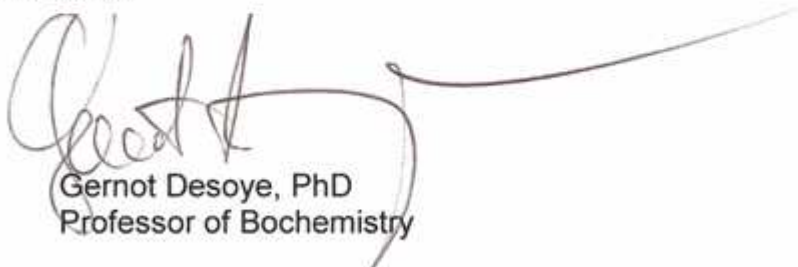
Para alcanzar este objetivo, fueron reclutadas once mujeres que iban a someterse a una cesárea electiva. Doce horas antes de la intervención, las pacientes recibieron una dosis oral de ácidos grasos marcados uniformemente con ¹³C. Mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de isótopo ratio se midió la cantidad de ¹³C-ácidos grasos en el tejido placentario y en el plasma materno y fetal. Se calculó la concentración de ¹³C-ácidos grasos, el ratio de distribución de ¹³C-ácidos grasos entre tejido placentario y plasma materno y se estimó la transferencia de los ácidos grasos marcados desde la madre al neonato. El estudio demuestra en la placenta el enriquecimiento preferencial de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga respecto a los ácidos grasos parentales y una transferencia preferente desde el plasma materno al plasma de cordón del ácido docosahexaenoico.

Ha de destacarse la calidad científica de este manuscrito, demostrada por su publicación en una prestigiosa revista: The American Journal of Clinical Nutrition. Estoy de acuerdo en recomendar favorablemente este trabajo como Tesis Europea.

En conclusión, la Tesis Doctoral presentada por D. Alfonso Gil Sánchez cumple con los estándares europeos para obtener el grado de Doctor.

Si tiene alguna otra pregunta no dude en contactar conmigo telefónicamente (+43-316-385-84605) o por e-mail gernot.desoye@medunigraz.at

Atentamente,



Gernot Desoye, PhD
Professor of Biochemistry

Frauenklinik

To whom it may concern

Spitalstrasse 21
CH-4031 Basel
Telefon +41 61 265 90 99
Telefax +41 61 265 91 99
Zentrale +41 61 265 25 25

Vorsteher/Chefarzt

Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
E-Mail jbitzer@uhbs.ch

Basel, 9th August 2010

Letter of Recommendation for Alfonso Gil Sánchez

The dissertation submitted by Alfonso Gil Sánchez to obtain the Ph.D. Degree in Medicine from the University of Murcia entitled "In vivo investigation of human placental transfer of ¹³C-labelled fatty acids" is an original work.

The general objective of the present Doctoral Thesis was to deepen in the knowledge and understanding of the mechanism involved in the placental transfer of fatty acids to the fetus.

To reach this objective, eleven pregnant women undergoing elective caesarean section were recruited for the study. Twelve hours before delivery, the subjects received one oral dose of uniformly ¹³C-labeled fatty acids. ¹³C-Fatty acids from placenta tissue and from maternal and fetal plasma were measured by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. The concentration of the ¹³C-labeled fatty acids, the ratio of distribution of ¹³C-tracer between placental tissue and maternal plasma was calculated and the tracer fatty acid transfer from the mother to the neonate was estimated. The study demonstrates the preferential enrichment of long chain polyunsaturated fatty acids over parent essential fatty acids in the placenta and a preferential docosahexaenoic acid transfer from maternal plasma to cord plasma.

Vorsteher/Chefarzt: Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
Geburtshilfe und Schwangerschaftsmedizin: Prof. Dr. med. Irene Hösli, PD Dr. med. Olav Lapaire (Stv.)
Gynäkologie und Gyn. Onkologie: PD Dr. med. Edward Wight, PD Dr. med. Rosanna Zanetti Dällenbach (Stv.)
Gyn. Endokrinologie und Reproduktionsmedizin: Prof. Dr. med. Christian De Geyter
Gyn. Sozialmedizin und Psychosomatik: Dr. med. Sibil Tschudin
Leiterin Ultraschall: Prof. Dr. med. Sevgi Tercanli

www.ufk-basel.ch



Accredited by the European Board and College
of Obstetrics and Gynaecology (E.B.C.O.G.)



Kinderhilfswerk der Vereinten Nationen

Anerkennung als „Baby-Friendly Hospital“
durch UNICEF/WHO



WHO Weltgesundheitsorganisation

The scientific quality of this research work has to be highlighted and this has been expressed through the publication of the work in a very prestigious journal: The American Journal of Clinical Nutrition. I agree with a favourable recommendation as a European thesis.

In conclusion, the doctoral thesis submitted by Mr Alfonso Gil Sánchez fulfils the European standards to obtain the Ph.D. degree.



Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
Chair
University Women's Hospital Basel

Frauenklinik

A quien pueda interesar

Spitalstrasse 21
CH-4031 Basel
Telefon +41 61 265 90 99
Telefax +41 61 265 91 99
Zentrale +41 61 265 25 25

Vorsteher/Chefarzt

Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
E-Mail jbitzer@uhbs.ch

Basilea, 9 de agosto de 2010

Carta de recomendación para Alfonso Gil Sánchez

La Tesis presentada por Alfonso Gil Sánchez para obtener el grado de Doctor por la Universidad de Murcia titulada "Investigación *in vivo* de la transferencia placentaria de ácidos grasos marcados con ¹³carbono en humanos" es un trabajo original.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue profundizar en el conocimiento y entendimiento de los mecanismos envueltos en la transferencia placentaria de ácidos grasos al feto.

Para alcanzar este objetivo, fueron reclutadas once mujeres que iban a someterse a una cesárea electiva. Doce horas antes de la intervención, las pacientes recibieron una dosis oral de ácidos grasos marcados uniformemente con ¹³C. Mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de isótopo ratio se midió la cantidad de ¹³C-ácidos grasos en el tejido placentario y en el plasma materno y fetal. Se calculó la concentración de ¹³C-ácidos grasos, el ratio de distribución de ¹³C-ácidos grasos entre tejido placentario y plasma materno y se estimó la transferencia de los ácidos grasos marcados desde la madre al neonato. El estudio demuestra en la placenta el enriquecimiento preferencial de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga respecto a los ácidos grasos parentales y una transferencia preferente desde el plasma materno al plasma de cordón del ácido docosahexaenoico.

Vorsteher/Chefarzt: Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
Geburtshilfe und Schwangerschaftsmedizin: Prof. Dr. med. Irene Hösl, PD Dr. med. Olav Lapaire (Stv.)
Gynäkologie und Gyn. Onkologie: PD Dr. med. Edward Wight, PD Dr. med. Rosanna Zanetti Dällenbach (Stv.)
Gyn. Endokrinologie und Reproduktionsmedizin: Prof. Dr. med. Christian De Geyter
Gyn. Sozialmedizin und Psychosomatik: Dr. med. Sibil Tschudin
Leiterin Ultraschall: Prof. Dr. med. Sevgi Tercanli

www.ufk-basel.ch



Accredited by the European Board and College
of Obstetrics and Gynaecology (E.B.C.O.G.)



IGAC InterCert
Reproduktionsmedizin

unicef
Kindernetzwerk der Vereinten Nationen

Anerkennung als „Baby-Friendly Hospital“
durch UNICEF/WHO



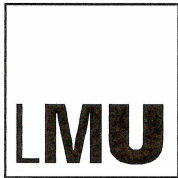
WHO Weltgesundheitsorganisation

Ha de destacarse la calidad científica de este manuscrito, demostrada por su publicación en una prestigiosa revista: The American Journal of Clinical Nutrition. Estoy de acuerdo en recomendar favorablemente este trabajo como Tesis Europea.

En conclusión, la Tesis Doctoral presentada por D. Alfonso Gil Sánchez cumple con los estándares europeos para obtener el grado de Doctor.



Prof. Dr. med. Johannes Bitzer
Chair
University Women's Hospital Basel



KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT
KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK
IM DR. V. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL



Klinikum der Universität München · Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital, Lindwurmstr. 4, 80337 München

Univ.-Prof. Dr. Berthold Koletzko
Sekretariat: Birgit Kessler
Telefon +49 (0)89 5160 - 2826
Telefax +49 (0)89 5160 - 7742
office.koletzko@med.uni-muenchen.de



Dr. von Haunersches
Kinderspital

www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Lindwurmstraße 4, D-80337 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

Munich, September 15, 2010

To whom it may concern

Dr. Alfonso Gil Sánchez was in the division of Metabolic Diseases and Nutrition, Department of Pediatrics, Children's Hospital, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-University of Munich from 8th January to 30th May 2008 and he had been awarded a scholarship by the DAAD (German Academic Exchange Service) for his academic study and training in Germany.

Dr. Gil Sánchez was participating in the analysis of fatty acids and 13C-fatty acid analyses. He was very well integrated in our team. He was very cooperative and obtained a profound knowledge about the theory and practice of fatty acid analyses. Thus he contributed to improve the discussions about results.

In conclusion, Dr. Gil Sánchez makes very good use of the stay in our laboratory and we wish him all the best to obtain the European thesis Ph.D. degree.

Prof. Dr. med. Berthold Koletzko
University of Munich



Klinikum der Universität München · Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital, Lindwurmstr. 4, 80337 München

Univ.-Prof. Dr. Berthold Koletzko
Sekretariat: Birgit Kessler
Telefon +49 (0)89 5160 - 2826
Telefax +49 (0)89 5160 - 7742
office.koletzko@med.uni-muenchen.de

www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Lindwurmstraße 4, D-80337 München



Dr. von Haunersches
Kinderspital

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

Munich, September 15, 2010

A quien pueda interesar

D. Alfonso Gil Sánchez estuvo en el Hospital Infantil Dr. von Haunersches Kinderspital, en la División de Nutrición y Enfermedades metabólicas del Departamento de Pediatría de la Universidad Ludwig-Maximilians de Munich, desde el ocho de enero al treinta de mayo del 2008 y fue galardonado con una Beca del DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico) para estudiar y formarse en Alemania.

D. Alfonso Gil Sánchez participó en el análisis de ácidos grasos y ^{13}C -ácidos grasos. Se integró muy bien en nuestro equipo, fue muy cooperativo y obtuvo un profundo conocimiento sobre la teoría y la práctica del análisis de ácidos grasos, contribuyendo de este modo a mejorar el debate sobre los resultados.

En conclusión, el Sr. Gil Sánchez hizo muy buen uso de su estancia en nuestro laboratorio y le deseamos lo mejor para obtener el Título Europeo de Doctor.

Prof. Dr. med. Berthold Koletzko
University of Munich

AGRADECIMIENTOS

Comencé esta tesis con mucha ilusión, llené mi corazón de valores y mi cabeza de argumentos poderosos, y sin saber exactamente con qué me iba a enfrentar, pero con la convicción de que sería increíble, me puse a caminar.

Recorrer este camino ha reforzado aquellos valores y argumentos que me llevaron a empezar: aprendizaje, criticismo, curiosidad, trabajo, disciplina,... me ha hecho disfrutar experiencias maravillosas, como vivir en Munich o visitar Sudáfrica, me ha permitido publicar en una prestigiosa revista,... pero sobre todo me ha fortalecido y me ha hecho crecer a nivel personal.

Por eso, escribir estos agradecimientos significa haber vivido y cumplido un sueño de la infancia, un sueño que he tenido la fortuna de compartir con aquellos a los que va dirigida mi gratitud:

A la profesora Elvira Larqué: Elvira, por tu generosidad... gracias por haber puesto tantas ganas como yo en esto, por todo lo que has trabajado y peleado y por haberme enseñado tantas cosas... Estoy seguro de que esta tesis no habría sido posible sin tí.

Al Profesor Parrilla: Juanjo, por tu confianza... gracias por dejarme trabajar con total libertad.

To professor B. Koletzko: "Bert", for your closeness... thanks for having always time to help me.

To Hans Demmelair, for your dedication... thanks for receiving me in the Lab with open arms and let me feel at home.

A Josefina, Anna Lluís, Fabienne, Veronika, Ulrike, Claudia, Wolfgang, Sonia, Paz, Nicola, Abbas, Jhon... gracias por compartir en Munich uno de los momentos más dulces de mi vida. Thanks for sharing with me one of the sweeter times of my life

A Maribel Ación, mi "R" mayor,... gracias por cederme todo tu trabajo y pensar en mí para esta Tesis.

A todo el equipo, auxiliares, matronas y médicos, de la Unidad de Medicina Materno Fetal del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca... gracias por vuestro apoyo durante el reclutamiento de las pacientes.

A las enfermeras y auxiliares de Urgencias, de la planta y del quirófano, a las matronas, a los anestesiólogos y los ginecólogos que participaron en las cesáreas,... gracias por vuestra paciencia y vuestras ganas de ayudar.

Al Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD) y a la Sociedad Ginecológica Murciana (en especial a Pepe Martos)... gracias por vuestro apoyo económico durante mi estancia en Alemania.

A mi madre... gracias por todo el esfuerzo empleado en nosotros, por tu educación, tu cariño y tus valores. Gracias por inculcarme los cimientos que han sustentado este proyecto.

A mis hermanos... gracias por estar siempre cerca de mí, a mi lado. Gracias por vuestro espíritu, por ayudarme a no caer, a mantener los pies en el suelo y a reírme de mí mismo.

A mis sobrinos Ángel y Bruno... gracias por interrumpirme para jugar en las largas jornadas de trabajo.

A mis amigos... gracias por aguantar todos “los rollos” que os he soltado de la tesis. Gracias por vuestra energía y por disfrutar esto conmigo.

A Ana, mi mujer, mi compañera de viaje... gracias por tu amor, tu ánimo, por escucharme, por acompañarme, por haber viajado en este sueño conmigo... Gracias por ponerle el punto de cordura a mi locura... te quiero güera.

A mi hijo Jorge, que está a punto de nacer y ya se hace notar con sus pataditas... Gracias por no permitirme sucumbir... te quiero peke.

A mi madre
A mis hermanos
A mis amigos

A Ana
A Jorge



ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Lípidos consideraciones generales	3
	- Ácidos grasos	4
	- Triglicéridos	7
	- Fosfolípidos	8
	- Ésteres de colesterol	9
1.2	Ácidos grasos esenciales	10
1.3	Ácidos grasos condicionalmente esenciales para el feto:	
	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA)	11
1.4	Metabolismo lipídico	13
1.4.1	Digestión de los lípidos	13
1.4.2	Absorción y transporte de lípidos	13
1.4.3	Captación tisular de ácidos grasos	16
1.4.4	Transporte de ácidos grasos a través de la membrana	17
1.4.5	Transporte intracelular de ácidos grasos	18
1.4.6	Metabolismo intracelular de ácidos grasos	19
	a) Vauolas lipídicas o lipid droplets	20
	b) Lipólisis	22
1.5	Metabolismo lipídico materno durante el embarazo	23
1.6	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA):	
	Status materno durante el embarazo	25
1.7	Transferencia placentaria de ácidos grasos	27
1.7.1	Captación de ácidos grasos por la placenta	30
1.7.2	Proteínas transportadoras de membrana placentarias	32
1.7.3	Transporte intracelular de ácidos grasos en la placenta	35
1.7.4	Transporte de ácidos grasos a la circulación fetal	37
1.7.5	Papel de Peroxisome-Proliferator-Activator-Receptor (PPAR) en la función placentaria	38
1.8	Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) para el feto	40
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	45

3 MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1 Diseño experimental	51
3.2 Obtención de muestras	53
3.3 Técnicas analíticas	54
3.3.1 Extracción de los lípidos del plasma	54
3.3.2 Extracción de los lípidos de placenta	56
3.3.3 Separación de las fracciones lipídicas de plasma y placenta	56
3.3.4 Metilación de los ácidos grasos de las fracciones lipídicas	59
3.3.5 Análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de los ácidos grasos	60
3.3.6 Análisis de los isótopos	60
3.3.7 Expresión de los resultados isotópicos	62
3.4 Tratamiento estadístico de los resultados	64
4 RESULTADOS	65
4.1 Características de los sujetos del estudio	67
4.2 Composición de ácidos grasos del plasma materno, placenta y plasma de cordón	69
4.2.1 Concentración de ácidos grasos en los diferentes compartimentos	69
4.2.2 Porcentaje de ácidos grasos en los diferentes compartimentos	71
4.3 Ácidos grasos marcados en plasma materno	73
4.3.1 Concentración de los ¹³ C-ácido grasos marcados en las fracciones lipídicas del plasma materno	73
4.3.2 Área bajo la curva de los ácidos grasos marcados en el plasma materno	76
4.4 Análisis de los ácidos grasos marcados con ¹³C en placenta	77
4.5 Análisis de los ácidos grasos marcados con ¹³C en cordón umbilical	78
4.5.1 Ácidos grasos marcados en vena umbilical	78
4.5.2 Ácidos grasos marcados en arteria umbilical	79
4.5.3 Diferencias en la Concentración de los ¹³ C-ácido grasos en las fracciones lipídicas de plasma de vena y arteria umbilical	80
4.6 Transferencia materno-placentaria de los ácidos grasos marcados con ¹³C	81
4.7 Transferencia materno-fetal de los ácidos grasos marcados con ¹³C	83

4.8 Fracciones lipídicas y transferencia materno-placentaria de los ácidos grasos marcados con ¹³C	85
4.9 Fracciones lipídicas y transferencia materno-fetal de los ácidos grasos marcados con ¹³C	89
5 DISCUSIÓN	91
6 CONCLUSIONES	103
CONCLUSIONS	109
7 SUMMARY	113
- Introduction	115
- Material and methods	116
- Results	119
- Discussion	121
8 BIBLIOGRAFÍA	127
9 ÍNDICE DE ABREVIATURAS	149



INTRODUCCIÓN

1.1 Lípidos: consideraciones generales.

Los lípidos son biomoléculas orgánicas, compuestas fundamentalmente por carbono, oxígeno e hidrógeno. Este grupo incluye moléculas de estructuras muy diferentes, aunque todas ellas se caracterizan, sin embargo, por su insolubilidad en agua y por su solubilidad en disolventes no polares. Desde el punto de vista químico los tipos principales de lípidos se pueden clasificar en:

- Ácidos grasos.
- Acilglicéridos: triglicéridos, pero también diglicéridos y monoglicéridos.
- Fosfolípidos y lisofosfolípidos.
- Lípidos que no contienen glicerol: esteroides y ésteres de colesterol, esfingolípidos, ceras, alcoholes y terpenos.

Los lípidos son transportados en el plasma sanguíneo mayoritariamente por las lipoproteínas, aunque algunos ácidos grasos también viajan unidos a albúmina. En el interior de las lipoproteínas tenemos fundamentalmente triglicéridos y colesterol esterificado, mientras que en la superficie se encuentran fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas (figura 1). Las vitaminas liposolubles y otras sustancias lipídicas también se transportan en sangre dentro de las lipoproteínas. A continuación nos centraremos en aquellas formas lipídicas que conforman principalmente las lipoproteínas y que son: ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol.

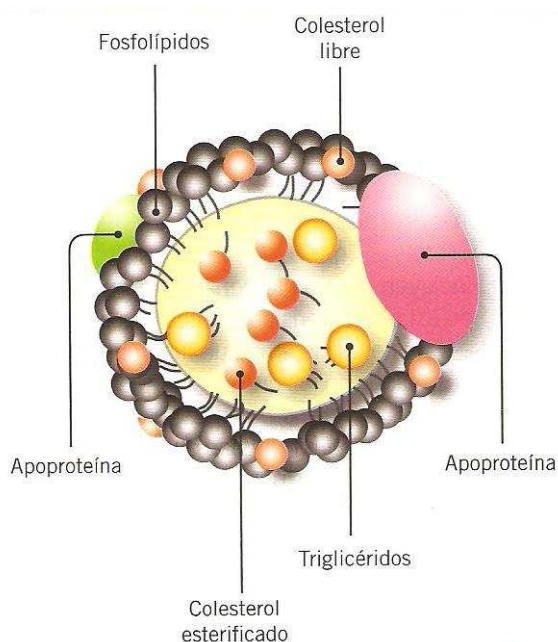


Figura 1. Estructura de una lipoproteína. De Sánchez, A. y Gil, A. (1).

- **Ácidos grasos.**

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo (-COOH). (Figura 2).

Los ácidos grasos son los componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Se debe distinguir entre los ácidos grasos que se incorporan a otras partículas para formar un mono, di o triglicérido, fosfolípido o éster de colesterol, y aquellos que no son incorporados a estas partículas, llamados ácidos grasos no esterificados (NEFA, non esterified fatty acids), o ácidos grasos libres.

El término ácido graso libre, puede de alguna manera ser ambiguo debido a que, por ejemplo en el plasma, estos ácidos grasos están unidos a la albúmina y no se encuentran “libres”. También existe una pequeña fracción de ácidos grasos (menos del 0.01% del “pool” de ácidos grasos en plasma) que está realmente libre, y no unido a ningún otro

compuesto (ácidos grasos no unidos a proteínas) (2). Por lo tanto, utilizaremos el término ácidos grasos no esterificados (NEFA) en esta revisión, para designar a los ácidos grasos que no están esterificados a triglicéridos, fosfolípidos o ésteres de colesterol, pero podrían estar unidos a la albúmina o a proteínas.

En humanos, la longitud de cadena de los ácidos grasos generalmente varía entre 14 y 24 átomos de carbono, aunque puede haber ácidos grasos con longitud de cadena más larga o más corta. Esta división es importante porque según su longitud, su digestión, absorción, transporte y metabolismo posterior van a ser diferentes. En función de la longitud de su cadena, los ácidos grasos se dividen en:

- Ácidos grasos de cadena corta: de 4 a 6 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena media: de 8 a 12 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena larga: de 14 a 18 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena muy larga: de 20 o más átomos de carbono.

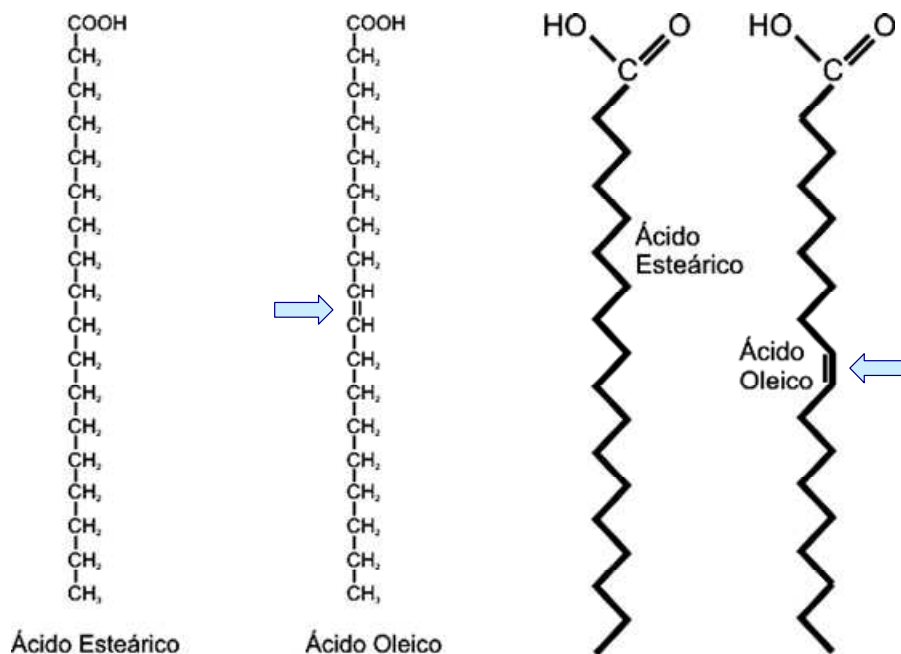


Figura 2. Representación gráfica de un ácido graso saturado (ácido esteárico) y un ácido graso monoinsaturado (ácido oleico). Las flechas indican la posición del doble enlace.

Además, los ácidos grasos se pueden clasificar en saturados, en los que la cadena hidrocarbonada posee únicamente enlaces simples, e insaturados, si en la cadena hidrocarbonada, además de los enlaces simples aparece un doble enlace (ácidos grasos monoinsaturados o MUFA) o varios dobles enlaces (ácidos grasos poliinsaturados o PUFA). (Figura 2).

La nomenclatura oficial de los ácidos grasos consiste en nombrar el número de átomos de carbono, seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces. Los ácidos grasos insaturados se agrupan en familias en función de la posición del primer doble enlace, denominándose la familia omega (ω ó n) cuando se comienza a contar los carbonos a partir del grupo metilo y delta (Δ) cuando se hace desde el grupo carboxilo, es decir desde el extremo contrario (tabla 1).

Tabla 1. Nomenclatura y fórmulas de los ácidos grasos.

Ácido Graso	Uniones Dobles	Nombre Común	Fórmula Química
12:0	-	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	-	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	-	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
16:1	w-6/n-6	Palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:0	-	Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18:1	w-9/n-9	Oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2	w-6/n-6	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	w-6/n-6	γ - linolenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
18:3	w-3/n-3	α - linolenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
20:0	-	Araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
20:2	w-6/n-6	Eicosadinoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
20:3	w-6/n-6	Dihomo- γ - linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
20:4	w-6/n-6	Araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
20:5	w-3/n-3	Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
22:0	-	Behenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
22:5	w-3/n-3	Docosapentahenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
22:6	w-3/n-3	Docosahexaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6(\text{CH}_2)\text{COOH}$
24:0	-	Lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$

Desde el punto de vista nutricional, los ácidos grasos saturados más importantes en alimentación son: láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (PA, 16:0) y esteárico (18:0). Entre los monoinsaturados el más importante cualitativa y cuantitativamente es el oleico (OA, 18:1 n-9), componente fundamental del aceite de oliva. Entre los poliinsaturados, destacan: linoleico (LA, 18:2 n-6), α -linolénico (ALA, 18:3 n-3), araquidónico (AA, 20:4 n-6), eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3).

Los ácidos grasos ejercen múltiples funciones, por un lado son la fuente principal de energía para la célula, mediante su oxidación en las mitocondrias, por otro lado forman parte de otros lípidos y de la estructura de todas las membranas, también son precursores de otras moléculas, como el colesterol, los prostanoides, etc. y por último, pueden actuar regulando la expresión génica mediante acción directa o indirectamente actuando como ligandos de receptores nucleares.

- **Triglicéridos.**

Los triglicéridos (TG) son ésteres de la glicerina con tres ácidos grasos; esta esterificación se produce de tal manera que el carbono uno está esterificado por un ácido graso saturado, el dos por un insaturado y el tres indistintamente por un saturado o insaturado (figura 3). Constituyen la forma más común de almacenamiento de grasa en el organismo y son el componente fundamental de la grasa de los alimentos.

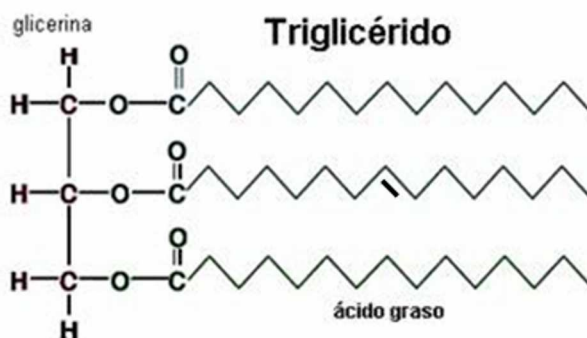


Figura 3. Representación gráfica de un triglicérido.

Cuando la glicerina está sólo esterificada con dos ácidos grasos se llama diglicérido (DG), y cuando está sólo esterificada con uno monoglicérido (MG), pero estos compuestos son minoritarios en el plasma humano respecto a los TG.

- **Fosfolípidos.**

Los fosfolípidos (PL), son derivados de la glicerina en la que dos de los grupos alcohólicos están esterificados por ácidos grasos, siendo al menos uno de ellos insaturado; el tercer grupo alcohólico está esterificado por el ácido fosfórico, y éste a su vez puede estar esterificado por diferentes moléculas nitrogenadas, dando lugar a distintos fosfolípidos: fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-serina, fosfatidil-colina, etc. (figura 4). Los fosfolípidos que están esterificados sólo con un ácido graso se denominan lisofosfolípidos (liso-PL).

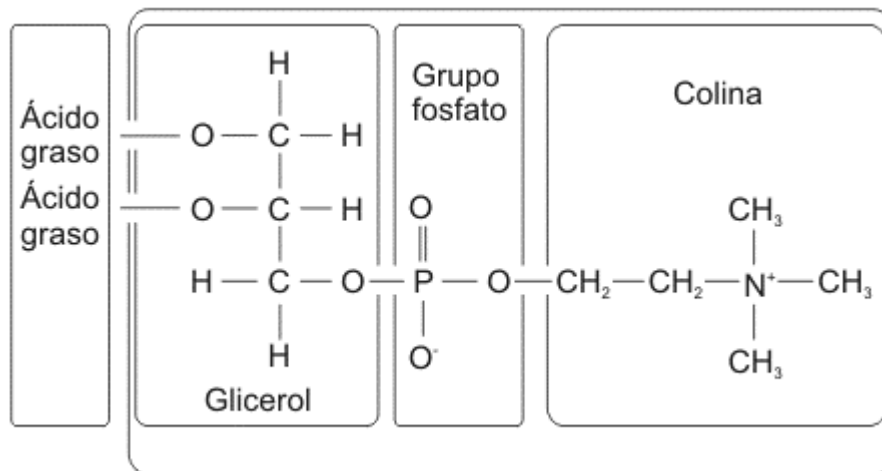


Figura 4. Representación gráfica de fosfatidilcolina.

Los fosfolípidos forman parte de todas las membranas celulares, por tanto, tienen una función estructural o plástica; pueden actuar como mensajeros en la transmisión de señales en el interior celular, y por último, debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en su molécula, actúan como precursores de la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

- **Ésteres de colesterol.**

Los esteroides son un grupo de lípidos de gran importancia biológica, que por contener un grupo alcoholico pueden formar ésteres con los ácidos grasos. Su estructura está relacionada con el ciclohexano perhidrofenantreno. Desde el punto de vista nutricional, el esteroide más importante es, sin duda, el colesterol (figura 5).

El colesterol forma parte de la estructura de todas las membranas celulares, dándoles consistencia y cumpliendo una función plástica, pero además, por su carácter fuertemente liposoluble, es capaz de modificar la permeabilidad de las membranas, colaborando con otras sustancias en la regulación de los intercambios en la célula y con el exterior. Por último, es precursor de otras moléculas como vitaminas y hormonas.

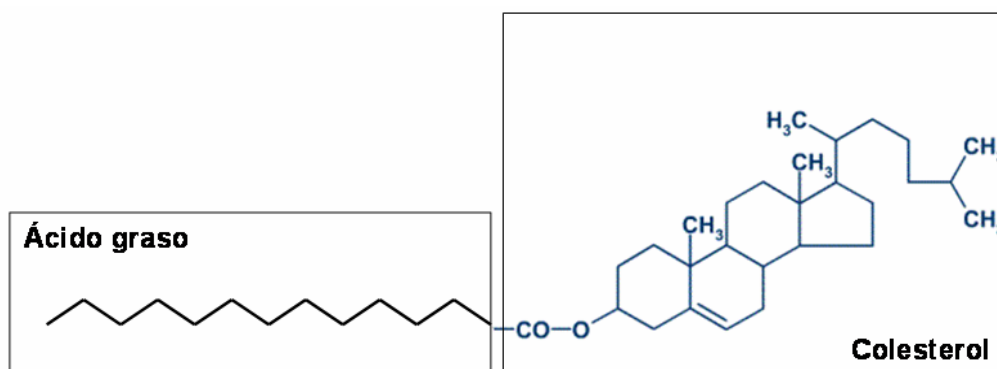


Figura 5. Representación gráfica de un éster de colesterol.

La esterificación del colesterol tiene lugar en el plasma mediante la transferencia de los ácidos grasos en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina al grupo 3- β -OH del colesterol. Esta reacción es catalizada por la enzima lección-colesterol aciltransferasa (LCAT), que generalmente utiliza el ácido graso en la posición sn-2, ocupado normalmente por el ácido linoleico.

1.2 Ácidos grasos esenciales.

Los ácidos grasos esenciales (EFA) para el ser humano son el ácido linoleico (18:2 n-6, LA) y el ácido α -linolénico (18:3 n-3, ALA). Estos están presentes fundamentalmente en aceites de semillas y en hojas verdes. Estos ácidos grasos son esenciales puesto que no pueden ser sintetizados por el hombre, debido a que el doble enlace más cercano al grupo metilo terminal, que los animales vertebrados pueden insertar, se sitúa en la posición siete, y para el linoleico se necesita un doble enlace en la posición 6, y para el α -linolénico en posición tres.

Además, las estructuras n-3 y n-6 no son interconvertibles, por lo que ambas deben ser ingeridas en la dieta. Los ácidos grasos esenciales van a dar lugar a los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 (omega 3, ω -3) y la familia n-6 (omega 6, ω -6), respectivamente, mediante reacciones de desaturación (introduciendo dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada) y elongación (incorporando átomos de carbono a la molécula) (figura 6).

El proceso bioquímico de elongación y desaturación del ácido linoleico (18:2 n-6, LA) y del ácido α -linolénico (18:3 n-3, ALA) es realizado principalmente por enzimas localizadas en el retículo endoplasmático y en los peroxisomas de las células hepáticas (3), aunque también puede tener lugar en otros tejidos. Estos precursores de 18 carbonos pueden ser elongados y desaturados para dar origen a una serie de ácidos grasos de cadena más larga y con mayor número de insaturaciones, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) (3), con 20 o más átomos de carbono y 2 o más dobles enlaces en su estructura. La figura 6 resume la transformación de los ácidos grasos esenciales (linoleico y α -linolénico) en su respectivos LCPUFA. En humanos, para cada ácido graso se muestran dos rutas alternativas, una que envuelve la Δ^6 – desaturasa más un paso de retroconversión y otra que envuelve la Δ^4 –desaturación (4).

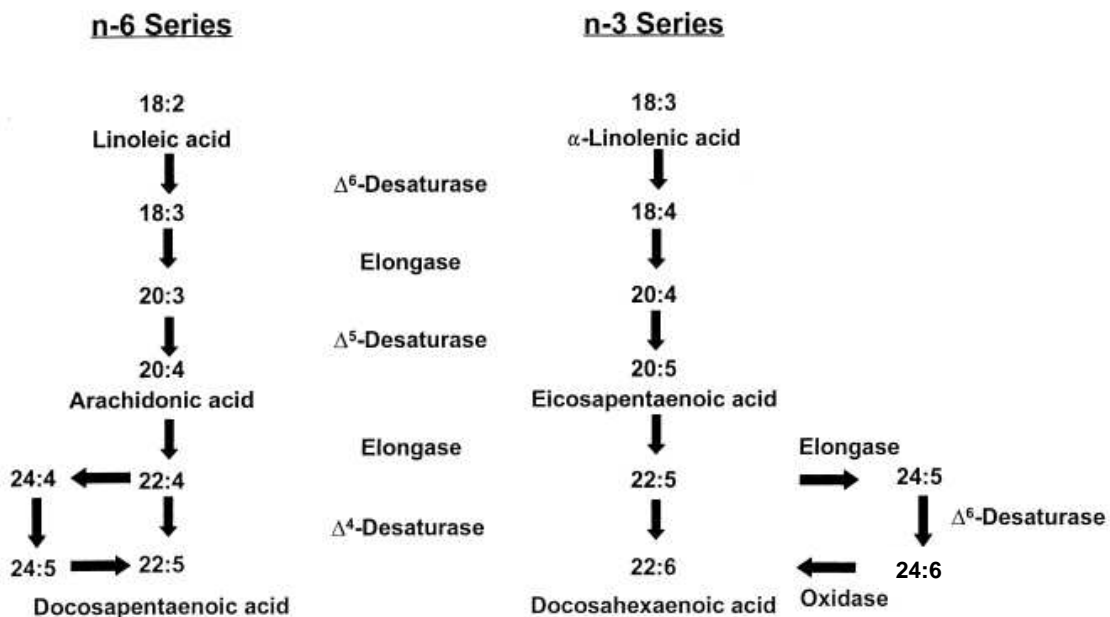


Figura 5. Rutas metabólicas del ácido linoleico (18:2n-6) y α -linolénico (18:3n-3). De Lauritzen, L. et al., 2001 (4).

1.3 Ácidos grasos condicionalmente esenciales para el feto: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA).

En el feto, la capacidad biosintética de elongación y desaturación del hígado fetal es muy limitada debido a su inmadurez fisiológica, y resulta insuficiente para proveer la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que estos requieren (5). Teniendo en cuenta que la placenta carece de esta actividad Δ^5 - y Δ^6 - desaturasa para la conversión de los ácidos grasos esenciales a LCPUFA (6), las necesidades fetales de LCPUFA deben ser cubiertas casi exclusivamente a través del suministro materno, siendo los LCPUFA considerados como nutrientes condicionalmente esenciales para el feto, que deben ser suministrados por la madre a través de la placenta durante la gestación.

Además, se sabe que el gradiente de concentración de ácidos grasos esenciales entre la madre y el feto aumenta continuamente durante el embarazo (7), y aunque la placenta tiene la capacidad de transferir NEFA en ambas direcciones (8;9), este gradiente conduce, generalmente, al transporte de ácidos grasos desde la madre al feto.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia omega-6 más importantes, derivados del linoleico (18:2 n-6, LA), son el ácido dihomo- γ -linoleico (20:3 n-6, DGLA) y el ácido araquidónico (20:4 n-6, AA). Estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son de gran importancia en el desarrollo neonatal, al ser precursores de la serie 2 de eicosanoides, que son moléculas proinflamatorias que participan en un amplio número de procesos fisiológicos (implantación del blastocito, inicio del parto, regulación hidroelectrolítica renal, agregación plaquetaria, activación del sistema inmune). Los alimentos de la dieta ricos en LCPUFA n-6 son fundamentalmente las carnes.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia omega-3 más relevantes, derivados del α -linolénico (18:3 n-3, ALA), son el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), los cuales, al igual que el araquidónico, tienen importantes funciones metabólicas y reguladoras. El ácido eicosapentaenoico, es precursor de la serie 3 de eicosanoides, de carácter antiagregante y antiinflamatorio (10-13). Los alimentos de la dieta ricos en LCPUFA n-3 son fundamentalmente los pescados, y sobre todo el pescado azul.

En la mujer gestante, los LCPUFA en sangre, pueden proceder de la actividad biosintética descrita anteriormente (elongación y desaturación de precursores), de las reservas tisulares de estos ácidos grasos (principalmente del tejido adiposo), y del aporte nutricional de LCPUFA en la dieta.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la administración directa de LCPUFA en la dieta, especialmente de la serie n-3, es más eficiente para aumentar los niveles de estos LCPUFA en el organismo que consumir su precursor, el ALA (14). El aumento de la actividad lipolítica en los depósitos de grasa maternos y lipogénica en el hígado, durante el tercer trimestre de gestación, son responsables del aumento de TG en las lipoproteínas de la circulación materna. Aunque las lipoproteínas no cruzan directamente la barrera placentaria, la hipertrigliceridemia en el embarazo juega un papel clave en la disponibilidad de ácidos grasos para el feto (7), y sobre todo en el aporte de LCPUFA al feto.

1.4 Metabolismo lipídico.

1.4.1 Digestión de los lípidos.

Aproximadamente el 95% de los lípidos de la dieta son triglicéridos (TG), el resto son fosfolípidos (PL), ácidos grasos libres o no esterificados (NEFA), colesterol (presente en la dieta en gran medida en forma de ésteres de colesterol (EC)) y vitaminas liposolubles.

La digestión químico-enzimática de los triglicéridos se inicia en la boca, gracias a una lipasa salival y continúa en el estómago gracias a la presencia de otra lipasa, en este caso de origen gástrico. Posteriormente, en el primer tercio del intestino, se completa la digestión de los triglicéridos, gracias al concurso de los ácidos biliares, el colesterol y los fosfolípidos que llegan con la bilis y que permiten modificar la fluidez y emulsionar los triglicéridos ingeridos para que, con el concurso del bicarbonato que tiene el jugo pancreático, se neutralice el pH y pueda actuar la lipasa pancreática. La digestión de los triglicéridos, en general no es completa, se liberan dos de los tres ácidos grasos y el que se encuentra en posición dos es muy difícil de liberar, por lo que nos queda aún un monoglicérido.

La digestión de los fosfolípidos se realiza en el intestino, gracias a la fosfolipasa pancreática que separa el ácido graso de la posición dos (generalmente el insaturado), dando lugar a un lisofosfolípido (liso-PL) y a un ácido graso libre (NEFA).

El colesterol de los alimentos se encuentra en parte esterificado, por lo que es necesaria la presencia de una colesterol esterasa pancreática para liberarlo y que pueda absorberse.

1.4.2 Absorción y transporte de lípidos.

Los productos de la digestión de los lípidos de carácter hidrosoluble, glicerol, fosfato, aminoalcoholes y ácidos grasos de cadena corta y media (hasta doce átomos de

carbono), siguen la vía porta y por tanto, van directamente al hígado.

Los restantes componentes, por su carácter insoluble, no pueden pasar como tales a la sangre, en donde ocasionarían graves trastornos circulatorios (como embolia grasa). Monoglicéridos, colesterol y ácidos grasos de cadena larga, una vez en el interior del enterocito, son utilizados para biosintetizar los quilomicrones (QM), una lipoproteína de gran tamaño y escasa densidad, que transporta triglicéridos y fosfolípidos resintetizados a partir de los productos absorbidos, colesterol libre y esterificado y apoproteínas sintetizadas por el propio enterocito. Estas grandes partículas presentan una relativa solubilidad en agua, y ello le permite su paso al medio interno que es fundamentalmente acuoso. Los QM son vertidos a la linfa, donde son transportados, y finalmente llegarán a la sangre lentamente.

En los capilares de los tejidos (principalmente tejido adiposo y músculo), la apoproteína C-II (apo C-II) de los quilomicrones (QM) activa la lipoproteína lipasa endotelial (LPL), anclada en los capilares de todos los territorios, para convertir el 90% de los triglicéridos de los QM, en ácidos grasos libres (NEFA) y glicerol, que son captados por las células de los tejidos para producir energía o ser almacenados, formando de nuevo triglicéridos. A medida que los triglicéridos van desapareciendo, los QM van perdiendo parte de la carga que transportan y se convierten en unas partículas denominadas remanentes de quilomicrones (Rm), los cuales llegan al hígado, donde son aclarados de la circulación en un proceso mediado por la apoproteína E (apo E).

En el hígado, se va a formar un nuevo tipo de lipoproteínas, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoproteins). Las VLDL contienen como todas, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas características sintetizadas por el hígado, entre las que destaca la apoproteína B-100 (apo B). Las VLDL contienen como los QM gran cantidad de triglicéridos; estos triglicéridos son de origen endógeno (hepático), mientras que los que transportan los quilomicrones son de origen exógeno (alimentario). También como en los QM, la apo C-II en la superficie de las VLDL activa la LPL para hidrolizar, de nuevo, los TG a NEFA y glicerol que son captados por las células.

A medida que los diferentes tejidos, incluyendo el hígado, van utilizando los ácidos grasos de los triglicéridos para cubrir sus necesidades de energía y para otras funciones, incluso para la síntesis de otras moléculas, las VLDL van perdiendo parte de su carga y se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermediate Density Lipoproteins), las cuales pueden seguir a partir de ahora dos caminos, por un lado pueden ser captadas por el hígado y éste sintetiza de nuevo VLDL, o bien pueden seguir perdiendo triglicéridos periféricamente y transformarse en un nuevo tipo de lipoproteínas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoproteins), que conservan apo B. Esta lipoproteína, que se ha formado periféricamente, realmente se ha empobrecido en triglicéridos y lo que transporta es colesterol.

Como mencionábamos, Las LDL, producto final del metabolismo de VLDL e IDL, son las lipoproteínas más ricas en colesterol. Son lipoproteínas pequeñas y pueden ser captadas por receptores específicos de los tejidos y a través de este mecanismo entrar al interior de las células, donde depositan el colesterol para las distintas funciones celulares, ya sean éstas estructurales, de permeabilidad o como precursor de otras moléculas.

Por último, en el hígado y en el intestino se sintetizan otro tipo de lipoproteínas, las lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoproteins), que van a los tejidos para retirar el exceso de colesterol. Este colesterol se dirigirá al hígado y será transformado en ácidos biliares y excretado con la bilis al intestino

En resumen, todas las lipoproteínas llevan los mismos componentes, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y las apoproteínas correspondientes, lo que varía de unas lipoproteínas a otras es la proporción de componentes que transportan (fundamentalmente la proporción de triglicéridos y colesterol). (Figura 7).

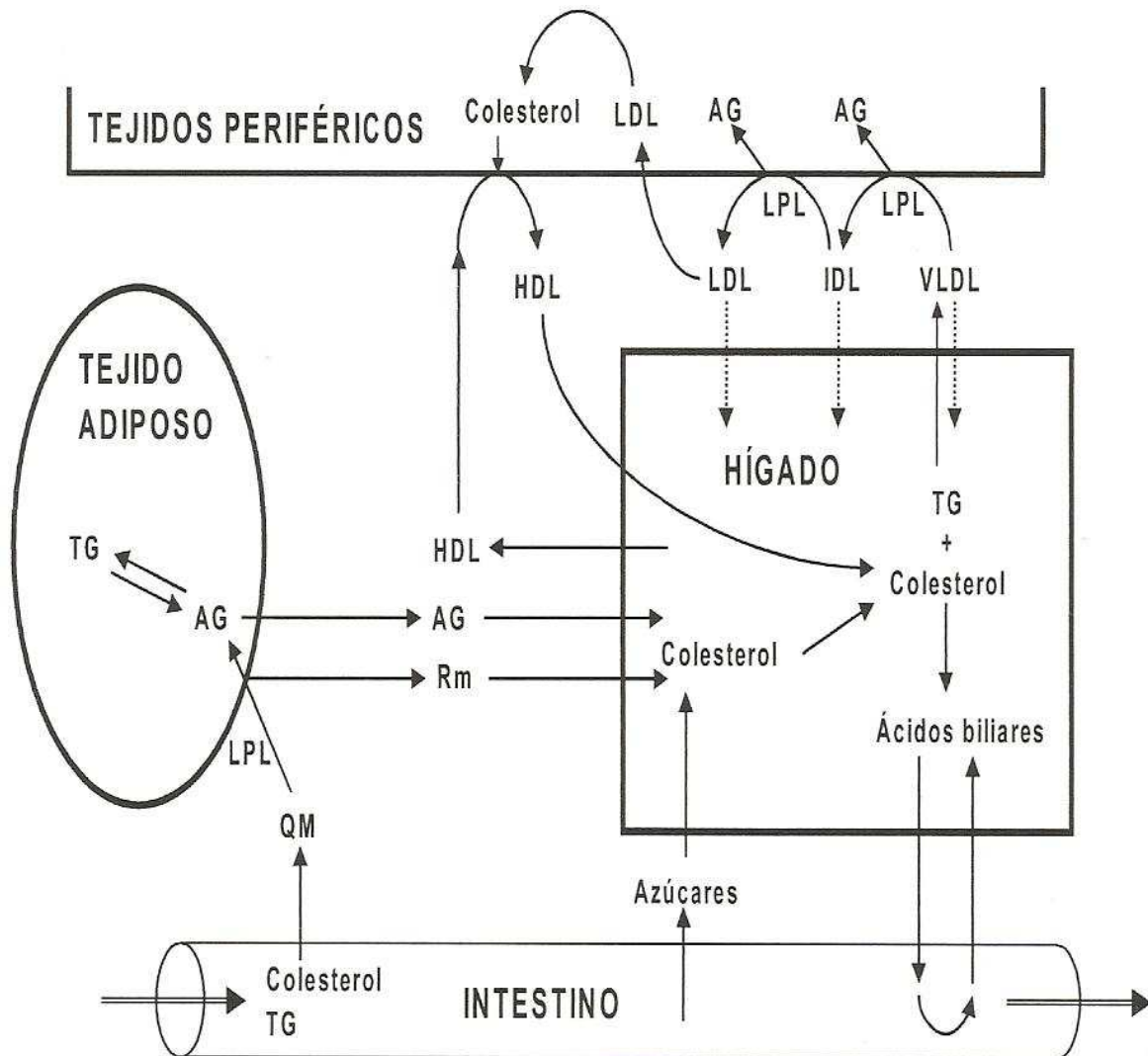


Figura 7. Metabolismo de las lipoproteínas. De Zamora, S. y Pérez-Llamas, F. (15).

1.4.3 Captación tisular de ácidos grasos.

El mecanismo mediante el cual los ácidos grasos atraviesan la membrana plasmática y entran en las células, ha sido debatido durante mucho tiempo. Debido a que los ácidos grasos son fundamentalmente lipofílicos, se propuso inicialmente que atravesaban la bicapa lipídica de forma pasiva sin intermediación proteica (flip-flop pasivo). Sin embargo, muchos órganos y tipos celulares, manifiestan un mecanismo de captación de ácidos grasos rápido, saturable, con especificidad de sustrato y regulación hormonal, que sugiere estar mediado por proteínas.

Aunque actualmente se acepta la combinación de ambos mecanismos para explicar el proceso de captación de ácidos grasos, durante los últimos años, todos los estudios señalan que la captación de lípidos en tejidos con elevado metabolismo o depósito lipídico, como músculo, hígado, corazón y tejido adiposo, está mediada por proteínas (16;17).

En general, se considera que la captación de ácidos grasos desde la circulación al interior de las células se produce según la siguiente secuencia (revisado por Doege, H. y Stahl, A. (16)):

- a) Producción local de ácidos grasos por las lipasas del lumen endotelial y unión de dichos ácidos grasos a la albúmina. Generalmente los ácidos grasos proceden de la hidrólisis de los triglicéridos (TG) contenidos en lipoproteínas ricas en TG como QM y VLDL, aunque también se pueden originar de la hidrólisis de fosfolípidos y ésteres de colesterol.
- b) Disociación de los ácidos grasos y la albúmina, seguido de la integración de los ácidos grasos en la bicapa lipídica o su unión a proteínas de la membrana plasmática.
- c) Transporte a través de la membrana.
- d) Asociación intracelular de los ácidos grasos con proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs, Fatty Acid Binding Proteins).

1.4.4 Transporte de ácidos grasos a través de la membrana.

Se han descrito numerosas proteínas envueltas en el proceso de transporte de ácidos grasos a través de la membrana, entre las que se incluyen FAT/CD36 (fatty acid translocase) (18), FABPpm (fatty acid binding protein plasma membrane) (19), ACBP (Acyl-CoA-binding proteins) (20), FATPs (fatty acid transport proteins) (21). Estas proteínas difieren ampliamente en su patrón de expresión en el cuerpo, así como en su localización subcelular. Además, a estas proteínas se suman los lipid rafts (ensamblados dinámicos de proteínas y lípidos), que también podrían ser importantes para el tráfico de entrada y salida de lípidos en las células (22).

1.4.5 Transporte intracelular de ácidos grasos.

Los ácidos grasos son transportados en el interior de la célula unidos a las proteínas citosólicas FABP (Fatty Acid Binding Proteins). Richieri *et al.* (23) estudiaron la afinidad de FABP por diferentes ácidos grasos y observaron que no presentaban afinidad por ninguno en particular, aunque sí describieron que la afinidad disminuía al disminuir la longitud de cadena y aumentaba al aumentar el número de dobles enlaces. Nueve FABP han sido identificadas en mamíferos, con diferentes patrones de expresión tisular; presentando funciones comunes y específicas (24). (Tabla 2).

Tabla 2. Familia FABP. Miembros con afinidad por ácidos grasos de cadena larga (25).

Tipo de FABP	Gen	Expresión
FABP1; LFABP; Liver FABP	Fabp1	Hígado, intestino delgado, riñón.
FABP2; IFABP; Intestine FABP	Fabp2	Intestino delgado.
FABP3; HFABP; Heart FABP	Fabp3	Músculo cardíaco y esquelético, cerebro, tejido mamario, riñón, adrenales, ovarios, testículos, placenta, pulmón, estómago.
FABP4; AFABP; Adipocyte FABP	Fabp4	Adipocitos, macrófagos.
FABP5; KFABP; Keratinocyte FABP	Fabp5	Epidermis, adipocitos, macrófagos, tejido mamario, lengua, testículo, hígado, pulmón, cerebro, corazón y músculo esquelético, retina, riñón.
FABP7; BFABP; Brain FABP	Fabp7	Sistema nervioso central, retina.
FABP8; MFABP; Myelin FABP	Fabp8	Nervio periférico mielinizado.
FABP9; TFABP; Testis FABP	Fabp9	Testículo.

Estudios sobre la estructura y función de las proteínas citosólicas FABP (Fatty Acid Binding Proteins) sugieren que la unión de estas proteínas a sus diferentes ligandos produce cambios sutiles en su conformación tridimensional que podrían promover interacciones específicas entre FABP-proteínas o FABP-membrana, lo que determinaría en

última instancia su función particular (24). En mamíferos se cree que, las FABP actúan en el compartimento intracelular mediante interacciones específicas con las organelas celulares, incluyendo retículo endoplasmático, mitocondria, peroxisomas y lipid droplets y actúan de forma coordinada con el transportador de membrana FAT (fatty acid translocase) y la lipasa sensible a hormona (HSL). Probablemente, las FABP funcionan en el núcleo transportando ligandos específicos, a los factores de transcripción nucleares, como el PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) (revisado por Storch *et al.* (25)).
 Figura 8.

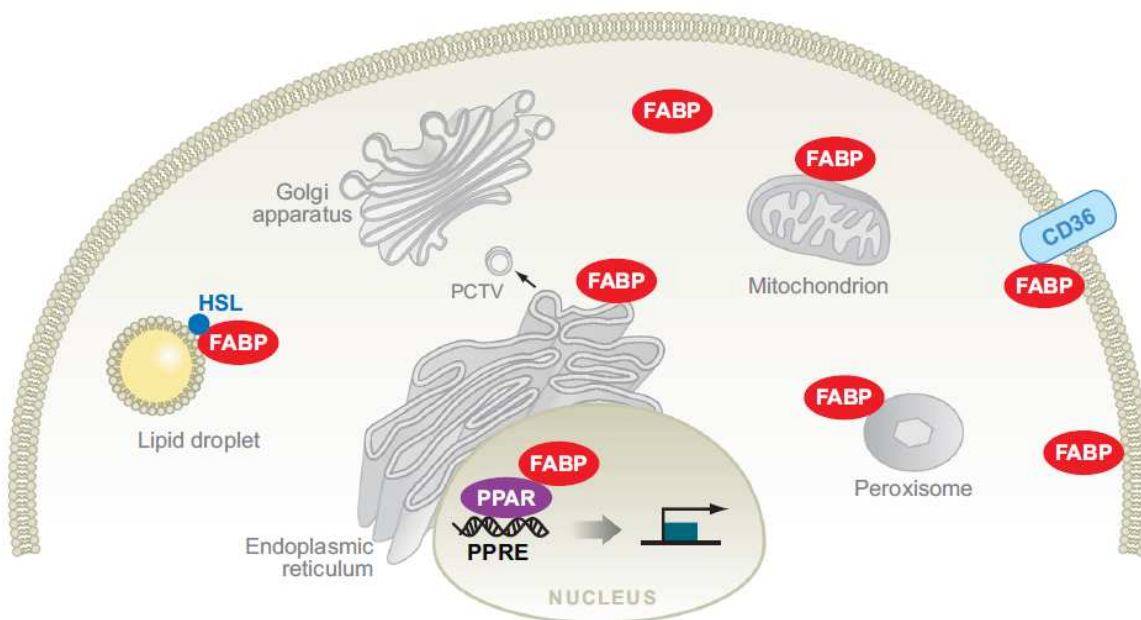


Figura 8. Funciones potenciales de FABP. De Storch, J. *et al* (25). HSL: Lipasa sensible a hormona, PCTV: prechylomicron transport vesicles, PPAR: peroxisome proliferator activated receptor.

1.4.6 Metabolismo intracelular de ácidos grasos.

En el interior celular, los ácidos grasos libres (NEFA) representan los componentes esenciales de todas las clases de lípidos, y regulan la expresión génica mediante acción directa o indirectamente actuando como ligandos de receptores nucleares; además, afectan

a la función proteica mediante acilación postranscripcional de péptidos diana y sobre todo, sirven como el sustrato energético de mayor densidad para la producción de ATP. Sin embargo, concentraciones celulares excesivas de NEFA son tóxicas para la célula y los tejidos. Para evitar esta toxicidad y con el propósito de almacenamiento energético, los NEFA son esterificados a un eje de glicerol para generar secuencialmente mono-, di- y triglicéridos que se depositan en vacuolas lipídicas (lipid droplets, LD) en todas las células del cuerpo. Cuando se necesitan, los ácidos grasos son liberados de las LD por acción de TG hidrolasas, proceso denominado lipólisis. Una cuidadosa regulación del balance lipídico de síntesis y lipólisis mantiene la homeostasis energética de todo el cuerpo (26).

a) Vacuolas lipídicas o Lipid Droplets (LD).

La estructura básica de las vacuolas lipídicas o lipid droplets, LD (revisado por Bickel *et al.* (27) es similar a la de las lipoproteínas: un núcleo hidrofóbico de lípidos neutros (TG y ésteres de colesterol), rodeado por una membrana monocapa de fosfolípidos asociada a proteínas de cubierta con función estructural, reguladora y enzimática. A pesar de que lipoproteínas y LD contribuyen al tráfico de lípidos neutros, sus funciones son diferentes. Las lipoproteínas participan en el tráfico lipídico extracelular y, cuando se encuentran intracelularmente, están contenidas por las membranas de las organelas, equivalentes a la membrana externa celular (28), mientras que las LD están confinadas al citoplasma donde median el almacenaje lipídico intracelular y su metabolismo. Junto a las membranas de doble capa, las vacuolas lipídicas representan uno de los dos principales reservorios intracelulares de ácidos grasos (29).

Las LD exhiben una marcada heterogeneidad en cuanto a tamaño, localización celular y composición de las proteínas de cubierta entre células y entre tejidos. Los avances recientes en el conocimiento de la función y formación de las LD enfatizan la importancia de las proteínas asociadas a las mismas. Tras el descubrimiento de las tres primeras: perilipina (con tres isoformas: A, B y C), adipofilinas o ADRP (adipocyte differentiation-related protein), y TIP47 (tail-interacting protein de 47 kDa), que compartían una secuencia similar (un dominio de 100 aminoácidos altamente conservado en el extremo amino

teminal de la perilipina, el “dominio PAT”), se agruparon en la denominada familia PAT (perilipina/Adipofilina/TIP47). Posteriormente, otras dos proteínas: S3-12 y OXPAT (oxidative tissues-enriched PAT protein), también llamada MLDP (myocardial lipid droplet protein) o LSDP5 (lipid storage droplet protein 5), se agregaron a la familia en humanos y ratones y es muy probable que en un futuro, nuevos complejos proteicos involucrados en el metabolismo lipídico celular, aún sin descubrir, se sumen a la familia PAT.

Cada miembro de la familia PAT difiere entre sí en tamaño, expresión tisular, afinidad por las LD, estabilidad en citosol y regulación transcripcional. Conceptualmente las proteínas PAT se dividen en aquellas cuya expresión se restringe a determinados tejidos (perilipina, S3-12 y OXPAT) versus aquellas que son ubicuas (adipofilina y TIP47); también se clasifican en base a si están unidas constitutivamente a las LD (perilipina, adipofilina) versus aquellas que pueden presentarse o no asociadas a las mismas (TIP47, S3-12, y OXPAT). Estas diferencias implican que cada proteína PAT tiene diferentes funciones celulares, aunque probablemente todas regulan la interfase entre las LD y el ambiente celular que las rodea.

Estas proteínas PAT protegen los lípidos neutros almacenados de la hidrólisis incontrolada por parte de las lipasas citoplasmáticas. Se sabe que solamente la perilipina, entre las proteínas PAT de mamíferos, cambia de actividad en función de si ha sido fosforilada por la proteína kinasa A (PKA). En estado basal, las perilipinas inhiben la hidrólisis de TG en los adipocitos. Sin embargo, cuando serinas específicas de la misma se encuentran fosforiladas, promueven la lipólisis. En los últimos años, el descubrimiento de interacciones proteína-proteína entre perilipina A y las lipasas ATGL (adipose triglyceride lipase, lipasa adiposa de triglicéridos) y HSL (hormone-sensitive lipase, lipasa sensible a hormona), así como el activador de ATGL CGI-58 (Comparative Gene Identification-58), han proporcionado pistas de cómo perilipina podría organizar la lipólisis, aunque los mecanismos exactos permanecen sin dilucidar. Por otra parte, adipofilina podría actuar fundamentalmente impidiendo la asociación de lipasas a las vacuolas lipídicas dificultando la lipólisis, aunque la regulación de este mecanismo permanece sin esclarecer (27).

Es probable que se descubran nuevas funciones de las proteínas PAT envueltas en el movimiento de lípidos dentro de las células, análogo al papel de las apolipoproteínas en el movimiento de los lípidos entre células y tejidos. Recientes estudios han hallado en LD diferentes proteínas ciclasas GTPasas (Rab proteins), SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), proteínas motor y componentes de citoesqueleto, y se ha sugerido que podrían tener un papel activo en el tráfico de lípidos, en el movimiento de LD y en su fusión.

b) Lipólisis.

La evidencia actual sugiere que la hidrólisis de los TG en el interior celular se produce de forma secuencial envolviendo diferentes lipasas. Las principales enzimas que catabolizan TG son ATGL (lipasa adiposa de triglicéridos) y HSL (lipasa sensible a hormonas). (Revisado por Zimmermann, R. *et al* (26)).

ATGL actúa selectivamente en el primer paso de hidrólisis de TG, resultando en la formación de un diglicérido y un ácido graso libre. La actividad específica frente a TG es 10 veces superior que frente a diglicéridos y esencialmente la enzima no presenta actividad hidrolítica frente a otros sustratos lipídicos como colesterol éster o retinil éster. Además ATGL presenta actividad fosfolipasa y transacilasa cuya importancia fisiológica se desconoce.

HSL es una enzima que se encuentra en el interior celular y se activa en situaciones de demanda energética. La HSL responde a numerosas señales, su activación es provocada a través de diversas vías que conducen a un aumento del AMPc, entre las que destacan las catecolaminas, la hormona del crecimiento, la serotonina y el glucagón; mientras que la insulina provoca su inactivación por desfosforilación. HSL muestra una amplia especificidad de sustrato, siendo capaz de hidrolizar ésteres de colesterol, tri-, di- y monoglicéridos, retinil éster y numerosos sustratos éster solubles en agua. La enzima es más activa frente a diglicéridos, a los que hidroliza 10 veces más rápido que a los TG. Su fosforilación por parte de la protein kinasa A (PKA), AMPK y MAPK representa un paso

crítico en la regulación de la lipólisis inducida por hormonas en el tejido adiposo. Además, la perilipina también juega un papel central en la regulación de la actividad HSL.

El último paso de la lipólisis es realizado por la monoglicérido lipasa (MGL), que hidroliza monoglicéridos para formar glicerol y liberar un ácido graso. No existe evidencia hasta el momento de que la actividad MGL se afecte por la estimulación hormonal (30), contrariamente a ATGL y HSL, cuya actividad parece estrechamente regulada por hormonas.

1.5 Metabolismo lipídico materno durante el embarazo.

La glucosa es cuantitativamente el nutriente más importante transferido al feto durante el embarazo, seguido de los aminoácidos. Sin embargo, aunque los lípidos que cruzan la placenta son menos importantes cuantitativamente, juegan un papel crucial en el desarrollo fetal.

Durante el embarazo la madre debe adaptar su metabolismo para mantener las demandas nutricionales del feto. Durante los dos primeros trimestres de embarazo, el metabolismo lipídico materno es fundamentalmente anabólico, lo que permite la acumulación de los lípidos en los depósitos grasos y la ganancia neta de peso. Durante este periodo se ha descrito un incremento en la actividad lipoproteína lipasa y en consecuencia, los triglicéridos de las lipoproteínas plasmáticas son hidrolizados y los productos de esta hidrólisis captados por el tejido adiposo. Este aumento de la actividad lipoproteína lipasa, durante el primer trimestre de gestación, junto al incremento de la lipogénesis, conduce al almacenamiento de los LCPUFA de la dieta, en el tejido adiposo materno. Durante el último trimestre de gestación, el metabolismo lipídico materno cambia, haciéndose fundamentalmente catabólico, caracterizándose por una hidrólisis acelerada de los depósitos grasos, que coincide con el periodo de máximo crecimiento fetal. El incremento de la actividad lipolítica durante el último trimestre de gestación, contribuye a la hiperlipemia observada en las gestantes normales, al final del embarazo.

Los productos resultantes de la hidrólisis acelerada del tejido adiposo: ácidos grasos libres y glicerol, son conducidos al hígado materno donde pueden ser utilizados para la síntesis de triglicéridos o como sustratos energéticos para mantener el metabolismo materno y fetal. Además, el glicerol puede ser utilizado para la síntesis de glucosa y los ácidos grasos libres para la síntesis de cuerpos cetónicos, tras su β -oxidación. Estas rutas metabólicas se acentúan en el hígado materno, en situaciones de deprivación, garantizando que los aminoácidos se utilicen para el crecimiento del feto, en lugar de como sustratos de la gluconeogénesis.

La hiperlipemia del final de la gestación corresponde principalmente a un aumento en la concentración de triglicéridos plasmáticos, con un pequeño aumento de los fosfolípidos y el colesterol. En el plasma, los NEFA aumentan en el mismo periodo de gestación, sin embargo, su contenido en LCPUFA en comparación con el resto de fracciones lipídicas es insignificante. La hipertrigliceridemia del tercer trimestre de gestación se debe a un aumento de la producción hepática de triglicéridos, junto al descenso de su eliminación plasmática, debido a una disminución de la actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo. Los triglicéridos sintetizados son una de las principales fuentes de ácidos grasos esenciales para el feto y son liberados a la circulación materna desde el hígado como VLDL. Además, otras lipoproteínas, como LDL y HDL, que normalmente transportan triglicéridos en una pequeña proporción, como resultado de un incremento en la actividad de la proteína colesterol éster transferasa y un descenso de la actividad de la lipasa hepática, incrementan su contenido en triglicéridos.

Se ha propuesto que estos cambios, que ocurren durante el embarazo, se regulan principalmente mediante dos mecanismos: el incremento de los estrógenos y el incremento de los niveles de insulina junto a cambios de sensibilidad a la misma (31;32). Al inicio de la gestación se observa un incremento de la actividad insulínica de la glucosa, secundario a la mayor actividad de las células β -pancreáticas. La lipogénesis a partir de la glucosa es una ruta metabólica sensible a insulina y, por tanto, la hiperinsulinemia al inicio de la gestación podría contribuir al aumento de los depósitos grasos. Durante el último trimestre de gestación, se desarrolla una situación de insulinoresistencia, responsable del aumento de la actividad lipolítica y del descenso de la actividad lipoproteína lipasa del

tejido adiposo, que conducen a la liberación de las reservas de grasa, a pesar de la hiperinsulinemia materna. El aumento de la concentración de estrógenos durante el tercer trimestre de gestación, es el principal activador de la producción hepática de VLDL y el responsable del descenso de la actividad lipasa del hígado (32).

1.6 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA): Status materno durante el embarazo.

Numerosos estudios observacionales han descrito el comportamiento de los ácidos grasos en el plasma y en los eritrocitos, durante la gestación. En general, todos los estudios coinciden en que la cantidad total de ácidos grasos (mg/L) en eritrocitos y plasma materno aumenta durante el embarazo, lo que podría ser consecuencia directa de la hiperlipemia fisiológica durante la gestación (33-35). Si consideramos los ácidos grasos de forma individualizada, muestran un patrón similar e incrementan conforme avanza la gestación, aunque existen diferencias en la proporción en la que se elevan. Se ha descrito que el aumento máximo se produce en la cantidad de ácido docosahexaenoico (DHA) (36). Este incremento no se puede explicar sólo por la modificación de los hábitos dietéticos y la hipótesis más aceptada para explicarlo es el incremento en la movilización de DHA desde los depósitos del tejido adiposo materno, aunque no se puede excluir un incremento de la actividad de las enzimas envueltas en su síntesis. A pesar del incremento de la concentración absoluta de los ácidos grasos se ha observado, durante el embarazo, el descenso en los índices de status de los ácidos grasos esenciales y el DHA. Esta observación sugiere que el embarazo se asocia con una reducción del estatus en ácidos grasos esenciales y DHA y una posible depleción de los depósitos maternos de DHA (35;37;38).

Estudios desarrollados en diferentes centros, con poblaciones y características dietéticas y metabólicas diferentes muestran, un patrón de cambio similar en la composición de los ácidos grasos, durante la gestación. Por tanto, parece que los ácidos grasos presentan patrones evolutivos similares entre diferentes grupos étnicos y dietéticos,

durante el embarazo. Un estudio comparativo internacional mostró, diferencias significativas en el status de ácidos grasos entre cinco países, sin embargo, el patrón de cambio, a lo largo de la gestación, fue comparable entre las cinco poblaciones (34).

El patrón de ácidos grasos varía ampliamente entre las diferentes fracciones lipídicas del plasma materno, durante el embarazo. Se ha descrito que el DHA muestra un marcado enriquecimiento relativo en la fracción fosfatidilcolina, mientras que no se ha encontrado enriquecimiento en la fracción de los triglicéridos, durante la gestación. Por el contrario, las concentraciones del ácido α -linolénico (ALA) aumentan en los triglicéridos, pero no en la fracción fosfatidilcolina. Incrementos relativos en los ácidos grasos poliinsaturados n-6 (como el ácido linoleico), aunque menos marcados que aquellos descritos en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados n-3, han sido descritos en triglicéridos y fosfatidilcolina. En relación a la fracción de los NEFA, no se ha descrito una distribución diferencial de los ácidos grasos (39). La composición de los ácidos grasos de los ésteres de colesterol se ve menos influenciada por el embarazo que la composición de los fosfolípidos. La enzima lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT) utiliza el ácido graso en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina, generalmente ocupada por el ácido linoleico y, por tanto, el ácido graso predominante en los ésteres de colesterol. Sin embargo, cuando el araquidónico y el DHA se encuentran en la posición sn-2, LCAT utiliza el ácido graso en la posición sn-1, lo que explica la pequeña cantidad de DHA encontrada en los ésteres de colesterol (40).

Se ha demostrado que el status materno de LCPUFA depende significativamente del aporte dietético de estos ácidos grasos. Algunos estudios observacionales han examinado la relación entre la ingesta de ácidos grasos en la dieta y su concentración en el plasma o en los eritrocitos. En general, estos estudios no han observado correlación entre la composición de los ácidos grasos en plasma o en eritrocitos y la ingesta dietética de ácidos grasos saturados o monoinsaturados, probablemente porque estas dos clases de ácidos grasos se pueden sintetizar endógenamente desde los carbohidratos. La correlación más fuerte entre la ingesta dietética de ácidos grasos y su concentración en plasma o en eritrocitos, se ha observado siempre en los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (41-43). Las asociaciones entre la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-6 y sus niveles en plasma,

aunque presentes, han sido descritos de forma menos consistente (42-45). Sólo unos pocos estudios han sido desarrollados en mujeres gestantes. En general se ha descrito una buena correlación entre la ingesta dietética de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y su concentración en plasma y eritrocitos maternos, en el momento del parto (44-46).

En resumen, la disponibilidad de ácidos grasos al feto depende no sólo de la ingesta materna, sino de la adaptación metabólica fisiológica que ocurre durante la gestación y de la función de la placenta.

1.7 Transferencia placentaria de ácidos grasos.

La transferencia a través de la placenta de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es crucial para el desarrollo del feto, ya que ni la placenta ni el feto, poseen actividad desaturasa suficiente para sintetizar estos ácidos grasos (6), fundamentales para el desarrollo neurológico del niño.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma materno y del cordón umbilical.

	Fosfolípidos	
	Plasma materno	Plasma de cordón
Total SFA	47.10 (2.48)	49.93 (1.71)
Total MUFA	14.93 (2.69)	13.36 (2.24)
AA, C20:4n-6	7.68 (1.90)	16.14 (2.49)
Total n-6 LCPUFA	12.37 (2.16)	22.55 (2.56)
DHA, C22:6n-3	2.89 (0.99)	4.76 (1.70)
Total n-3 LC-PUFA	3.72 (1.24)	5.44 (3.57)

SFA, saturated fatty acids: ácidos grasos saturados. MUFA, mono unsaturated fatty acids: ácidos grasos monoinsaturados. Media (rango intercuartílico). De Berghaus *et al.* (47).

Numerosos estudios muestran que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) en los lípidos del plasma del cordón umbilical son superiores a los encontrados en los lípidos del plasma materno en el momento del nacimiento (47-50); sin embargo, el contenido de los ácidos grasos esenciales en plasma es inferior en el neonato que en la madre (Tabla 3). Este enriquecimiento selectivo de LCPUFA en la circulación fetal, en especial de AA y DHA, es conocido como “biomagnificación” (51), y apunta a la gran importancia que estos LCPUFA deben tener para el feto y al papel fundamental que la placenta debe ejercer para la transferencia de estos compuestos al feto.

Estudios experimentales *in vitro* y de perfusión señalan claramente que la placenta es capaz de transportar preferentemente LCPUFA a la circulación fetal. Haggarty, P. *et al*, utilizando placentas perfundidas, encontraron un transporte selectivo y preferencial de DHA (orden de preferencia docosaheptaenoico>araquidónico> α -linoleico>linoleico) (52), Campbell, F.M. *et al*, demostraron también *in vitro* usando células BeWo (derivadas de coriocarcinoma humano, que presentan propiedades morfológicas y bioquímicas similares a las del trofoblasto humano), una captación preferente de DHA (orden de captación docosaheptaenoico>araquidónico>linoleico>oleico) por las células placentarias (53).

Larqué, E. *et al*, administraron *in vivo* ácidos grasos marcados con ^{13}C , variante natural del carbono, a mujeres gestantes, cuatro horas antes de una cesárea electiva. El análisis del tejido placentario en el momento del nacimiento demostró una incorporación preferente del docosaheptaenoico (DHA) respecto a linoleico (LA), oleico (OA) y palmítico (PA); el ratio de la concentración de ^{13}C -DHA entre placenta/madre fue significativamente mayor para el ^{13}C -DHA que para los otros ácidos grasos. Sin embargo, este estudio no pudo demostrar una transferencia preferente del DHA a sangre fetal respecto al resto de ácidos grasos, sugiriendo que la transferencia placentaria de ácidos grasos a la circulación fetal necesita más de cuatro horas (54).

La placenta humana es de tipo hemocorial, donde la sangre materna entra al espacio intervilloso vía arterias espirales y fluye directamente entre los villi terminales sin que intervenga ninguna pared vascular materna. Dentro de la placenta humana, el sincitiotrofoblasto mantiene separada la circulación materna y fetal a la vez que permite el

intercambio de nutrientes. Este epitelio multinuclear de transporte deriva de células del citotrofoblasto mononucleares, que a su vez proceden del huevo fertilizado. El sincitiotrofoblasto se encuentra polarizado y presenta una membrana microvellosa (MVM, microvillous membrane) orientada hacia la sangre materna y una membrana basal orientada hacia la sangre fetal (figura 9).

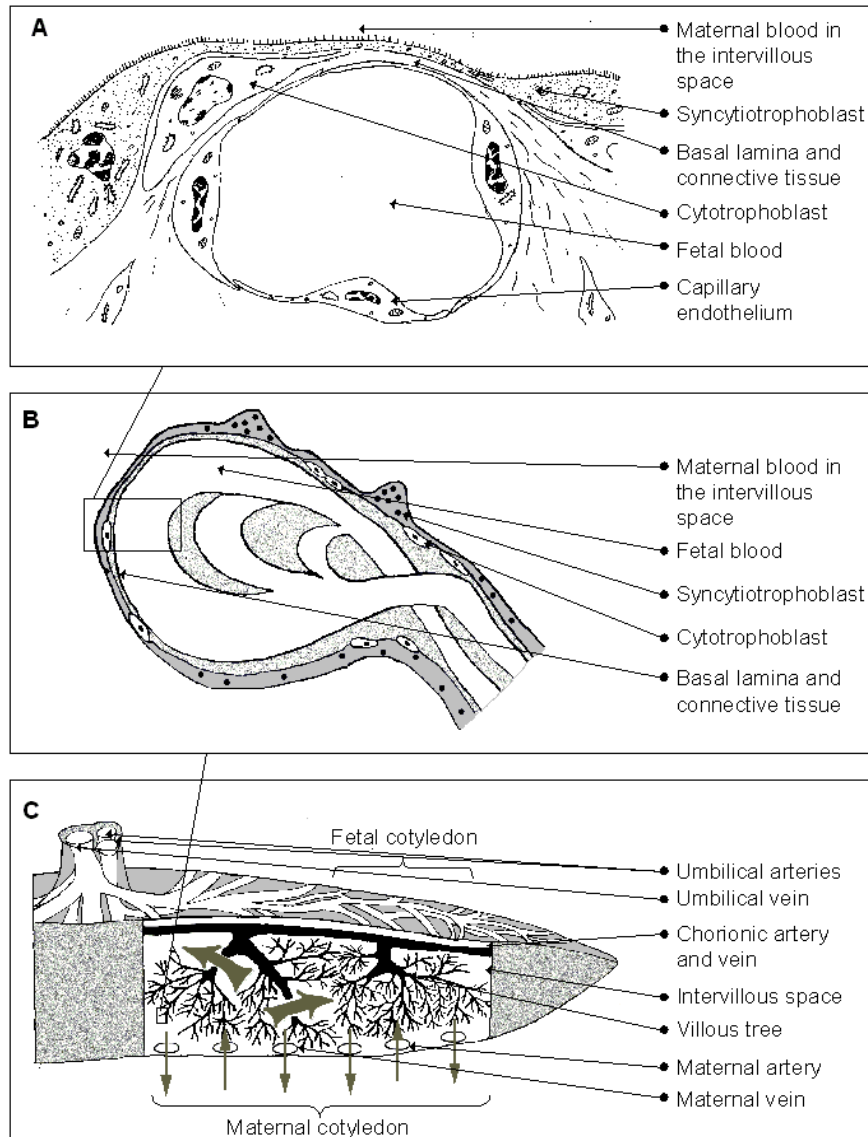


Figura 9. Estructura placentaria humana. De Ala-Kokko, T.I. et al (55). (A) Capas celulares que separan ambas circulaciones. (B) Estructura de la vellosidad terminal (villus terminal). (C) Representación esquemática del flujo sanguíneo en un cotiledón placentario humano. Las flechas indican el flujo sanguíneo materno.

La diferencia de concentración de los NEFA entre la circulación materna y fetal incrementa durante la gestación hasta el final de la misma, donde la concentración de

NEFA en la madre es aproximadamente tres veces la de la circulación fetal. Además, la concentración del transportador principal de los NEFA, la albúmina, es un 20-30% mayor en la circulación fetal, que en la materna, lo que aumenta el gradiente para el transporte de ácidos grasos de la madre al feto (56).

Si consideramos la secuencia de captación de ácidos grasos por los tejidos, la selectividad que demuestra la placenta por la incorporación de determinados ácidos grasos, puede ejercerse a nivel de: los receptores de lipoproteínas, las lipasas placentarias y la captación por las proteínas transportadoras de la membrana microvellositaria de los trofoblastos (57).

1.7.1 Captación de ácidos grasos por la placenta.

La placenta capta ácidos grasos en su forma libre, y por tanto, los ácidos grasos han de ser liberados desde las lipoproteínas para su transferencia placentaria. En la membrana microvillositaria de la placenta se han descrito la presencia de dos lipasas, que liberarían los ácidos grasos de las lipoproteínas: lipoprotein lipasa (LPL) y endotelial lipasa (EL) (figura 10).

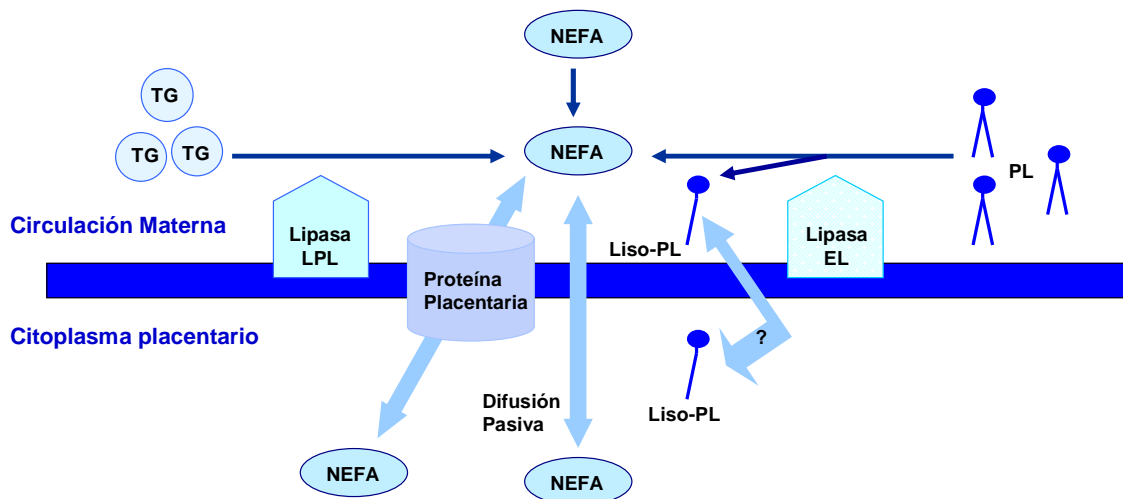


Figura 10. Captación placentaria de ácidos grasos. De Larqué, E. (58). TG: triglicéridos, NEFA: ácidos grasos libres, PL: fosfolípidos, Liso-PL: lisofosfolípidos, LPL: lipoprotein lipasa, EL: endotelial lipasa.

La enzima LPL se ha descrito clásicamente para el transporte placentario de ácidos grasos y es una enzima que se encuentra en la membrana microvillositaria placentaria en contacto con la sangre materna (59), trofoblastos y macrófagos aislados (60). La LPL presenta actividad triglicérido lipasa y es responsable de la hidrólisis de los TG del núcleo de los QM y VLDL, liberando dos ácidos grasos para su utilización tisular (figura 10). (61;62). Este es el mecanismo descrito en gran parte de la literatura para el transporte placentario de ácidos grasos.

La enzima EL, descrita en células del endotelio placentario, se ha demostrado recientemente en la membrana del sincitiotrofoblasto (63). La EL presenta casi exclusivamente actividad fosfolipasa A1, liberando el ácido graso esterificado en la posición 1 de los fosfolípidos y produciendo un lisofosfolípido; además posee una mínima actividad triglicérido lipasa (64). Ya que los ácidos grasos saturados se encuentran predominantemente en la posición sn-1 de los fosfolípidos (PL), mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son típicamente esterificados en la posición sn-2 (65), la actividad de EL podría producir liso-PL ricos en PUFA en el plasma materno, que podrían ser además una fuente adicional de ácidos grasos para la placenta. Así, diversos estudios describen que la liso-fosfatidilcolina podría representar un medio de transporte preferente respecto a los ácidos grasos libres (NEFA) para la incorporación de DHA en el cerebro (66;67). De igual forma, liso-fosfatidilcolina parece liberar DHA de forma más eficiente a los eritrocitos que los NEFA (68).

La endotelial lipasa (EL) es una enzima predominante en la placenta con independencia de la edad gestacional. Al final del embarazo, la EL continúa expresándose mientras que la LPL está virtualmente ausente en el trofoblasto. En los vasos placentarios, sin embargo, al final de la gestación se observa un incremento en la expresión de ambas (69).

Magnusson *et al.* (70) investigaron la actividad lipoproteína lipasa (LPL) placentaria en gestaciones normales en comparación con gestaciones complicadas con crecimiento intrauterino retardado (IUGR), diabetes mellitus insulín dependiente (IDDM) o diabetes gestacional (GDM). Este estudio demostraba significativamente que la actividad

LPL placentaria se encontraba reducida un 47% en IUGR pretérmino, mientras que en IDDM se encontraba aumentada un 39 % respecto a los controles. Lindegaard *et al.* (71) describieron que la actividad LPL placentaria se encontraba aumentada en gestaciones complicadas con IDDM en asociación con el sobrepeso fetal. Estos estudios apoyan, por tanto, la hipótesis de que alteraciones en LPL pueden contribuir a cambios en el transporte de los ácidos grasos al feto y modificar, en consecuencia, su crecimiento (70).

Otras lipasas implicadas en la hidrólisis de ácidos grasos esterificados son fosfolipasa A2 tipo II, que se expresa principalmente en placenta y coriodecidua (72) y TG hidrolasa con pH óptimo 6.0, diferente a LPL, expresada en la membrana microvillositaria del sincitiotrofoblasto (73). Parte de la fosfolipasa A2 tipo II es secretada al compartimento extracelular donde es activa, pudiendo tener actividad fosfolipasa placentaria, no sólo intracelular, sino también extracelular (74). Así mismo, la placenta posee receptores para lipoproteínas (32;75), algunas lipoproteínas podrían sufrir endocitosis tras la unión a estos receptores, para proveer de colesterol a la placenta; este mismo mecanismo podría aportar ácidos grasos al tejido placentario, una vez liberadas por las lipasas intracelulares, aunque la relevancia de las mismas para el suministro de ácidos grasos a la placenta, es aún incierto.

1.7.2 Proteínas transportadoras de membrana placentarias.

Una vez liberados por las lipasas, los ácidos grasos libres (NEFA) entran a la célula a través de difusión pasiva o bien a través de un mecanismo más complejo y saturable, mediado por proteínas transportadoras. Las proteínas de membrana que parecen estar implicadas en el transporte placentario de ácidos grasos son: FABPpm (Fatty acid binding protein plasma membrane), p-FABPpm (placental plasma membrane fatty acid-binding protein), FAT/CD36 (fatty acid translocase) y FATP-1 a -6 (Fatty acid transport protein) con actividad acyl-CoA-sintetasa (76;77). Estas proteínas se encuentran localizadas en la membrana microvillositaria y en la basal del sincitiotrofoblasto, a excepción de p-FABPpm que se ha encontrado únicamente en la membrana microvillositaria (78). (Figura 11).

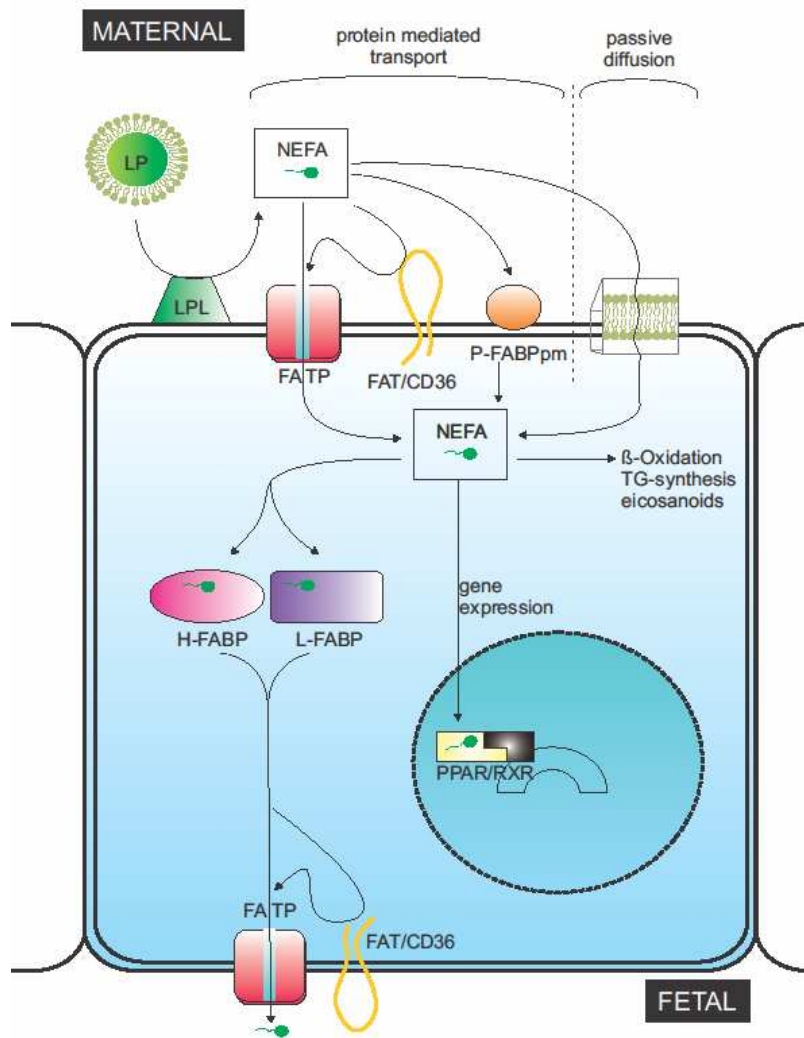


Figura 11. Modelo teórico de captación de ácidos grasos. De de Hanebutt, F.L. et al (77). LP: lipoproteína, LPL: lipoprotein lipasa, NEFA: non-esterified fatty acid, FATP: fatty acid transport protein, FAT: fatty acid translocase, P-FABPpm: placental plasma membrane fatty acid binding protein, L-FABP: liver-fatty acid binding protein (FABP1), H-FABP: heart-fatty acid binding proteína (FABP3), PPAR: peroxisome proliferator activated receptor, RXR: retinoid X receptor.

Aunque el papel de estas proteínas en la captación, metabolismo y transferencia de ácidos grasos por la placenta no se conoce por completo, se ha sugerido que el enriquecimiento de LCPUFA en la circulación fetal se consigue gracias a la compleja interacción de las mismas.

Utilizando células BeWo como modelo experimental de trofoblasto, se observó que al incubarlas con un anticuerpo para p-FABPpm se producía una reducción en la captación de docosahexaenoico (DHA) y araquidónico (AA) del 64% y 68%, respectivamente, mientras que la captación de oleico (OA) se reducía un 32% (53). Estos hallazgos sugieren que p-FABPpm está envuelta directamente en la captación de DHA y AA. No obstante, esta proteína p-FABPpm sólo ha podido ser demostrada por el grupo de Dutta-Roy y ni siquiera ha sido secuenciada genéticamente, lo que sugiere prudencia sobre la función e identificación de esta proteína en la placenta.

De las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) asociadas a las membranas expresadas en la placenta, las que parecen más implicadas en la captación selectiva de DHA son: FATP4 y p-FABPpm (78-80).

Las FATP (Fatty acid transport protein) son una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos (NEFA), constituida por 6 miembros que además presentan actividad acyl-coA sintetasa (Tabla 4). Así pues, las FATP podrían transportar los ácidos grasos y además catalizar la conversión de los NEFA a acyl-CoAs (81), facilitando su destino metabólico dentro de las células: esterificación en triglicéridos y fosfolípidos de membrana, su uso como sustratos de la β -oxidación y acilación proteica, y como ligandos de factores de transcripción. Tobin *et al.* (82) demostraron en células BeWo que la inhibición de la esterificación de los NEFA en acyl-CoAs puede modular, en parte, el grado de transporte de los ácidos grasos a través de estas células.

Tabla 4. Expresión de la familia de transportadores de membrana FATP.

Tipo de FATP	Intestino				Tejido		Locus genético humano	Referencias
	delgado	Corazón	Hígado	Músculo	adiposo	Placenta		
FATP-1	-	++	-	++	++	++	19p13.1	(21;83-85)
FATP-2	-	-	++	-	-	-	15q21.2	(21;85;86)
FATP-3	-	-	+	-	-	-	1q21.1	(85;86)
FATP-4	++	+	+	+	±	++	9q34	(85-87)
FATP-5	-	-	++	-	-	-	19q13.4	(85;86;88)
FATP-6	-	++	-	-	-	-	5q23	(85)

Larqué *et al.* (80) evaluaron en embarazadas la asociación entre la suplementación con DHA y la expresión en placenta de proteínas transportadoras, observando que la expresión génica de FATP1 y FATP4 en placenta, se correlacionaba directamente con el porcentaje de DHA en los fosfolípidos (PL) de placenta y sangre materna; además, la expresión de FATP4 se correlacionaba significativamente con el DHA de los PL en sangre fetal. Estos datos sugieren que FATP4 podría estar envuelta en el transporte selectivo placentario de DHA y por tanto de LCPUFA n-3 (80).

1.7.3 Transporte intracelular de ácidos grasos en la placenta.

Una vez que los ácidos grasos han sido transportados al citosol, son unidos a las proteínas de unión a ácidos grasos citosólicas (FABP, fatty acid binding proteins). En la placenta han sido descritas hasta el momento: FABP1 o L-FABP (Liver FABP), FABP3 o H-FABP (Heart FABP), FABP4 o A-FABP (Adipocyte FABP), FABP5 o K-FABP (Keratinocyte- FABP) y FABP7 o B-FABP (Brain FABP) (revisado por Cunningham, P. y McDermott, L. (79)).

Campbell *et al.* (89) describieron por primera vez L-FABP y H-FABP en sincitiotrofoblasto humano. Biron-Shental *et al.* (90) detectaron la expresión génica de L-FABP, H-FABP, A-FABP en trofoblasto primario humano y en tejido placentario. Sin embargo, en macrófagos se ha descrito la presencia de A-FABP (25), por tanto, resultaría interesante conocer en la placenta la localización de A-FABP (trofoblasto o macrófagos). En cuanto a la expresión de B-FABP en el trofoblasto, dos estudios publicados recientemente, comunican discrepancias en sus resultados (80;90).

Los ácidos grasos libres (NEFA) pueden ser además oxidados dentro del trofoblasto o bien ser reesterificados y depositados en forma de triglicéridos y otras fracciones lipídicas en la célula placentaria. Estos compuestos pueden sufrir posteriormente hidrólisis (lipólisis) y consecuentemente liberar ácidos grasos a la circulación fetal (52;91); el distinto procesamiento que sufren los ácidos grasos en el interior de la placenta también podría afectar su tasa de transferencia.

A diferencia de los adipocitos y monocitos, los trofoblastos no son células especializadas en acumular lípidos, por tanto, el papel de la familia PAT (adipofilina, perilipina) en el trofoblasto podría ser diferente al de otros tipos celulares. Entender la actividad de estas proteínas en la placenta podría ayudarnos a entender los mecanismos que regulan el transporte de ácidos grasos a través de la misma.

Bildirici *et al.* (92), mostró que la adipofilina se expresa en trofoblasto vellosos humano *in vivo* e *in vitro* tras el cultivo de trofoblasto humano primario, reduciendo los procesos de lipólisis. Además, encontró que la expresión de adipofilina está regulada por PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), una proteína que juega un papel crucial en el desarrollo de la unidad fetoplacentaria de roedores y en la diferenciación del trofoblasto humano (93;94). La ablación de PPAR γ se asocia con un reducido número de lipid droplets (LD) en la placenta de roedores (93), por lo que estos hallazgos sugieren que es necesaria la acumulación de los ácidos grasos en el trofoblasto, en LD, y que es regulada durante la diferenciación trofoblástica y el desarrollo placentario.

Tobin *et al.* (95) demostraron que los LCPUFA araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), son más eficientes para estimular la expresión de mRNA de adipofilina en células BeWo que los ácidos grasos de cadena más corta. De forma similar, Yamamoto, M. e Itabe, H. (96) describieron que la incubación de células BeWo con DHA, inducía la expresión de ADRP, al actuar como agonista endógeno del RXR, lo que significa que el DHA podría regular su destino metabólico intracelular, mediante el control de la expresión de estas proteínas.

Además, Tobin *et al.* (82) describieron que los diferentes destinos metabólicos de los ácidos grasos en el trofoblasto influyen en su transporte al feto. La incubación de células BeWo con OA dio como resultado una mayor acumulación en triglicéridos y una mayor formación de lipid droplets (LD) en el citosol, que su incubación con DHA, sin embargo, la transferencia relativa del DHA a través de la capa de células BeWo en comparación con OA fue cuatro veces superior para el DHA; de esta forma, la menor acumulación de DHA en las LD resultó en una mayor transferencia.

En cuanto a la regulación de la lipólisis en la placenta, Waterman *et al.* (59) identificaron en el citosol de placenta HSL (pH 6.0). Posteriormente Lindegaard *et al.* (71) encontró un aumento de la expresión del mRNA de HSL y EL en placentas de mujeres diabéticas, sugiriendo que la alteración de estas enzimas podría estar relacionada con las modificaciones que se producen en el transporte de ácidos grasos al feto en la diabetes. Hasta el momento, ATGL aún no ha sido identificada en placenta, aunque no descartamos su posible implicación en la regulación de la transferencia placentaria de ácidos grasos.

Por otro lado, Johnsen *et al.* (97) describieron en células BeWo que su incubación con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) (araquidónico, eicosapentaenoico y docosaheptanoico), modificaba la expresión genética de acyl-CoA sintetasas intracelulares, lo que sugiere que los LCPUFA podrían ejercer una importante función reguladora, sobre la captación de ácidos grasos por el trofoblasto, al modificar la expresión de estas proteínas. Estos mecanismos podrían además influenciar la biomagnificación de los LCPUFA respecto al resto de ácidos grasos.

1.7.4 Transporte de ácidos grasos a la circulación fetal.

El sistema más eficiente para transportar lípidos desde un tejido a la sangre es la formación y secreción de lipoproteínas que contengan apolipoproteína B (apoB). Estas lipoproteínas pueden contener grandes cantidades de triglicéridos y también servir como transportadores de lípidos esenciales como vitaminas liposolubles y glicolípidos (98). Madden, E.M. *et al.* (99) demostraron que la placenta humana es capaz de sintetizar y secretar apoB, así como una especie de lipoproteínas que podrían transportar lípidos hacia la circulación fetal. Sin embargo, la capacidad de secreción de lipoproteínas por la placenta es aún controvertida, y en la mayor parte de los estudios se indica que, la placenta transporta los ácidos grasos intracelulares a la circulación fetal, directamente mediante difusión facilitada o bien utilizando las proteínas transportadoras de lípidos (FAT/CD36 y FATP) situadas en la membrana basal del sincitiotrofoblasto (77).

Una vez en la circulación fetal, los ácidos grasos se unen a la α -fetoproteína y son captados por el hígado donde son esterificados y liberados a la circulación fetal como triglicéridos. Existe evidencia de que los ácidos grasos esterificados en la circulación fetal no pueden ser recaptados por la placenta. Por tanto, otro posible mecanismo para la acumulación selectiva de ciertos LCPUFA en la circulación fetal, podría ser su incorporación preferente en lípidos esterificados en la placenta, antes de su transferencia al feto y/o su esterificación en el hígado fetal, quedando atrapados en la circulación fetal (56).

Además de su papel en la transferencia de ácidos grasos al feto, se cree que la placenta es capaz de modular su aporte de ácidos grasos en función de las demandas del feto. La placenta regula la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo materno mediante la secreción de leptina a la circulación materna y fetal, que estimula la lipólisis (56); pero al final de la gestación también se produce en la embarazada una situación de resistencia a la leptina.

1.7.5 Papel de Peroxisome-Proliferator-Activator-Receptor (PPAR) en la función placentaria.

El mecanismo exacto por el que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) influyen sobre el metabolismo lipídico celular aún no se conoce por completo. Se ha descrito que los PUFA median sus efectos a través de interacciones con factores de transcripción como los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) (100;101). Los PPAR son una familia de receptores esteroideos que actúan como factores de transcripción nuclear. La unión de un ligando al PPAR conduce a la heterodimerización del complejo PPAR-RXR (receptor X retinoide) y, subsecuentemente, la unión de este complejo al PPRE (peroxisome proliferator response element) del gen diana, lo que conduce a la activación u inhibición de su transcripción (102).

El papel del PPAR en el metabolismo placentario, especialmente en la homeostasis lipídica placentaria, ha sido estudiado extensamente. Hasta el momento se conocen tres subtipos de PPAR: PPAR- α , PPAR- γ y PPAR- δ , críticos para el desarrollo placentario y la

regulación de sus funciones fisiológicas (103). Barack *et al.* señalaron el papel indispensable del PPAR en el desarrollo placentario tras generar un ratón con deficiencia en PPAR- γ y estudiar las consecuencias de la pérdida de su función en la placenta (93). En placenta humana se ha mostrado que PPAR- γ está envuelto en la invasión del trofoblasto y que PPAR- γ y PPAR- δ son importantes para su diferenciación y maduración (94;104;105). La importancia de PPAR- α en la biología de la placenta es relativamente menor que la de PPAR- γ y PPAR- δ , aunque son necesarios más estudios para entender su papel en la unidad feto-placentaria (106).

Los PPAR también parecen estar envueltos en la captación y transporte de ácidos grasos mediante la modulación de la expresión de las proteínas transportadoras. Shaiff *et al.*, describieron que PPAR- γ y RXR regulan el transporte de ácidos grasos en el trofoblasto primario humano. El tratamiento del trofoblasto humano con agonistas de PPAR- γ y RXR (LG268 + GW1929) resultaba en una elevación de la expresión de ADRP y de las proteínas transportadoras de ácidos grasos FATP-1 y FATP-4, pero no FATP-2,3 y 6 mRNA en estas células (107). Este grupo obtuvo resultados similares *in vivo* utilizando rosiglitazone (agonista PPAR- γ), describiendo también un aumento en la expresión placentaria de FABPpm y FAT/CD36 (108). Estos hallazgos señalan que el heterodímero PPAR/RXR podría tener un papel especial en la regulación de la captación específica de LCPUFA en la placenta.

Además, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, parece que la captación de ácidos grasos en la placenta no está regulada vía insulina (109), lo que sugiere que PPAR/RXR juegan un importante papel en el control del transporte placentario de ácidos grasos.

Mata de Urquiza *et al.* (110) publicaron en la revista Science en el año 2000 que el DHA, actúa en el cerebro como un activador potentísimo del RXR. Estos datos sugieren que, el DHA podría modular funciones neuronales a través de la activación de las vías de transducción de señales mediadas por RXR. Además el DHA podría modular la expresión de transportadores de ácidos grasos, vía activación del PPAR-RXR en la placenta, cerebro, o cualquier tejido.

1.8 Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) para el feto.

Las etapas más críticas en la formación de la estructura del encéfalo humano, ocurren durante el último trimestre de gestación y continúan hasta los dos años después del nacimiento (111). Esta morfogénesis está íntimamente asociada a la función del cerebro y requiere de un extraordinario aporte de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA), particularmente de araquidónico y docosahexaenoico. En consecuencia, los efectos adversos de una inadecuada transferencia de LCPUFA al feto, desde la madre, en este periodo del desarrollo, podrían resultar más difíciles de superar que los ocurridos por una inadecuada ingesta en etapas posteriores (112).

El cerebro es un tejido principalmente lipídico, en el que un 60% de su peso seco está constituido por lípidos; de ellos, un 40% son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA), y de estos un 10% es araquidónico (AA) y un 15% docosahexaenoico (DHA) (113). Es además un órgano con gran número de estructuras con membranas. El AA y el DHA en gran medida ejercen sus funciones metabólicas, formando parte de la estructura de los fosfolípidos (PL) de las membranas celulares, particularmente de la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS). Por su alto grado de instauración, los fosfolípidos ricos en LCPUFA, aportan gran fluidez a las membranas en las que son incorporados. La fluidez de las membranas parece particularmente importante en la formación del tejido nervioso y cerebro (13;114;115) al ser esencial para que las proteínas de membrana (canales iónicos, receptores, uniones comunicantes, receptores catalíticos, enzimas, estructuras formadoras de vesículas, etc) puedan tener la movilidad que requieren sus funciones, ya sea en la superficie de las membranas o en el interior de la bicapa lipídica.

El ácido docosahexaenoico (DHA) presenta, en comparación con otros ácidos grasos esenciales, una distribución tisular más específica en el sistema nervioso central, lo que apoya su importante papel en el desarrollo neuronal y visual de los recién nacidos (4;116). Como mencionábamos, el DHA es un componente principal de los fosfolípidos de las membranas celulares, y en el cerebro constituye el 7.2 % de su composición y en retina

el 19.7 % (117;118); dentro de estos, el DHA es particularmente abundante en los bastones de la retina (119;120) y en la sustancia gris, especialmente en la membrana sináptica (116;121;122).

La cantidad total de ácido docosahexaenoico (DHA) en el cerebro aumenta de forma dramática durante la fase de desarrollo cerebral rápido, desde el principio del tercer trimestre hasta los 18 meses de vida, con un pico alrededor del momento del nacimiento (123), no sólo por el aumento de tamaño cerebral, sino también por un aumento en su concentración relativa. Clandinin et al., estimaron que la acumulación prenatal de DHA en el cerebro humano es de aproximadamente 15-22 mg/semana durante el tercer trimestre (124;125), lo que señala la importancia de este ácido graso en el desarrollo fetal.

La concentración de DHA en plasma fetal resulta 8-20 veces más efectiva como sustrato para la acumulación de DHA en el cerebro de fetos de babuino que la de su precursor, el ácido α -linolénico (126). Algunos estudios describen que los recién nacidos prematuros, presentan niveles más bajos de DHA en sangre debido a la interrupción precoz de su transferencia placentaria, que se correlaciona con un funcionamiento anormal de la retina y de las funciones corticales (evaluado mediante electroretinograma, potenciales visuales corticales evocados y test de agudeza visual) (5;127;128). Además, en primates con menor cúmulo de DHA en tejido cerebral, se observan más deficiencias en la función retiniana y comportamientos estereotipados, que en controles (129;130).

Los estudios realizados por diferentes grupos muestran, además, que existe una relación directa entre los niveles de LCPUFA en eritrocitos (como estimación del estatus nutricional de estos ácidos grasos) y en plasma, con la agudeza visual y la respuesta a potenciales evocados en los lactantes (131;132). Algunos investigadores han propuesto que un aporte adecuado de LCPUFA durante el período perinatal puede tener repercusiones en la inteligencia y el desarrollo intelectual del individuo en la edad adulta, así como una disminución de su morbilidad (133).

Helland, I.B. *et al.* desarrolló en Noruega un estudio randomizado, doble ciego, controlado con placebo, en mujeres gestantes que recibían desde la semana 17-19 de

gestación hasta 3 meses después del parto, 10 ml de aceite de bacalao, que proporcionaba 1g/día de DHA. Los neonatos que presentaban un test electroencefalográfico (EEG) maduro al segundo día de vida, presentaban mayores concentraciones de DHA en los PL del plasma umbilical que aquellos neonatos con un EEG inmaduro, a favor de una asociación entre la concentración de DHA y la madurez cerebral del recién nacido (134). No obstante, no se observaron diferencias en el resultado EEG a los tres meses, ni en el test de Fagan a los seis y nueve meses de edad (como indicador de la función cognitiva infantil) (134). Sin embargo, a la edad de cuatro años, los niños de las madres que habían recibido aceite de bacalao (n-3 LCPUFA) durante el embarazo y la lactancia, presentaban coeficientes de inteligencia superiores, evaluados mediante el test K-ABC (Kaufman Assessment Battery for Children) (127). Colombo, J. *et al.* (135) describieron también en un estudio longitudinal, que los niños cuyas madres presentaban al nacimiento niveles superiores de DHA en sus eritrocitos, mostraban durante los dos primeros años de vida más madurez en su perfil de desarrollo y un funcionamiento más óptimo, evaluado por su grado de atención y distraibilidad (135).

En el gran estudio de cohortes ALSPAC se registró la frecuencia de consumo de pescado durante el embarazo en 11875 mujeres, relacionada con la ingesta de n-3 LCPUFA (136). La frecuencia de consumo de pescado se categorizó en tres grupos: no consumo de pescado, consumo de 1-340g de pescado por semana y consumo de más de 340g de pescado semanal. El análisis de los resultados reveló, de forma significativa, que los niños cuyas madres habían consumido menos de 340g de pescado semanal estaban en el cuartil más bajo de inteligencia verbal a la edad de ocho años. También se asoció la baja ingesta de pescado durante el embarazo, con resultados subóptimos en habilidades motoras finas y en la puntuación de desarrollo social.

Por último, mencionar que el contenido de DHA en el cerebro del feto y del niño, se ve relativamente más afectado por la dieta materna que el contenido en ácido araquidónico (AA), lo que sugiere que la regulación metabólica endógena del contenido de AA es más efectiva (137).

En resumen, parece que existe una asociación entre el estatus de DHA en plasma materno o su ingesta durante el embarazo, y el desarrollo de las funciones cognitivas en el neonato y posteriormente en el niño.

Debido a las implicaciones del DHA sobre los resultados perinatales, la Comisión Europea elaboró en el 2007 un documento de consenso que recogía, entre otras, las siguientes recomendaciones: durante la gestación y la lactancia, las mujeres deben alcanzar una ingesta mínima de DHA de 200 mg/día; ingestas de hasta 1 g/día de DHA o de hasta 2.7g/día de n-3 LCPUFA, han sido usadas en ensayos clínicos randomizados sin efectos adversos significativos; las mujeres en edad fértil deberían consumir una o dos raciones de pescado a la semana, incluyendo pescado azul (138).



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El embarazo y los primeros meses de vida tras el parto suponen un periodo crítico en la formación y desarrollo del sistema nervioso central, que se caracteriza por una rápida acumulación de grasa, que supera de lejos la de otros nutrientes (118;124). Los ácidos grasos esenciales y sus derivados poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA), son vitales para la salud humana ya que, por un lado, desarrollan una importante función estructural en las membranas celulares, siendo imprescindibles en la formación de nuevos tejidos, y por otro, son precursores de moléculas con importante función biorreguladora (eicosanoides). Además, algunos estudios han mostrado que los niños nacidos de madres cuya dieta fue suplementada con LCPUFA presentaron, al evaluar su desarrollo mental y sensorial, puntuaciones superiores durante su seguimiento (134;139).

Los ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y ácido linolénico) no pueden ser sintetizados por el hombre y por tanto, deben ser consumidos en la dieta materna y transferidos al feto a través de la placenta. Por otro lado, la actividad de las enzimas responsables de la formación de los LCPUFA es nula en placenta y muy escasa en el feto (6), de forma que los LCPUFA se consideran nutrientes condicionalmente esenciales para el feto y deben ser igualmente transferidos desde la madre a través de la placenta.

Se desconoce hasta que punto la ingesta materna de los mismos puede afectar su transferencia placentaria al feto, por lo que investigar y conocer las vías de transferencia, así como los mecanismos que las regulan, resulta una cuestión clave en nutrición para entender la relación entre el metabolismo materno de los ácidos grasos, el aporte placentario al feto de EFA/LCPUFA y sus posibles consecuencias en el embarazo y el neonato.

Muy pocos aspectos del metabolismo y la suplementación dietética son de tanta importancia biológica como la alimentación de las madres durante el embarazo y la lactancia, así como la de sus recién nacidos y niños. Los factores nutricionales durante el desarrollo precoz no sólo tienen efectos a corto plazo en la fisiología, el crecimiento y la composición corporal, sino que también se asocian a efectos a largo plazo sobre la salud del individuo y el desarrollo de enfermedades en la edad adulta, fenómeno conocido como programación metabólica (140;141).

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue evaluar la tasa de transferencia placentaria de los distintos ácidos grasos marcados con isótopos estables en humanos y en condiciones *in vivo*.

Además, los objetivos secundarios fueron:

1. Evaluar los mecanismos implicados en el transporte de ácidos grasos a través de la placenta.
2. Describir el perfil de los ácidos grasos marcados en las distintas fracciones lipídicas de plasma materno, placenta y plasma fetal.
3. Estudiar la relación entre los ácidos grasos presentes en los distintos compartimentos fisiológicos durante la gestación.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental.

Para la realización del presente estudio se reclutaron 11 embarazadas a término que iban a ser sometidas a cesárea electiva en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité ético de dicho Hospital.

De las pacientes remitidas en el tercer trimestre de gestación a la Unidad de Medicina Materno Fetal del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, se reclutaron para el estudio aquellas que reunían las siguientes características:

- Gestación única.
- Edad comprendida entre 18 y 40 años
- Índice de masa corporal al inicio de la gestación entre 25 y 35 Kg/m².
- Dieta omnívora.
- Indicación de cesárea electiva por presentación de nalgas (8), miomectomía previa (2) o situación transversa (1).
- Biometría por ecografía y Doppler fetal, 24 horas antes de la cesárea, en el rango de referencia.
- Monitorización fetal, 24 horas antes de la cesárea, sin alteraciones.

Como criterios de exclusión, se establecieron:

- La presencia de problemas de salud antes o durante la gestación.
- Ser fumadora.
- Consumir suplementos de DHA durante el embarazo.

Tras una exhaustiva explicación del estudio y tras aclarar las dudas de las pacientes, se obtuvo por escrito su consentimiento.

El día previo a la cesárea se medía y pesaba a las participantes y, se monitorizaba la frecuencia cardiaca fetal. Además, se realizaba control ecográfico, recogiendo la biometría fetal y los índices de pulsatilidad (IP) y resistencia (IR) de arteria umbilical.

Las pacientes recibieron, doce horas antes de la cesárea, en un azucarillo, una dosis oral de ácidos grasos libres marcados uniformemente con carbono 13 (^{13}C) (Martek, Bioscience, Columbia, MD) compuesta por 0.5 mg/kg de peso corporal de ^{13}C -ácido palmítico (PA), 0.5 mg/kg de ^{13}C -ácido oléico (OA), 0.5 mg/kg de ^{13}C -ácido linoléico (LA) y 0.1 mg/kg de ^{13}C -ácido docosaexaenóico (DHA). Cinco sujetos recibieron el ^{13}C -DHA enriquecido al 100%, es decir, 0.1mg/kg de DHA con todos los carbonos marcados con ^{13}C y los seis restantes recibieron la dosis de ^{13}C -DHA enriquecido al 10%, es decir, 0.01mg/kg de DHA con todos los carbonos marcados con ^{13}C . Tras su ingesta permanecieron en ayunas (figura 12).

Debido a la alta sensibilidad del equipo de cromatografía de gases-combustión-espectrómetro de masas de isótopo ratio y la limitada masa del pool endógeno de ácidos grasos poliinsaturados de la familia $\omega 3/n-3$, en comparación con los ácidos grasos mayoritarios, la cantidad de ácidos grasos marcados ha sido testada para obtener resultados con ^{13}C -DHA débilmente enriquecido. La ventaja es disminuir el coste del compuesto y simplificar los problemas técnicos de la cromatografía de gases (142).

Se tomaron muestras de sangre de las pacientes previa administración de los ácidos grasos marcados (-12h/basal), así como tres horas (-3h) antes de la cesárea, dos horas (-2h), una hora (-1h), en el momento de la misma (0h) y una hora después (+1h). Tras el nacimiento se recogió sangre de arteria y vena umbilical, así como fragmentos de placenta (figura 12).

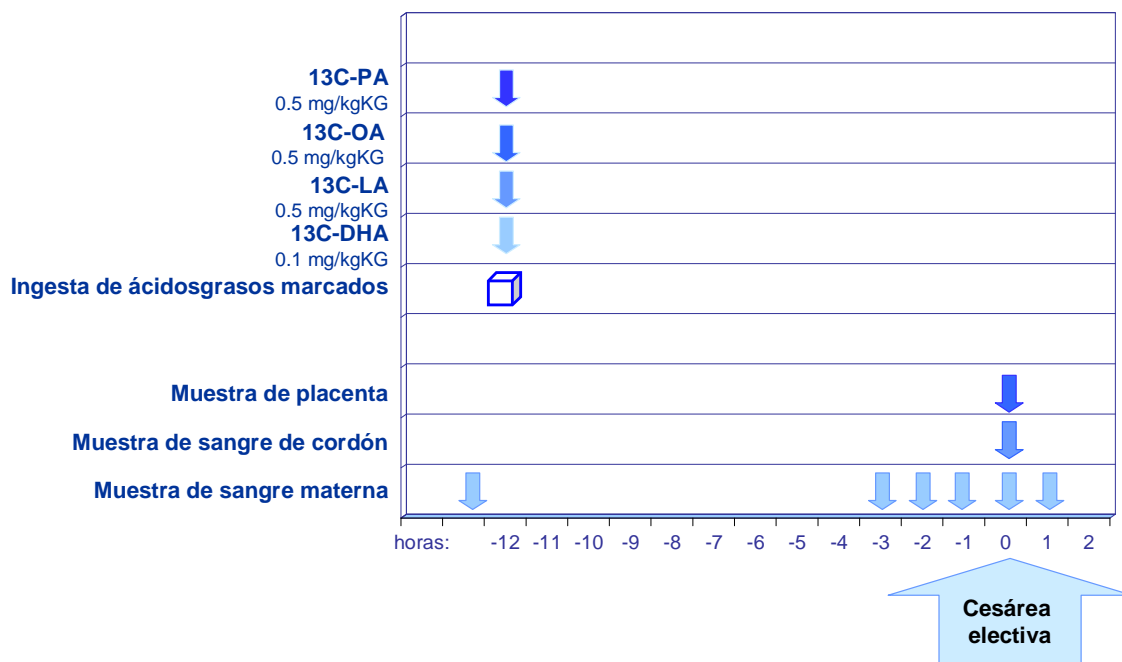


Figura 12. Protocolo de recogida de muestras.

3.2 Obtención de muestras.

Previamente a la administración de los ácidos grasos marcados (tiempo basal) se extrajo mediante venoclisis una muestra de 8ml de sangre. En las tomas realizadas a -3h, -2h, -1h, 0h y +1h respecto a la cesárea, se extrajeron sin embargo, sólo 3ml de sangre de las pacientes. Tras el alumbramiento placentario se recogió en una jeringa de gases una pequeña muestra de sangre de arteria y vena umbilical para el análisis del pH fetal. Asimismo se extrajo aproximadamente 3 ml de sangre de vena y 2 ml de sangre de arteria umbilical.

Las muestras de sangre fueron inmediatamente centrifugadas a 1500 g durante 10min, para obtener el plasma, que fue almacenado a -80°C hasta posterior extracción lipídica y análisis de los ácidos grasos marcados.

De la muestra extraída a las -12h, 4ml fueron remitidos al Laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, en un tubo seco, para

determinar la concentración de triglicéridos, HDL y LDL colesterol, colesterol total y albúmina, mediante kits comerciales (Roche, Barcelona).

Tras pesar la totalidad de la placenta, se cortaron dos fragmentos de su zona central de 2 x 2 cm que se lavaron con solución de ClNa 0.9% hasta eliminar los restos de sangre. Las muestras obtenidas de placenta se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para evitar la acción de las fosfolipasas placentarias, y se almacenaron a -80°C hasta posterior análisis de los ácidos grasos.

3.3 Técnicas analíticas.

3.3.1 Extracción de los lípidos del plasma.

Para la extracción de los lípidos del plasma se empleó el método de Folch et al., (1957) (143) con ligeras modificaciones. Se tomaron 250 µl de plasma, a los que se adicionó 100 µl de estándar interno (5.04 mg de ácido pentadecaenoico, 5.22 mg de ácido tripentadecaenoico, 12.38 mg de ácido colesterilpentadecaenoico y 7.28 mg de dipentadecanoil-fosfocolina en 50 ml de cloroformo/metanol 35:15 (v/v) + 100 mg BHT g/l), 100 ml de metanol:cloroformo 35:15 + BHT (100 mg/50ml). A ello se sumó 10 ml de una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y 2.5 ml de agua destilada. Con la ayuda de un agitador de tubos (vórtex), en 15 min se agitó tres veces y se centrifugó 7 min a 1500 g y 25°C.

La mezcla se separó en dos fases entre las que se visualizaba una capa de proteínas precipitadas (figura 13A). La fase superior o hidroalcohólica se desechó con ayuda de una pipeta Pasteur (figura 13B). A la fase inferior o clorofórmica, junto a la capa proteica, se le adicionó 2.5 ml de metanol y 2.5 ml de solución de NaCl al 2%. Esta segunda extracción, al igual que la primera, se facilitó por la agitación de la mezcla tres veces, durante 30sg, en 15 min (a intervalos de cinco minutos), tras los cuales se centrifuga a 1500 g, 7 min a 4°C, recogién dose de nuevo la fase inferior clorofórmica con ayuda de una pipeta Pasteur (figura 13C).

Se repitió una tercera extracción, igual a la segunda y tras recoger la fase clorofórmica, se concentró con ayuda de un rotavapor a 37° (figura 13D). Finalmente, el residuo resultante, se resuspendió en 400 μ l de Cloroformo/Metanol 1:1 (v/v) para el análisis de las fracciones lipídicas por cromatografía en capa fina.

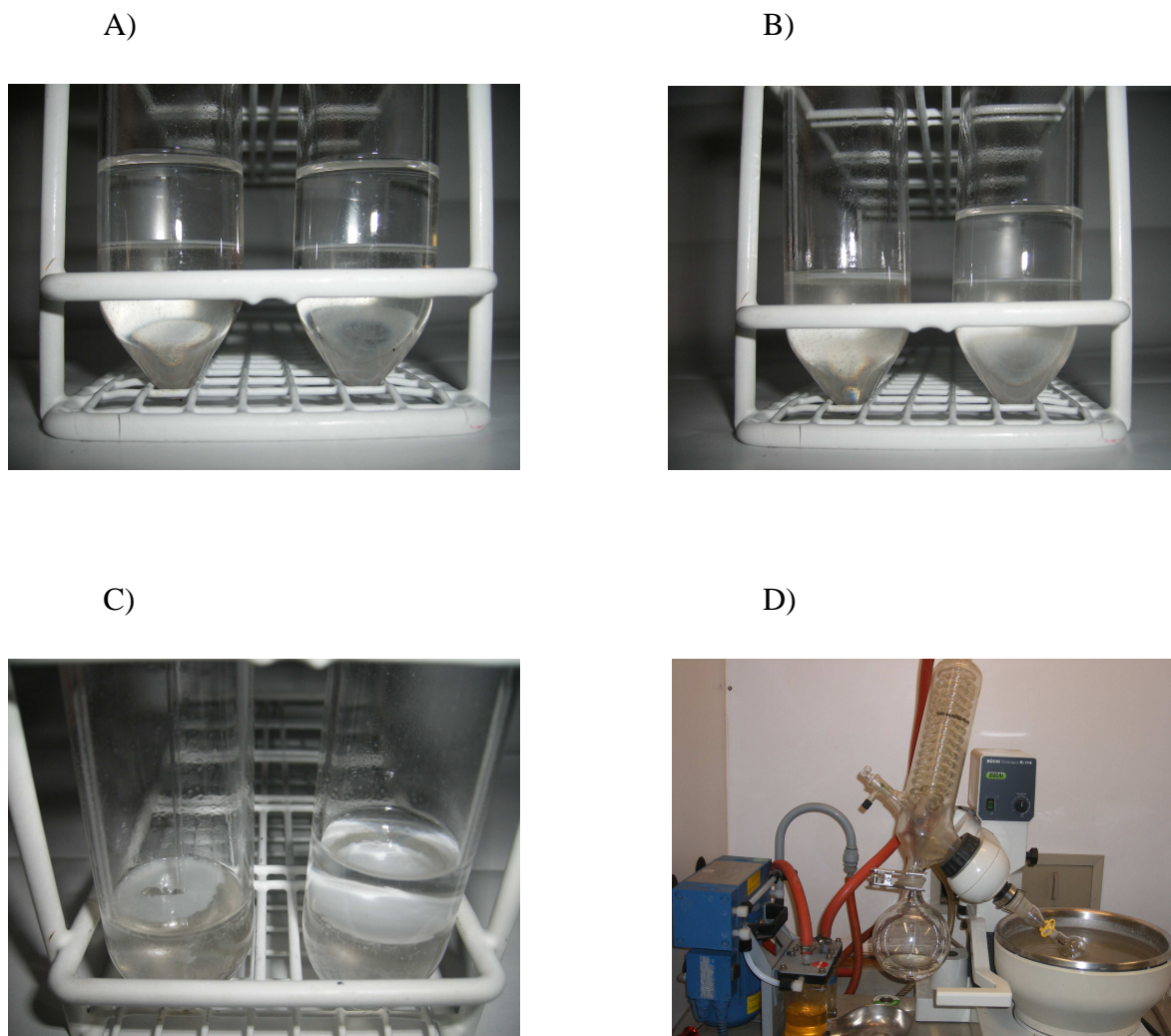


Figura 13. Secuencia de extracción lipídica. A) Tras la centrifugación de la muestra se observa una fase superior o hidroalcohólica y una fase inferior o clorofórmica. B) En el tubo de la izquierda se ha desechado la fase superior. C) Recogida de la fase clorofórmica atravesando la capa proteica, mediante pipeta Pasteur. D) Concentración de la fase clorofórmica mediante rotavapor.

3.3.2 Extracción de los lípidos de placenta.

Los lípidos de la placenta se extrajeron también por el método de Folch et al. (1957) (143). Para ello, se pesaron fragmentos de placenta entre 0.3 y 0.5g, que fueron homogeneizados con ayuda de un homogeneizador automático (Ultra-Turrax) en 3 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) + 5g/l de BHT y 250 µl de estándar interno (5.04 mg de ácido pentadecaenoico, 5.22 mg de ácido tripentadecaenoico, 12.38 mg de ácido colesterilpentadecaenoico y 7.28 mg de dipentadecanoil-fosfocolina en 50 ml de cloroformo/metanol 35:15 (v/v) + 100 mg BHT g/l). El homogeneizador se lavó tres veces con solución de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y la muestra final se incubó en un baño termostatzado a 35°C durante 20 min.

Posteriormente, la muestra incubada se filtró sobre papel Whatman nº5 para eliminar los restos insolubles. Los filtros se lavaron dos veces con cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se adicionó al filtrado 4 ml de CIK 0,1M agitándose durante un min. Posteriormente se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos a 10°C y se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente.

Se obtuvieron dos fases, la superior o acuosa se desechó con ayuda de una pipeta Pasteur y la inferior o polar se filtró sobre papel Whatman nº6. Nuevamente se realizaron dos lavados de los filtros con cloroformo:metanol 2:1 (v/v). El filtrado resultante se llevó a sequedad con un rotavapor a 37°C y se resuspendió la muestra en 400 µl de Cloroformo/Metanol 1:1 (v/v) para posterior separación de las fracciones lipídicas por cromatografía en capa fina.

3.3.3 Separación de las fracciones lipídicas de plasma y placenta.

Se tomaron 400 µl del extracto lipídico de plasma materno y fetal, así como de placenta. Se depositaron en las placas (platos de gel de silicona: MERCK; Darmstadt; Germany) a 2 cm del origen. El desarrollo cromatográfico se llevó a cabo en una campana de vidrio que contenía dos tiras de papel de filtro adheridas a las paredes, con el objeto de

facilitar la saturación de la campana (figura 14). La campana se preparó con 200 ml de la fase móvil o solución de Carnielli, V.P. (144) compuesta por una mezcla de n-heptano : diisopropiléter: ácido acético en proporciones 60 : 40 : 3 (v/v/v). Se introdujeron en la campana las placas que contenían las muestras aplicadas, con el origen hacia abajo y en posición vertical. Una vez iniciado el desarrollo se dejó transcurrir aproximadamente 45 minutos, hasta que la fase móvil alcanzó la parte superior de las placas y se dejaron secar.



Figura 14. Campana de vidrio para cromatografía en capa fina.

El revelado de las placas se realizó bajo luz ultravioleta a 254 nm. Tras aplicar un spray con solución al 0,2% de 2'7'-diclorofluoresceína en etanol se originaron unas bandas de color amarillo que permitieron la localización de cada una de las fracciones (figura 15).

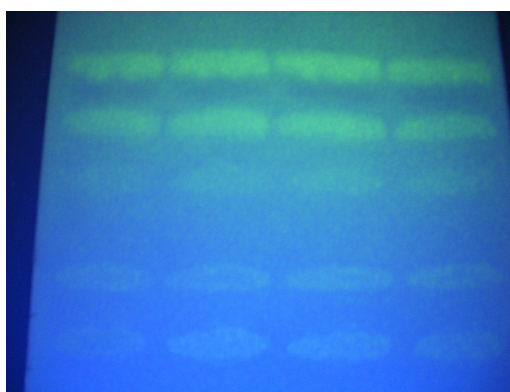


Figura 15. Revelado de las placas con luz UV.

Cada una de las fracciones se caracteriza por tener un valor de Rf (distancia que migra la fracción desde el origen/distancia que migra el frente de la fase móvil) relativamente constante, lo que permite su identificación (figura 16).

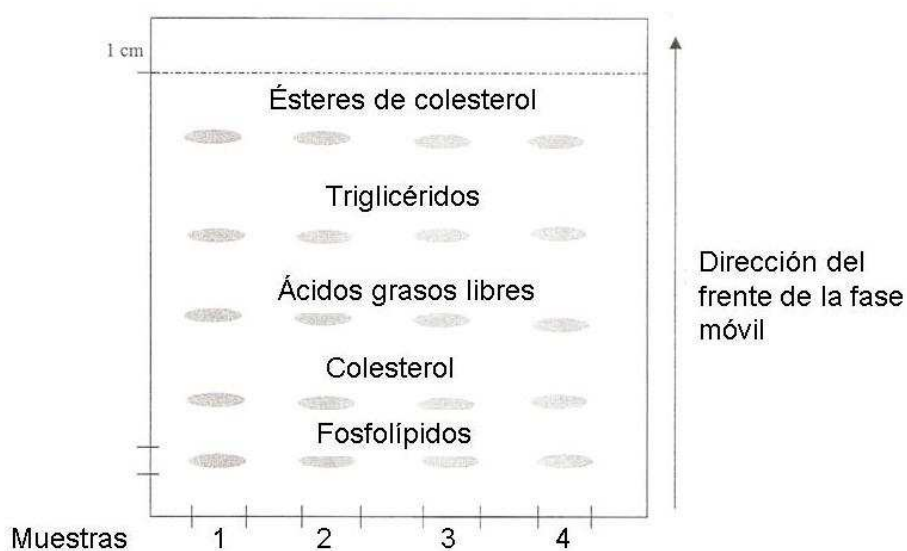


Figura 16. Representación de las fracciones lipídicas que se obtienen en las distintas bandas de la cromatografía en capa fina.

Una vez localizadas las fracciones lipídicas de interés para nuestro estudio (ácidos grasos libres, fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol) fueron delimitadas (figura 17A) y raspadas (figura 17B).

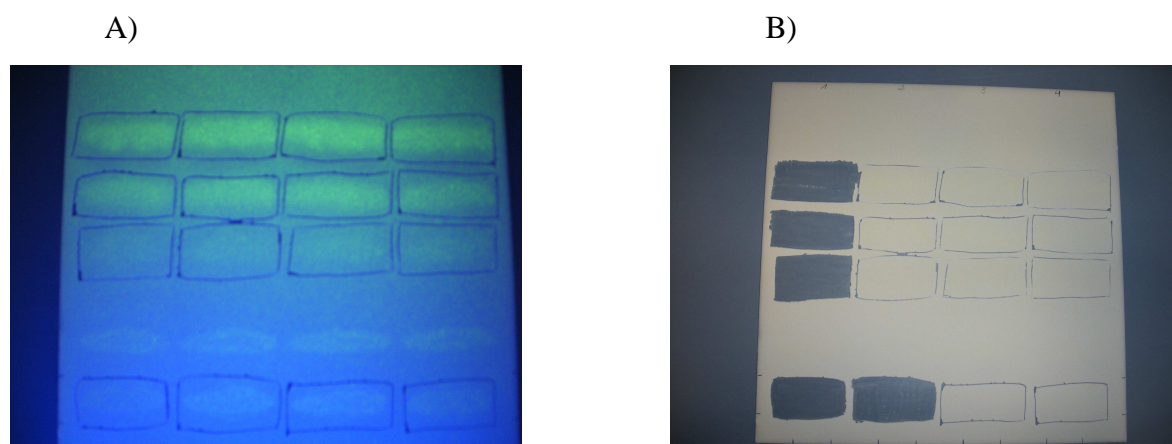


Figura 17. A) Delimitación de fracciones lipídicas. B) Raspado de las mismas.

3.3.4 Metilación de los ácidos grasos de las fracciones lipídicas.

Una vez obtenidas las fracciones lipídicas del plasma materno, fetal y placenta, se procedió a la metilación de los ácidos grasos esterificados en las mismas. Para ello, a las fracciones lipídicas raspadas, se añadió 1,5 ml de ácido clorhídrico metanólico 3M (Supelco, Bellefonte, PA, USA), se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se incubó en estufa a 85° durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se tamponó la solución con buffer: sulfato sódico / hidrogenocarbonatosódico / carbonato sódico (2:2:1).

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron dos veces con 1 ml de hexano. Las fases orgánicas finales se unieron y se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno (figura 18A). Posteriormente se resuspendieron en 50 µl de hexano con BHT (2g/l) y se introdujeron en microviales (figura 18B) para inyección en cromatografía gaseosa. Las muestras, perfectamente cerradas, se conservaron a -36°C hasta el momento de ser analizadas.

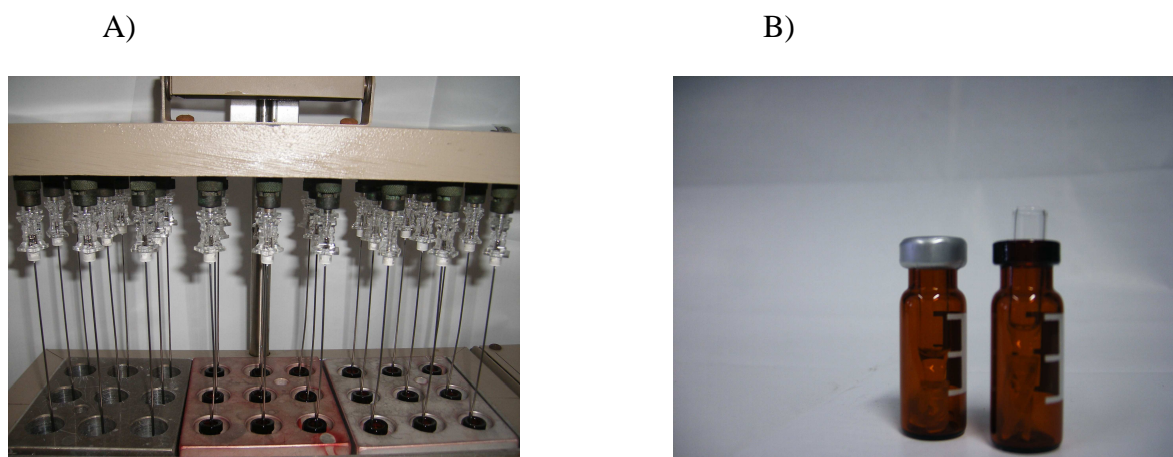


Figura 18. Extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. A) Fases orgánicas llevadas a sequedad. B) Resuspensión de las muestras en hexano + BHT e introducción en microviales.

3.3.5 Análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

La cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía gas-líquido. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 con una columna capilar BPX70 (SGE, Weiterstadt, Alemania) de 60 metros de longitud por 0,32 mm de diámetro interno.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

a) Gas portador Helio: con una presión en cabeza de columna de 1.1 bar y un flujo total a través de la columna de 0.025 bar/min hasta 2.4 bar.

b) Programa de temperaturas: se utilizaron varios gradientes de temperatura para el análisis. La temperatura inicial fue de 130°C, que se mantuvo durante 0.5 min. Seguidamente se alcanzaron 150°C a una velocidad de 3°C por min. Se continuó a 1.5°C/min hasta 180 °C, tras lo que se alcanzó 210°C a 3°C/min, manteniéndose durante 23 min. Finalmente se descendió la temperatura, a una velocidad de 15°C/min hasta la temperatura inicial (130°C).

La identificación de los distintos ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención, con los estándares de los ácidos grasos suministrados por Sigma-Aldrich Chemie (Frankfurt, Alemania).

3.3.6 Análisis de los isótopos.

El enriquecimiento isotópico de los ácidos grasos metilados de las distintas fracciones se analizó por duplicado mediante un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, acoplado a un espectrómetro de masas de isótopo ratio (Finningan MAT Delta S, Bremen, Alemania), a través de una interfase donde, se producía la combustión de las muestras, se eliminaba el agua producida y se transferían las moléculas de CO₂ resultantes a la fuente ionizadora del espectrómetro de masas (figura 19).

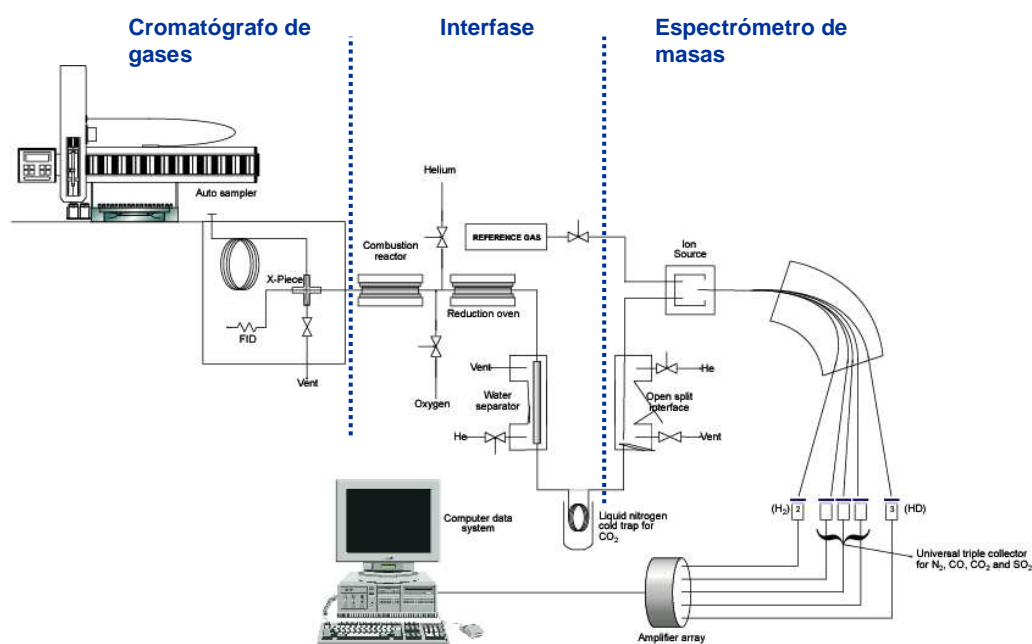


Figura 19. Esquema de un equipo de cromatografía de gases-combustión-espectrómetro de masas de isótopo ratio.

La separación de los ácidos grasos en el cromatógrafo de gases-combustión-espectrómetro de masas de isótopo ratio, se logró mediante una columna DB 23 (Fissons, Mainz, Alemania), de 50 m de longitud y un diámetro interno de 0.32 mm. El programa de temperaturas comenzó a 100°C, elevándose a 160°C a una velocidad de 4°C/min y después a 2°C/min hasta una temperatura final de 195°C que se mantuvo 28 min. Al final de la columna se recogió el efluente que contenía los ácidos grasos separados y se dirigió a un horno donde se produjo su combustión catalítica. Tras la reacción, el CO₂ generado se condujo a la fuente ionizadora del espectrómetro de masas.

Los iones producidos en la fuente ionizadora, se focalizaron mediante una serie de lentes electrostáticas, que los enfocó a través de un campo magnético uniforme encargado de separarlos y reunirlos en tres colectores de m/z 44, 45 y 46.

Este sistema permite la medida simultánea de los isotómeros de masa 44 (ión principal ¹²C ¹⁶O ¹⁶O), masa 45 (¹³C ¹⁶O ¹⁶O, ¹²C ¹⁶O ¹⁷O) y masa 46 (¹²C ¹⁷O ¹⁷O, ¹²C ¹⁷O ¹⁸O, ¹³C ¹⁶O ¹⁷O), así como el cálculo de los ratios de los iones 44/45 y 44/46.

Para calibrar el equipo, antes y después de los picos de CO₂ generados por los ácidos grasos, una muestra de CO₂ de referencia, de conocida composición isotópica, se inyectó automáticamente en el espectrómetro de masas.

3.3.7 Expresión de los resultados isotópicos.

El contenido en ¹³C de una sustancia se expresa como el valor δ¹³C relativo al estándar internacional Pee Dee Belemnite (PDB), que es el CO₂ obtenido del caparazón carbónico de un molusco del cretáceo, *Belmnitella americana*, de la formación Pee Dee de Carolina del Sur (USA) (145). Dicho valor se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{muestra}} - {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{estándar}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{estándar}}} \right) \right] * 1000$$

El valor δ¹³C (‰) puede ser transformado en porcentaje atómico de ¹³C (AP), con la ecuación:

$$\text{AP} (\%) = \left[100 \times R(0.001 \delta^{13}\text{C}\text{‰ muestra} + 1) \right] / \left[1 + R(0.001 \delta^{13}\text{C}\text{‰ muestra} + 1) \right]$$

Donde R es el ¹³C/¹²C de la referencia internacional PDB (R = 0.0112372).

El AP calculado de las muestras tras la ingestión del trazador puede ser transformado en porcentaje atómico en exceso (APE, atom percent excess), con la fórmula:

$$\text{APE} (\%) = \text{AP muestra} - \text{AP muestra basal}$$

Los valores de APE representan el enriquecimiento en ¹³C en la muestra, respecto al porcentaje de ¹²C.

Para obtener la concentración de los ácidos grasos marcados con ¹³C en la muestra, se multiplicaron los valores de enriquecimiento (APE), por la concentración en que los distintos ácidos grasos se encontraban en cada fracción lipídica.

El área bajo la curva (AUC) de las concentraciones de los ácidos grasos marcados en el plasma materno, se calculó mediante la regla trapezoidal, y representa el comportamiento de los mismos, en el total de horas del experimento.

La relación de cada ácido graso marcado entre tejido placentario y plasma materno, como estimación de su captación, se calculó como la concentración en la placenta (^{13}C nmol/g), respecto al área bajo la curva en el plasma materno ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/l}$), usando la siguiente ecuación:

$$\text{Placenta/plasma materno (ratio \%)} = \text{AG [concentración en placenta (nmol/g) x APE]} / \text{AG [concentración en plasma materno (\mu mol } ^{13}\text{C/L) x APE]}$$

La relación de cada ácido graso marcado entre la madre y el feto, como estimación de su transferencia, se calculó como la concentración del trazador ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/l}$) en sangre de cordón umbilical, respecto al área bajo la curva de la concentración del trazador en sangre materna, con la siguiente ecuación:

$$\text{Plasma de vena umbilical/plasma materno (ratio \%)} = \text{AG [concentración en vena umbilical (\mu mol } ^{13}\text{C/l) x APE]} / \text{AG [concentración en plasma materno (\mu mol } ^{13}\text{C/l) x APE]}$$

Aunque la dosis de ^{13}C -DHA fue diferente entre dos grupos de sujetos (cinco recibieron el ^{13}C -DHA enriquecido al 100%, es decir, 0.1mg/kg de DHA con todos los carbonos marcados con ^{13}C y seis recibieron la dosis de ^{13}C -DHA enriquecido al 10%, es decir, 0.01mg/kg de DHA con todos los carbonos marcados con ^{13}C), no aplicamos correcciones. La menor dosis de ^{13}C -DHA resulta en valores de APE y de concentración de ^{13}C -DHA más bajos (con un incremento en la varianza entre sujetos para dichos parámetros), pero debido a que los principales resultados están basados en ratios entre concentraciones, estos no se ven afectados.

3.4 Tratamiento estadístico de los resultados.

Para comparar las diferencias entre las fracciones lipídicas de cada ácido graso, en cada compartimento, se realizaron análisis de varianza (ANOVA), seguido por tests *a posteriori* de Bonferroni, con un intervalo de confianza del 95%. De igual forma se procedió para comparar los ratios entre los cuatro ácidos grasos marcados y para comparar su concentración/porcentaje en los distintos compartimentos. Para analizar la diferencia arterio-venosa de concentración de los ¹³C ácidos grasos se utilizó una T de Student para datos apareados. Para comparar la concentración de ácidos grasos en el compartimento materno y fetal se utilizó una T de Student para datos independientes. Para estimar la influencia de la distribución de los ácidos grasos marcados en las fracciones lipídicas de plasma materno, sobre su grado de captación placentaria y transferencia fetal, se utilizó una correlación lineal. Las diferencias fueron significativas cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del software informático SPSS 12.0 (Chicago, USA).



RESULTADOS

4.1 Características de los sujetos del estudio.

De las 11 gestantes que participaron en el estudio, dos eran primigestas, seis secundigestas y tres multíparas; ninguna presentaba obesidad antes del embarazo. La tabla 5 recoge sus principales características antropométricas.

Tabla 5. Características de los sujetos del estudio.

	<i>Media ± SD</i>
Edad (años)	33 ± 4
Edad gestacional (semanas)	40 ± 2
IMC* en primer trimestre (kg/m²)	25.4 ± 4.15
Talla (cm)	160.9 ± 5.72
Peso el día previo a la cesárea (kg)	78.03 ± 8.35

*IMC: índice de masa corporal.

El estudio bioquímico de las gestantes que participaron en el estudio se resume en la tabla 6. Ninguna participante presentaba alteraciones del metabolismo lipídico, aunque como era de esperar, debido a la hipertrigliceridemia fisiológica del embarazo, se observan valores superiores a los valores de referencia del laboratorio para no gestantes.

El estudio ecográfico y Doppler fetal, realizado a las gestantes el día previo a la cesárea, resultó dentro de la normalidad en todos los casos (146;147). La tabla 7 resume los resultados de dicho estudio ecográfico, normalizados por edad gestacional.

Tabla 6. Estudio bioquímico de las gestantes.

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valores de referencia*</i>
Colesterol total (mg/dl)	267.4 ± 48.22	50-230
HDL-colesterol (mg/dl)	82.1 ± 21.19	> 60
LDL-colesterol (mg/dl)	140.16 ± 42.1	<130
Triglicéridos (mg/dl)	231.2 ± 94.73	50-200
Albúmina (g/dl)	3.7 ± 0.35	3.5-5.3

*Valores de referencia del Laboratorio para población general, no gestante.

Tabla 7. Estudio ecográfico y Doppler fetal.

	<i>Media ± SEM</i>
Diámetro biparietal (percentil)	39.27 ± 9.51
Circunferencia cefálica (percentil)	22.33 ± 4.15
Circunferencia abdominal (percentil)	51.65 ± 15.24
Longitud femoral (percentil) (mm)	39.08 ± 10.3
Peso fetal estimado (g)	3390 ± 193.59
IP* arteria umbilical (percentil)	39.67 ± 7.75

*IP: índice de pulsatilidad

Los ácidos grasos marcados se administraron a las embarazadas 12 h antes de la cesárea. Desde la administración de los ácidos grasos marcados hasta la cesárea, transcurrió una media de 12 h y 17 min ± 13 min (SD). El peso medio de la placenta fue 617 ± 128.67g (SD). En todos los casos los recién nacidos presentaron una puntuación en el test de Apgar de 9 al minuto, y de 10 a los cinco minutos. El estudio del pH de arteria umbilical resultó en 7.29 ± 0.03 y para vena umbilical 7.35 ± 0.05 (SD), lo que indica que en el momento del nacimiento, no hubo pérdida de bienestar fetal. La tabla 8 recoge las características de los recién nacidos, que fueron niños sanos a término.

Tabla 8. Características de los recién nacidos.

	<i>Media ± SD</i>
Peso al nacimiento (g)	3395 ± 473.64
Longitud (cm)	49.7 ± 2.94
Circunferencia cefálica (cm)	34.7 ± 1.23
Circunferencia abdominal (cm)	34.5 ± 2.35

4.2 Composición de ácidos grasos del plasma materno, placenta y plasma de cordón.

4.2.1 Concentración de ácidos grasos en los diferentes compartimentos.

La tabla 9 muestra la concentración de los ácidos grasos estudiados en los lípidos del plasma materno (mg/l), del plasma de vena umbilical (mg/l) y de la placenta (mg/kg), en el momento del nacimiento. Al comparar los compartimentos materno y fetal, tal y como era de esperar, se observó que los ácidos grasos a estudiar están en mayor concentración en plasma materno que en plasma fetal (tabla 9). Esto también ocurrió para el resto de ácidos grasos (resultados no mostrados).

Tabla 9. Concentración de los ácidos grasos estudiados.

	Plasma materno (mg/l)	Plasma de vena umbilical (mg/l)	Placenta (mg/Kg)
Ácido palmítico	1091.77 ± 58.01a	297.80 ± 16.89b	1865.75 ± 69.58
Ácido oleico	879.41 ± 58.89a	155.96 ± 12.18b	672.77 ± 27.43
Ácido linoleico	1149.82 ± 54.42a	105.67 ± 7.58b	774.23 ± 43.31
Ácido docosahexaenoico	102.36 ± 9.08a	40.58 ± 4.28b	406.78 ± 29.68

Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm SEM$. Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la concentración en plasma materno y fetal, para cada ácido graso.

Al analizar la concentración de los ácidos grasos estudiados, por fracciones lipídicas, tanto en plasma materno como cordón, se observó igualmente que en todas las fracciones del plasma materno, los ácidos grasos están en mayor concentración que en plasma fetal (tabla 10).

Así mismo, en placenta, cabe destacar que, todos los ácidos grasos estudiados se encuentran principalmente esterificados en la fracción de los fosfolípidos, donde suponen el 80-90% respecto al resto de fracciones (tabla 10).

Tabla 10. Concentración de los ácidos grasos en las fracciones lipídicas.

	Plasma materno (mg/l)	Plasma de vena umbilical (mg/l)	Placenta (mg/Kg)
Ácido palmítico			
PL	523.18 ± 21.17a	172.12 ± 6.89b	1639.44* ± 67.72
TG	392 ± 32.06a	54.35 ± 9.14b	52.17 ± 4.67
NEFA	53.34 ± 5.13a	21.06 ± 3.63b	142.67 ± 22.86
EC	123.26 ± 8.58a	50.27 ± 3.89b	31.47 ± 2.49
Ácido oleico			
PL	150.32 ± 10.46a	41.79 ± 2.36b	548.43* ± 25.41
TG	483.84 ± 41.05a	47.49 ± 9.6b	37.45 ± 3.42
NEFA	62.43 ± 7.19a	5.47 ± 1.5b	53.45 ± 11.52
EC	183.18 ± 15.12a	61.2 ± 4.12b	33.43 ± 3.23
Ácido linoleico			
PL	332.59 ± 16.97a	40.86 ± 2.55b	622.08* ± 40.89
TG	259.83 ± 20.16a	21.18 ± 3.63b	25.3 ± 2.27
NEFA	31.5 ± 3.23a	3.65 ± 0.96b	55.5 ± 11.44
EC	525.9 ± 35.54a	39.97 ± 2.83b	71.35 ± 9.21
Ácido docosahexaenoico			
PL	83.53 ± 7.04a	31.94 ± 3.05b	361.19* ± 24.32
TG	9.3 ± 1.7a	5.56 ± 1.04b	15.09 ± 3.1
NEFA	1.53 ± 0.28a	0.36 ± 0.04b	26.43 ± 6.98
EC	8 ± 0.7a	2.75 ± 0.34b	4.06 ± 0.51

Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm \text{SEM}$. Letras distintas significan

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las fracciones lipídicas de plasma materno y fetal, para cada ácido graso. (*) Significa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las fracciones lipídicas de la placenta, para cada ácido graso.

4.2.2 Porcentaje de ácidos grasos en los diferentes compartimentos.

Para comparar entre sí los distintos ácidos grasos, es necesario calcular el porcentaje en el que se encuentra cada ácido graso respecto al total de ácidos grasos. Estos valores en tanto por ciento, nos dan el perfil de ácidos grasos de una muestra.

La tabla 11 muestra el perfil de los ácidos grasos estudiados en plasma materno, plasma de vena umbilical y placenta, al nacimiento. En ella observamos que los porcentajes de ácido palmítico (PA, 16:0) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) se encuentran en mayor cantidad en plasma fetal en comparación con plasma materno, lo que no ocurre para los ácidos oleico (OA, 18:1n-9) y linoleico (LA, 18:2n-6). Si consideramos que la capacidad de síntesis del DHA (22:6n-3) en el feto es muy limitada, este dato señala una biomagnificación en la transferencia de este ácido graso a través de la placenta.

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos (%), en plasma materno, plasma de vena umbilical y placenta, al nacimiento.

Ácido graso	Plasma materno	Plasma vena umbilical	Placenta
C14:0	0.85a ± 0.11	0.74a ± 0.04	0.43b ± 0.03
C14:1 t	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C14:1	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C15:1	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C16:0	25.93b ± 0.37	28.34a ± 0.48	25.01b ± 0.28
C16:1 t	0.05b ± 0.01	0.04b ± 0.02	0.21a ± 0.05
C16:1n-7	1.63b ± 0.12	2.76a ± 0.22	0.42c ± 0.03
C17:0	0.27c ± 0.01	0.32b ± 0.02	0.38a ± 0.01
C17:1	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C18:0	6.36b ± 0.26	13.81a ± 0.76	12.90a ± 0.31
C18:1 t	0.15a ± 0.02	0.07b ± 0.01	0.12a ± 0.01
C18:1n-9	20.84a ± 0.81	14.76b ± 0.57	9.02c ± 0.20
C18:1n-7	1.63b ± 0.06	2.53a ± 0.08	1.50b ± 0.05
C18:2 tt	0.03b ± 0.01	0.05ab ± 0.01	0.06a ± 0.01
C18:2n-6	27.61a ± 1.21	10.06b ± 0.47	10.37b ± 0.44
C18:3n-6	0.19a ± 0.02	0.26a ± 0.03	0.10b ± 0.00
C18:3n-3	0.28a ± 0.03	0.04b ± 0.01	0.04b ± 0.00
C20:0	0.25b ± 0.02	0.63a ± 0.03	0.31b ± 0.01
C18:4n-3	0.02b ± 0.00	0.02ab ± 0.00	0.03a ± 0.00
C20:1n-9	0.23a ± 0.01	0.06c ± 0.01	0.19b ± 0.01
C20:2n-6	0.30b ± 0.01	0.23c ± 0.01	0.48a ± 0.03
C20:3n-9	0.08b ± 0.01	0.37a ± 0.07	0.11b ± 0.01
C20:3n-6	1.47c ± 0.08	2.78b ± 0.10	4.39a ± 0.17
C20:4n-6	6.03c ± 0.38	12.86b ± 0.59	20.59a ± 0.30
C20:3n-3	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
C22:0	0.71b ± 0.14	1.11ab ± 0.19	1.34a ± 0.04
C22:1 t	0.02b ± 0.00	0.02b ± 0.00	0.04a ± 0.01
C22:1n-9	0.09b ± 0.01	0.18a ± 0.02	0.10b ± 0.00
C20:5n-3	0.32 ± 0.09	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.04
C22:2n-6	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.00
C22:4n-6	0.21c ± 0.01	0.56b ± 0.03	1.54a ± 0.06
C24:0	0.41c ± 0.02	0.91b ± 0.03	1.84a ± 0.11
C22:5n-6	0.27c ± 0.02	0.62b ± 0.07	0.97a ± 0.06
C24:1n-9	0.95b ± 0.04	1.37a ± 0.07	1.20a ± 0.06
C22:5n-3	0.26b ± 0.03	0.33b ± 0.05	0.62a ± 0.06
C22:6n-3	2.42c ± 0.15	3.81b ± 0.28	5.40a ± 0.24

Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm \text{SEM}$. Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes compartimentos, para cada ácido graso.

4.3 Ácidos grasos marcados en plasma materno.

4.3.1 Concentración de los ^{13}C -ácidos grasos marcados en las fracciones lipídicas del plasma materno.

Con la administración de los ácidos grasos marcados con isótopos estables (^{13}C) 12h antes de la cesárea, pudimos observar que los ácidos grasos marcados aparecían en todas las fracciones lipídicas del plasma materno, y en una concentración relativamente estable a las 12h, (figura 20). Así pues, este tiempo de administración de los ácidos grasos marcados parece óptimo para evaluar la transferencia de estos compuestos a través de la placenta. No obstante, debido al diferente turnover que tienen las fracciones lipídicas, a las 12 horas NEFA y TG ya empiezan a declinar, mientras que PL y EC se siguen formando (figura 20).

Por otro lado, con la utilización de los ácidos grasos marcados podemos demostrar como el ácido ^{13}C -palmítico y el ácido ^{13}C -oleico son transportados principalmente en los triglicéridos del plasma materno, mientras que el ácido ^{13}C -linoleico y el ácido ^{13}C -docosahexaenoico se transportan principalmente en los fosfolípidos del plasma materno (figura 20).

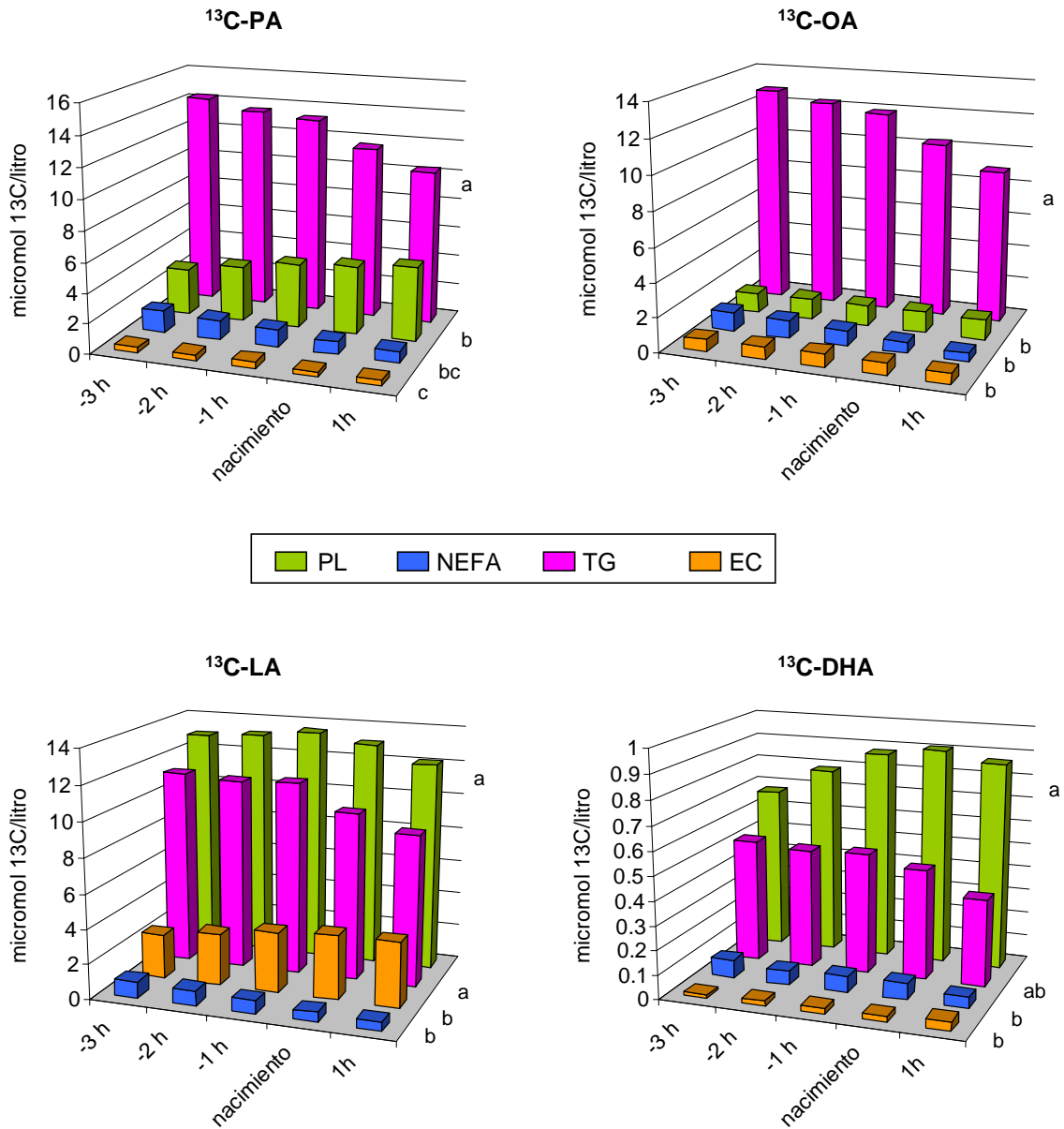


Figura 20. Concentración de los ácidos grasos marcados, en las fracciones lipídicas del plasma materno, a lo largo del tiempo de estudio. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, respecto al tiempo de estudio.

Ya que 5 sujetos consumieron el DHA marcado en una dosis de 0.1mg/kg y 6 sujetos en una dosis de 0.01mg/kg, hemos representado la concentración para ambos casos por separado (figura 21). Como era de esperar, el comportamiento de la concentración de ¹³C-docosahexaenoico en los sujetos que lo consumen en una dosis de 0.1 mg/kg o 0.01 mg/kg fue similar (figura 21) y simplemente discrepan en los valores absolutos de concentración en los que aparecen en cada pool.

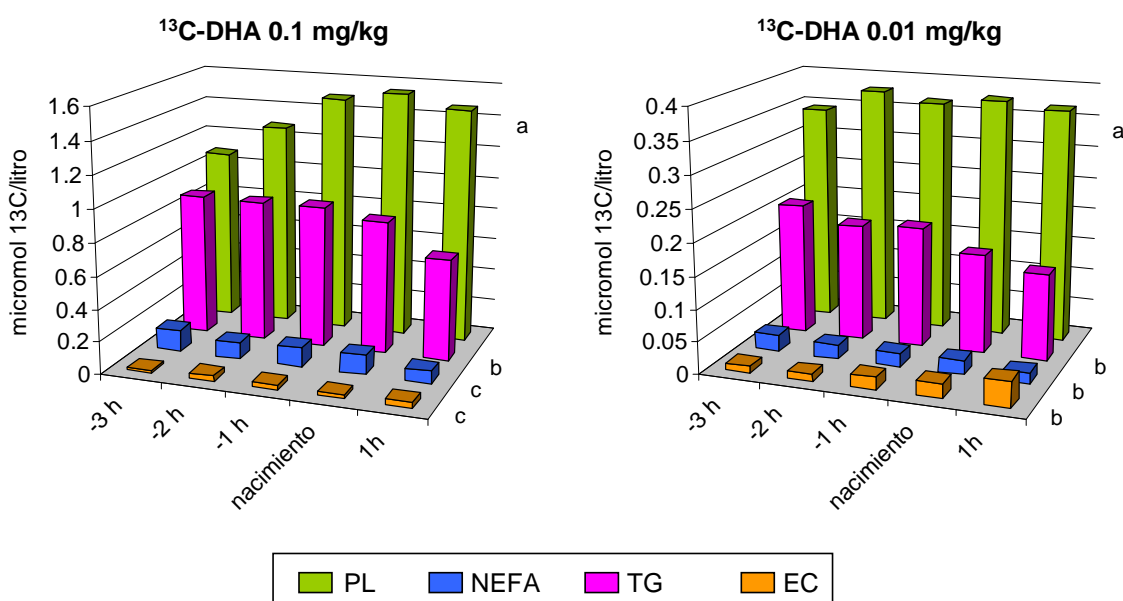


Figura 21. Concentración de ¹³C-docosahexaenoico administrado a dosis de 0.1 mg/kg y 0.01 mg/kg, en las fracciones lipídicas del plasma materno, a lo largo del tiempo de estudio. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, en el momento del nacimiento.

4.3.2 Área bajo la curva de los ácidos grasos marcados en el plasma materno.

Para definir el comportamiento global durante las 12 horas, de los ácidos grasos marcados en el plasma materno, se calculó el área bajo la curva (AUC) de los mismos. La figura 22 muestra el AUC de la concentración de ácido ^{13}C -palmítico, ácido ^{13}C -oleico, ácido ^{13}C -linoleico y ácido ^{13}C -docosahexaenoico, en las fracciones lipídicas del plasma materno. Al igual que en las figuras anteriores, y tal y como era de esperar, el ácido ^{13}C -palmítico y el ácido ^{13}C -oleico se transportan principalmente en triglicéridos, mientras que el ácido ^{13}C -linoleico y el ácido ^{13}C -docosahexaenoico se transportan principalmente en fosfolípidos y triglicéridos del plasma materno. Este diferente perfil de incorporación de los diferentes ácidos grasos en las fracciones lipídicas del plasma materno, podría afectar a la tasa de captación de los ácidos grasos por la placenta y su posterior transferencia fetal.

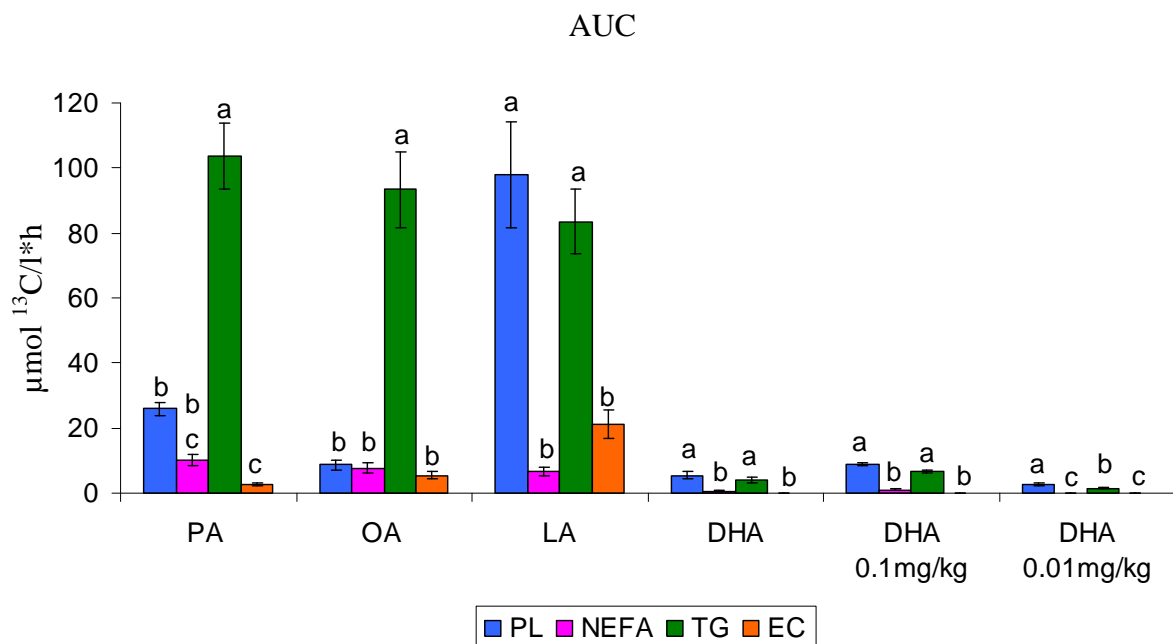


Figura 22. Concentración de ^{13}C -ácidos grasos, en las fracciones lipídicas del plasma materno, AUC del tiempo de estudio. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, para cada ácido graso.

4.4 Análisis de los ácidos grasos marcados con ^{13}C en placenta.

Ya que en tejido placentario, los fosfolípidos representan el 80-90% de las fracciones (tabla 10), la concentración absoluta de todos los ^{13}C -ácidos grasos analizados, es mayoritaria en los fosfolípidos de la misma (figura 23).

Este dato era de esperar ya que la placenta es principalmente una membrana biológica, entre la circulación materna y fetal, y el componente fundamental de las membranas son fosfolípidos.

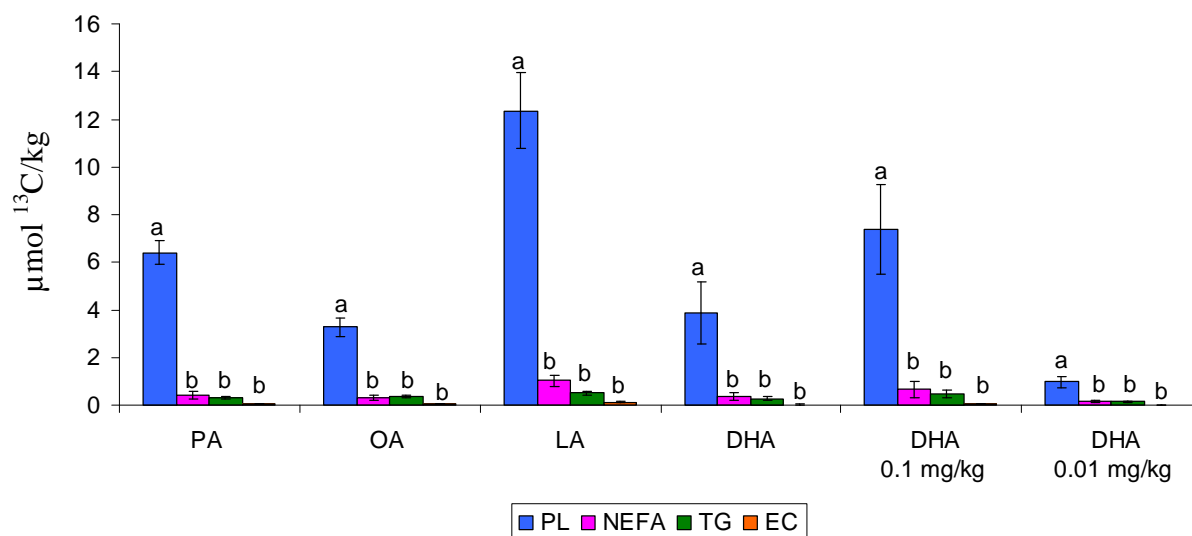


Figura 23. Concentración de ^{13}C -ácidos grasos, en las fracciones lipídicas del tejido placentario, en el momento del nacimiento. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, para cada ácido graso.

4.5 Análisis de los ácidos grasos marcados con ^{13}C en cordón umbilical.

4.5.1 Ácidos grasos marcados en vena umbilical.

Cuando se tiene en cuenta la concentración de cada ^{13}C -ácido graso en las fracciones lipídicas del plasma de vena umbilical, se observa que la concentración de ácido ^{13}C -palmítico y ácido ^{13}C -docosahexaenoico es mayor en fosfolípidos y triglicéridos; el ácido ^{13}C -oleico se encuentra principalmente en triglicéridos y ésteres de colesterol, mientras que el ácido ^{13}C -linoleico se encuentra fundamentalmente en triglicéridos y fosfolípidos (figura 24).

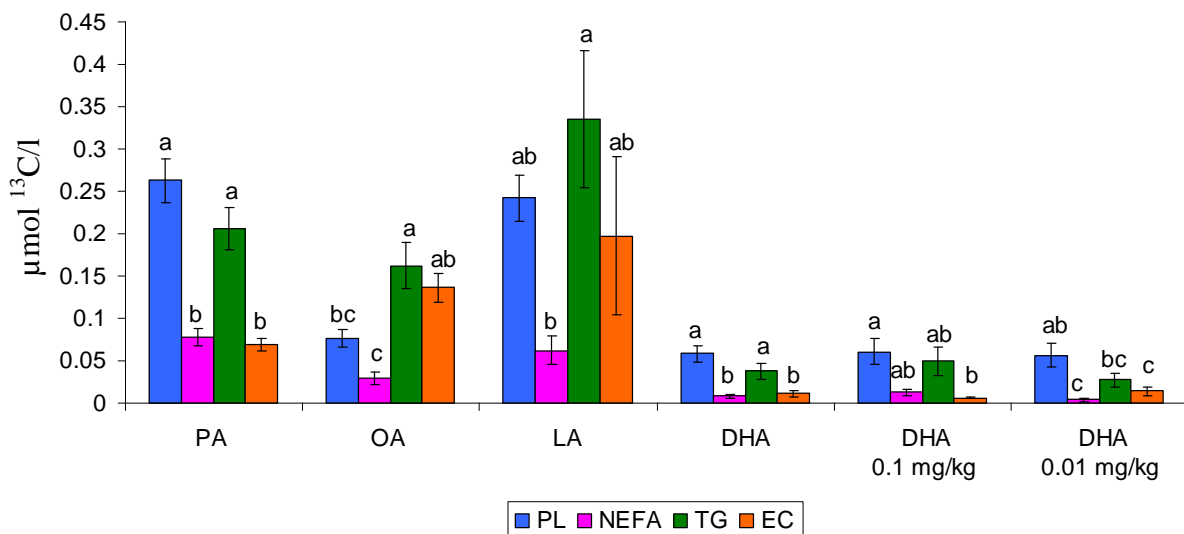


Figura 24. Concentración de ^{13}C -ácidos grasos, en las fracciones lipídicas de plasma de vena umbilical, en el momento del nacimiento. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, para cada ácido graso.

4.5.2 Ácidos grasos marcados en arteria umbilical.

En la figura 25 se observa que la concentración de ácido ^{13}C -palmítico y ácido ^{13}C -docosahexaenoico es mayor en fosfolípidos y triglicéridos de sangre de arteria umbilical; el ácido ^{13}C -oleico se encuentra principalmente en triglicéridos y ésteres de colesterol, mientras que el ácido ^{13}C -linoleico se encuentra fundamentalmente en triglicéridos y fosfolípidos. Por tanto, se repite la misma distribución que en plasma de vena umbilical (figura 24).

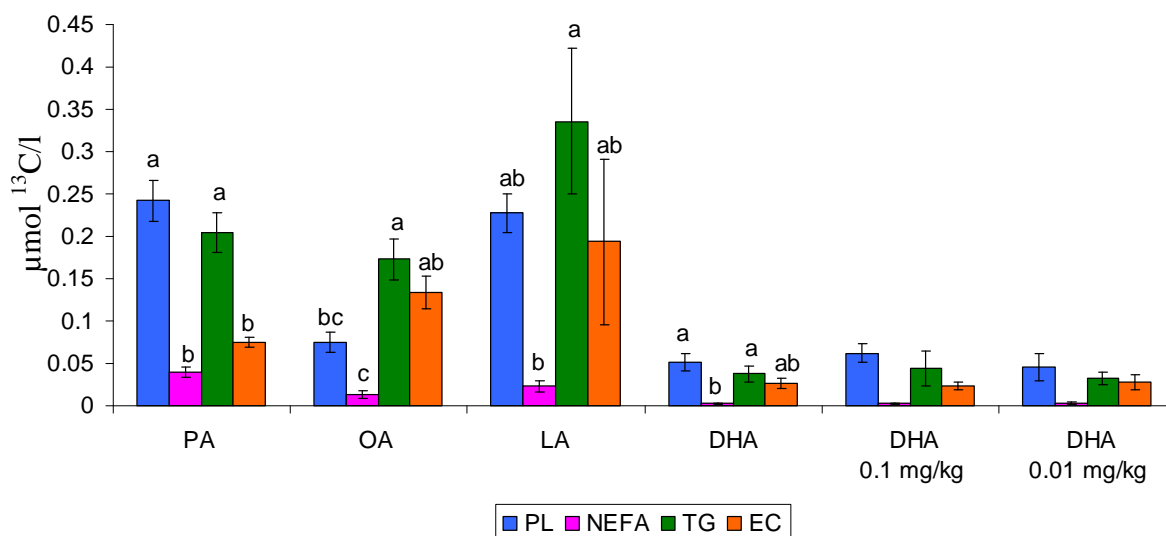


Figura 25. Concentración de ^{13}C -ácidos grasos, en las fracciones lipídicas de plasma de arteria umbilical, en el momento del nacimiento. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones lipídicas, para cada ácido graso.

4.5.3 Diferencias en la Concentración de los ^{13}C -ácido grasos en las fracciones lipídicas de plasma de vena y arteria umbilical.

Para estimar la captación de los ácidos grasos por los tejidos fetales se compararon las concentraciones de los ácidos grasos marcados de vena y arteria umbilical, en el momento del nacimiento (figura 26), no observándose diferencias estadísticamente significativas.

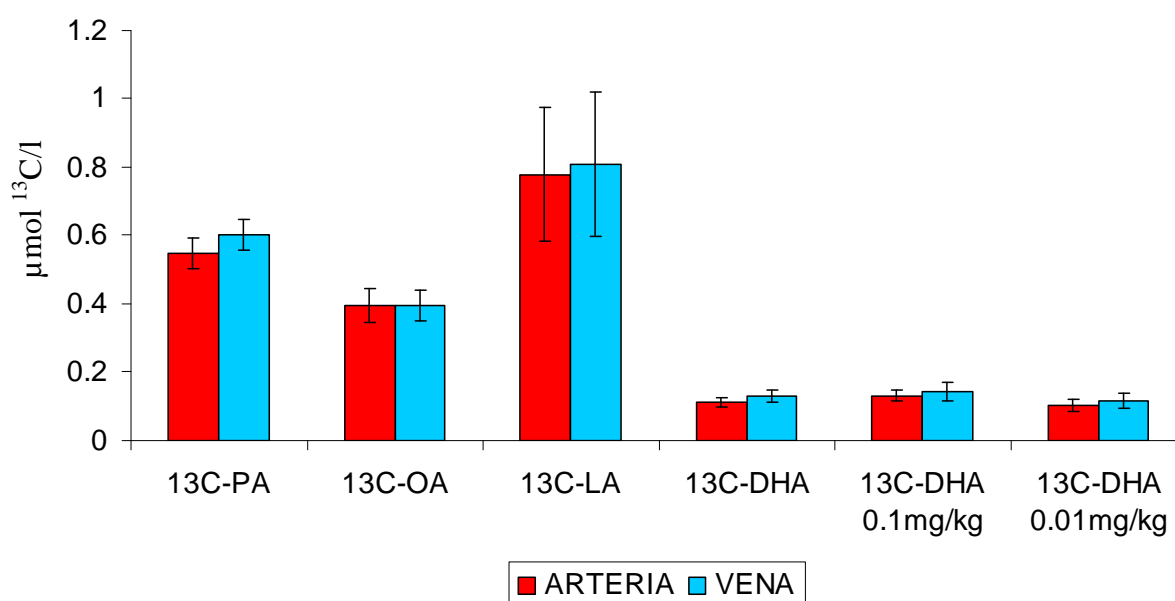


Figura 26. Diferencias en la concentración de ^{13}C -ácidos grasos en plasma de vena y arteria umbilical. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

Para estimar una posible utilización diferente de los tejidos fetales para los ácidos grasos, se comparó además, la diferencia de concentración venosa-arterial entre los ácidos grasos marcados con ^{13}C , en el momento del nacimiento (figura 27), no observándose diferencias estadísticamente significativas. Quizás el tiempo entre la administración de los compuestos marcados 12h antes de la cesárea no sea suficiente para estimar diferencias en la captación de ácidos grasos por los tejidos en los niños.

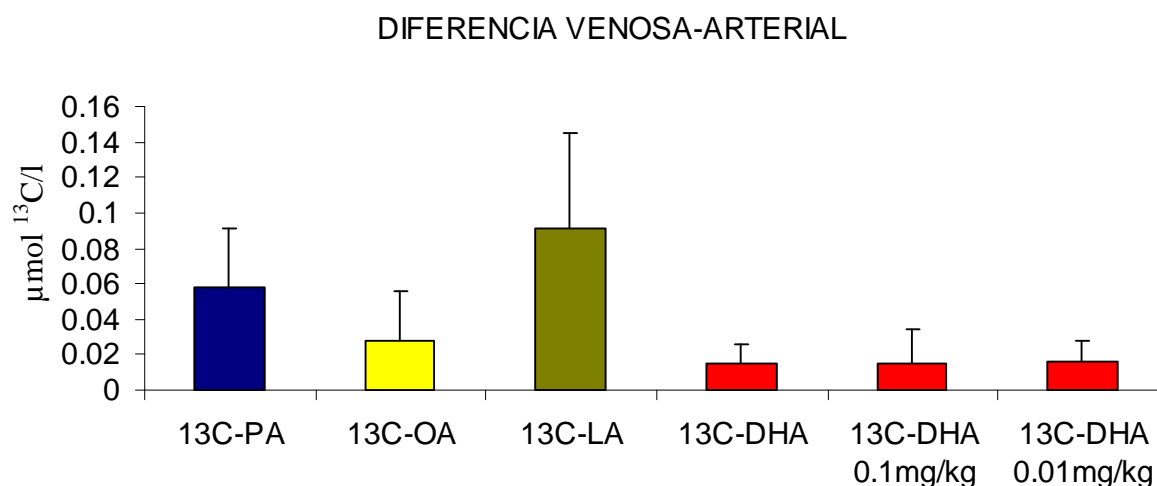


Figura 27. Diferencia en la concentración de ^{13}C -ácidos grasos en plasma de vena y arteria umbilical. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

4.6 Transferencia materno-placentaria de los ácidos grasos marcados con ^{13}C .

En la tabla 12 se muestra el AUC de la concentración de ácidos grasos marcados en los lípidos totales del plasma materno, y en los lípidos totales de la placenta en el momento de la cesárea. La concentración de DHA es menor que para el resto de ácidos grasos en plasma materno, porque se dio a menor dosis.

Tabla 12. Concentración de ácidos grasos marcados en los lípidos totales del plasma materno y de la placenta. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

	$^{13}\text{C-PA}$	$^{13}\text{C-OA}$	$^{13}\text{C-LA}$	$^{13}\text{C-DHA}$
AUC plasma materno ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/l} \cdot \text{h}$)	142.07b \pm 11.77	114.58b \pm 13.94	207.26a \pm 22.68	9.93c \pm 1.96
Placenta ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/kg}$)	7.15b \pm 0.59	4.03b \pm 0.46	14.01a \pm 1.60	4.57b \pm 1.44

Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

Sin embargo, cuando se compara el ratio entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en tejido placentario en relación al plasma materno (AUC), el DHA es significativamente más incorporado en la placenta, respecto al resto de ácidos grasos (figura 28). Esto señala una captación placentaria preferencial de este ácido graso, respecto a PA, OA y LA.

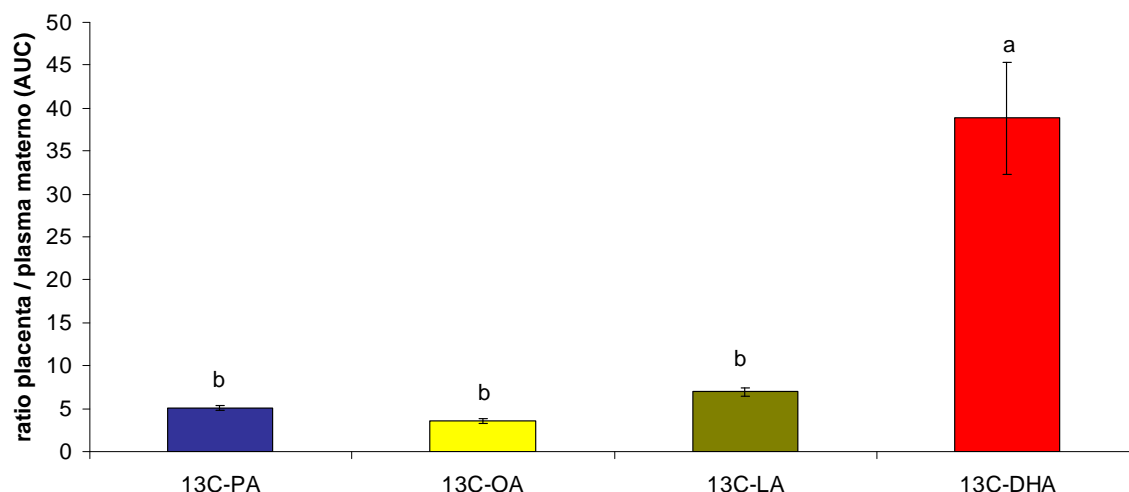


Figura 28. Ratio entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en tejido placentario y plasma materno -AUC- ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

En el caso del ácido docosahexaenoico, se pueden combinar los valores obtenidos de los ratios plasma materno/placenta de los sujetos que recibieron el ácido ^{13}C -docosahexaenoico a una concentración de 0.1 mg/kg y aquellos que lo recibieron a una concentración de 0.01 mg/kg, ya que son datos relativos a dos compartimentos que se afectan por igual.

Independientemente de que se use el AUC en plasma materno (figura 28) o la concentración del trazador en el momento de la cesárea, el DHA es captado preferentemente por la placenta respecto al resto de ácidos grasos (figura 29).

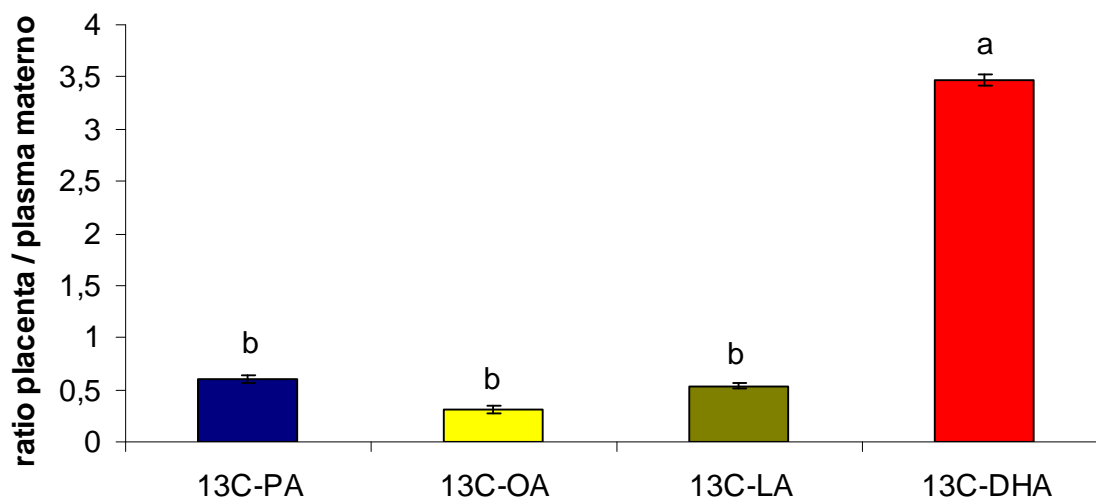


Figura 29. Ratio entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en tejido placentario y plasma materno, al nacimiento. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

4.7 Transferencia materno-fetal de los ácidos grasos marcados con ^{13}C .

En la tabla 13 se muestra una vez más, el AUC de la concentración total de los ácidos grasos marcados en plasma materno y su concentración total en vena umbilical. De nuevo, la baja concentración de DHA, tanto en plasma materno como en fetal, se debe a que se administró a menor dosis que el resto de ácidos grasos.

Tabla 13. Concentración de ácidos grasos marcados en los lípidos totales del plasma materno y de la placenta. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

	$^{13}\text{C-PA}$	$^{13}\text{C-OA}$	$^{13}\text{C-LA}$	$^{13}\text{C-DHA}$
AUC plasma materno ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/l}\cdot\text{h}$)	142.07b \pm 11.77	114.58b \pm 13.94	207.26a \pm 22.68	9.93c \pm 1.96
Plasma vena umbilical ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/l}$)	0.60a \pm 0.04	0.40ab \pm 0.05	0.81a \pm 0.21	0.13b \pm 0.02

Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

La figura 30 muestra el ratio entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en plasma de vena umbilical y plasma materno (AUC). Al igual que en las figuras 28 y 29, observamos como el ratio del ácido ^{13}C -docosahexaenoico en plasma de vena de cordón respecto al plasma materno es significativamente superior en comparación al resto de ^{13}C -ácidos grasos. Este dato señala una transferencia materno-fetal preferente para este ácido graso (DHA), respecto a PA, OA y LA.

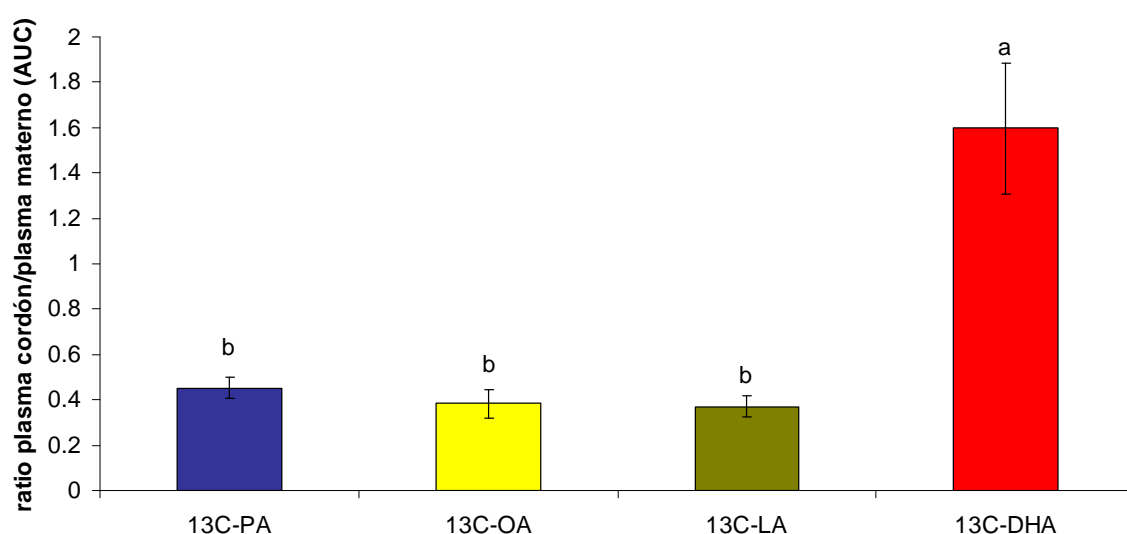


Figura 30. Ratio entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en plasma materno (AUC) y plasma de vena umbilical. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

En el caso del ácido docosahexaenoico, se pueden combinar los valores obtenidos de los ratios plasma materno/placenta de los sujetos que recibieron el ácido ^{13}C -docosahexaenoico a una concentración de 0.1 mg/kg y aquellos que lo recibieron a una concentración de 0.01 mg/kg, ya que son datos relativos a dos compartimentos que se afectan por igual.

Como ocurría en el caso del ratio placenta/plasma materno, si en lugar de utilizar los valores del AUC para el cálculo del ratio plasma fetal/plasma materno, se emplearan los datos de concentración de ácidos grasos marcados en el momento de la cesárea, los resultados serían similares, con transferencia al feto preferente del DHA, respecto al resto de ácidos grasos (figura 31).

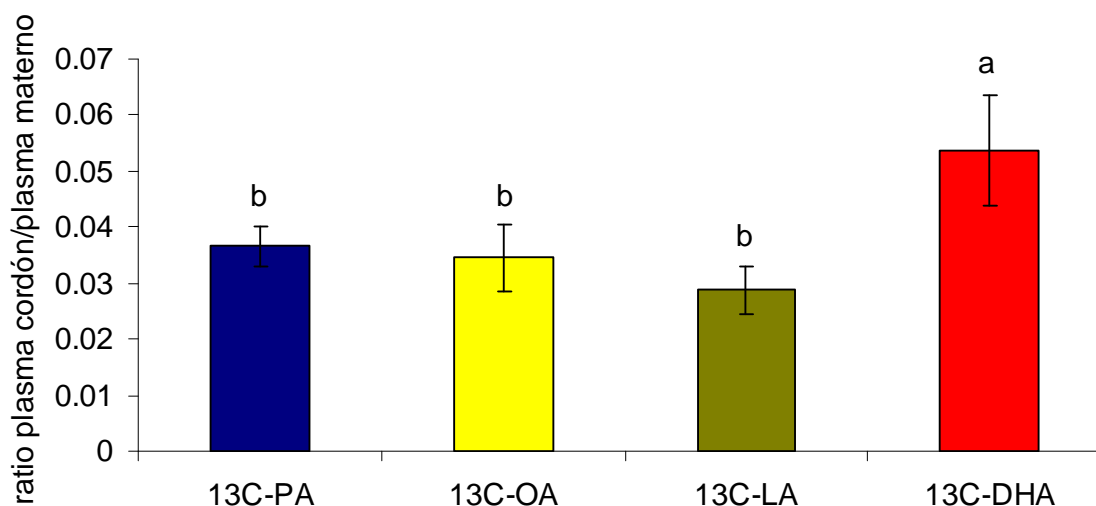


Figura 31. Ratio entre la concentración de los ¹³C-ácidos grasos en plasma de vena umbilical y plasma materno, al nacimiento. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes ácidos grasos.

4.8 Fracciones lipídicas y transferencia materno-placentaria de los ácidos grasos marcados con ¹³C.

Para estimar la influencia de la distribución de los ácidos grasos marcados en las fracciones lipídicas de plasma materno, sobre su grado de captación placentaria, correlacionamos el AUC de la concentración de cada ¹³C-ácido graso estudiado en las fracciones lipídicas del plasma materno, con su concentración total en placenta.

La concentración del ácido ¹³C-palmitico y ácido ¹³C-oleico en TG del plasma materno se correlacionó significativamente con la concentración de dichos ácidos grasos en los lípidos totales de la placenta (figuras 32 y 33), enfatizando el papel de esta fracción lipídica en el proceso de captación placentaria de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

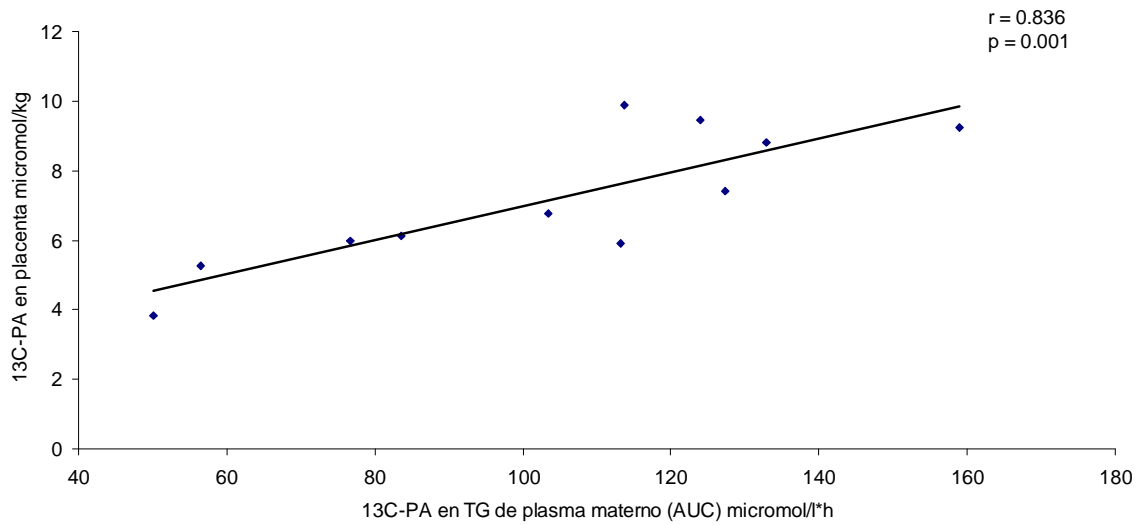


Figura 32. Correlación entre la concentración de $^{13}\text{C-PA}$ en TG de plasma materno (AUC) y la concentración total de $^{13}\text{C-PA}$ en la placenta.

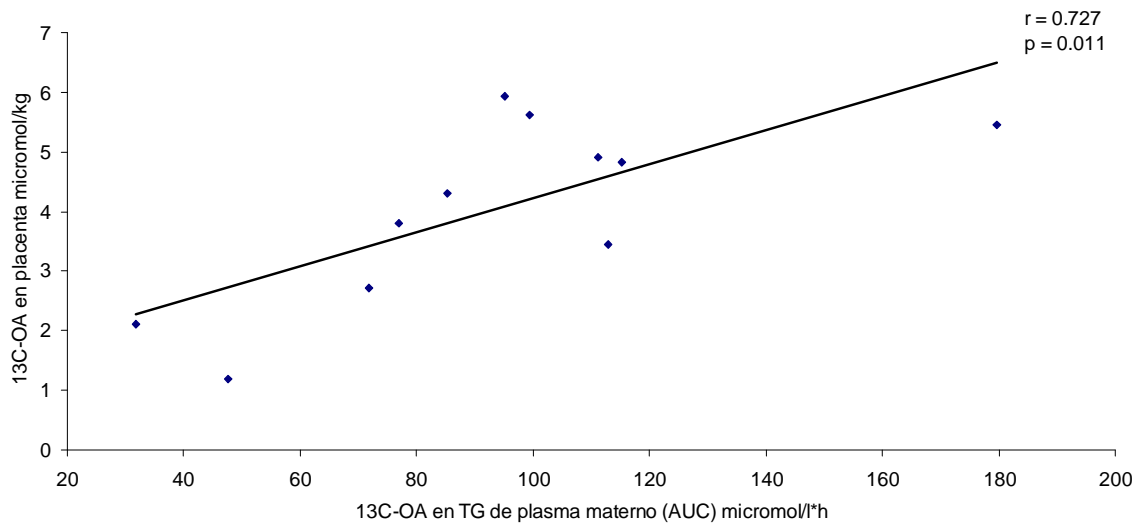


Figura 33. Correlación entre la concentración de $^{13}\text{C-OA}$ en TG de plasma materno (AUC) y la concentración total de $^{13}\text{C-OA}$ en la placenta.

Para el ácido ^{13}C -linoleico, su concentración en PL del plasma materno, se correlaciona significativamente con las concentraciones de este ácido graso en la placenta (figura 34).

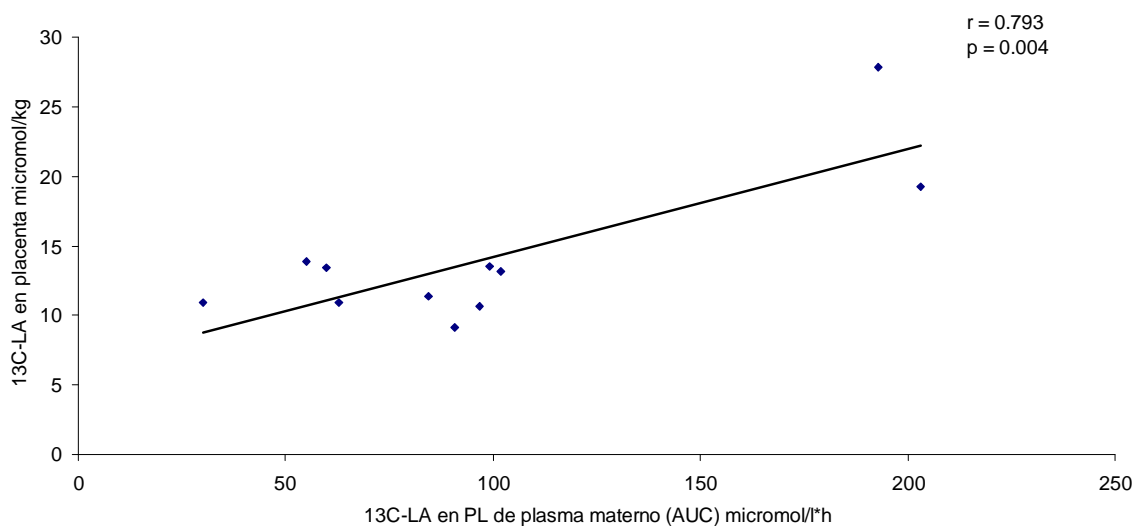


Figura 34. Correlación entre la concentración de ^{13}C -LA en PL de plasma materno (AUC) y la concentración total de ^{13}C -LA en la placenta.

En el caso del ácido ^{13}C -docosahexaenoico, la correlación entre su concentración, en las fracciones lipídicas del plasma materno y su concentración total en placenta, resultó significativa para todas las fracciones lipídicas (figura 35). El hecho de que las concentraciones de ácido ^{13}C -docosahexaenoico en todas las fracciones lipídicas, se correlacionen significativamente con su concentración total en placenta, refuerza la idea de que este ácido graso es captado preferentemente por la placenta respecto a PA, OA y LA, y lo toma fuertemente desde todas las fracciones lipídicas del plasma materno.

Además, estos datos enfatizan el papel de los PL en el proceso de captación placentaria de ácidos grasos poliinsaturados, como el linoleico (figura 34) y poliinsaturados de cadena larga, como el DHA (figura 35).

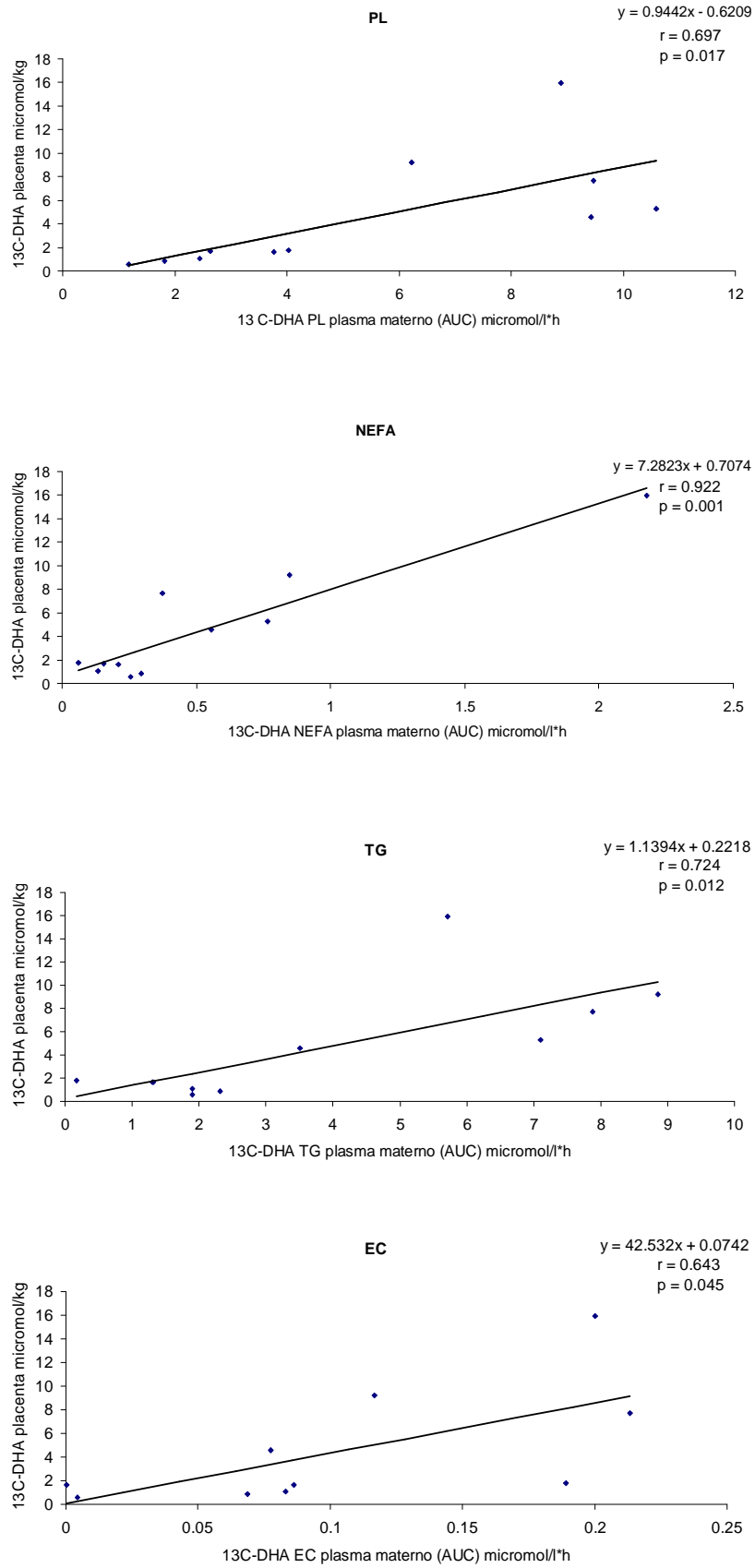


Figura 35. Correlación entre la concentración de $^{13}\text{C-DHA}$ en las fracciones lipídicas de plasma materno (AUC) y la concentración total de $^{13}\text{C-DHA}$ en la placenta.

La correlación de la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos, en las fracciones lipídicas del plasma materno, y su concentración total en placenta, reveló los mismos resultados tanto si se utilizaba el AUC de su concentración en plasma materno o simplemente su concentración en el momento del nacimiento (datos no mostrados).

4.9 Fracciones lipídicas y transferencia materno-fetal de los ácidos grasos marcados con ^{13}C .

Para estimar la influencia de la distribución de los ácidos grasos marcados en las fracciones lipídicas de plasma materno, sobre su grado de transferencia fetal, correlacionamos el AUC de la concentración de cada ^{13}C -ácido graso estudiado, en las fracciones lipídicas del plasma materno, con su concentración total en los lípidos del plasma de vena umbilical.

Sólo la correlación entre el AUC de la concentración del ácido ^{13}C -linoleico en fosfolípidos y ésteres de colesterol del plasma materno, y su concentración total en vena umbilical, resultó significativa (figuras 36 y 37). Así pues, la placenta modula de forma importante, el paso de los ácidos grasos entre ambos compartimentos, lo que remarca el papel crucial de este órgano en la redistribución y transferencia placentaria de ácidos grasos al feto.

Los resultados fueron similares si se correlaciona la concentración de los ácidos grasos marcados, en el momento de la cesárea, en lugar del AUC en el plasma materno (resultados no mostrados).

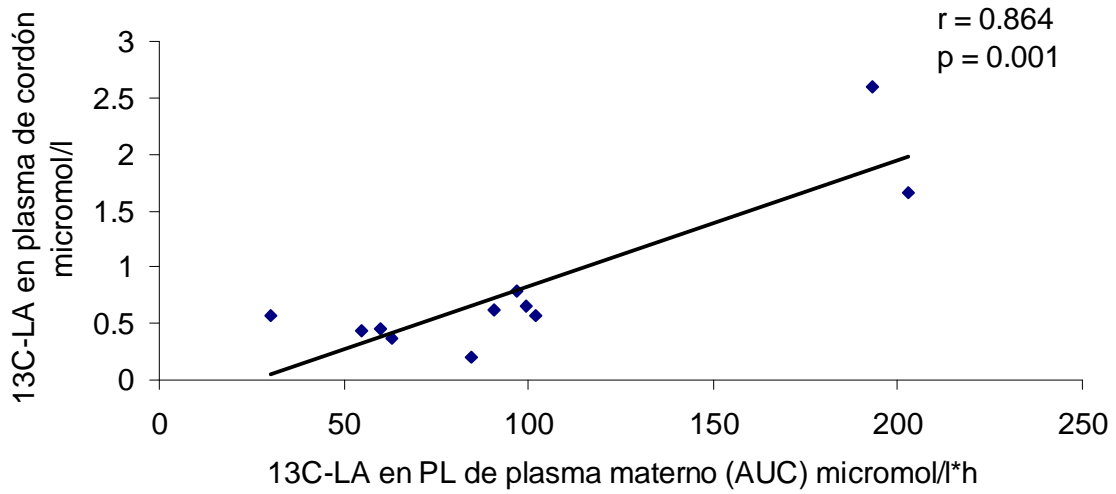


Figura 36. Correlación entre la concentración de $^{13}\text{C-LA}$ en los PL de plasma materno (AUC) y la concentración total de $^{13}\text{C-LA}$ en plasma de vena umbilical.

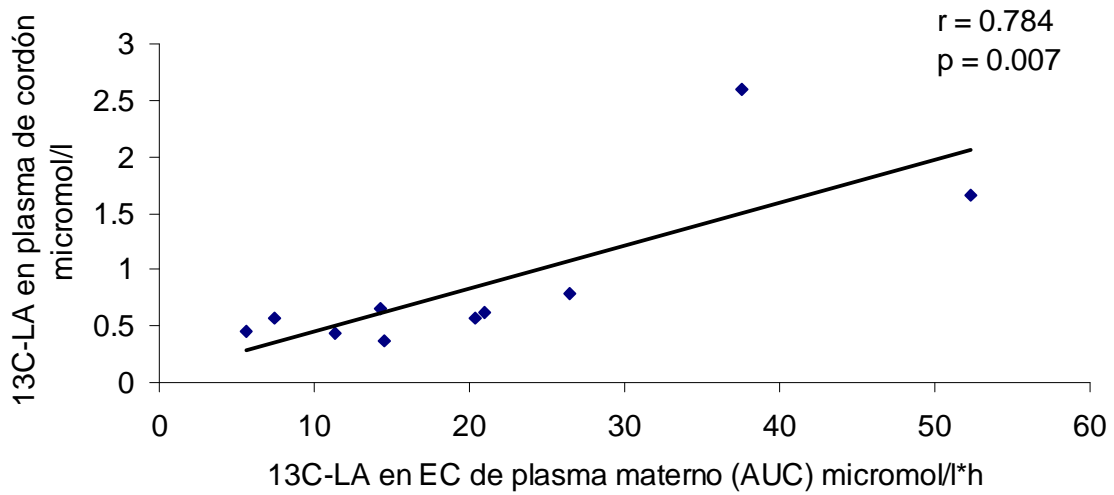


Figura 37. Correlación entre la concentración de $^{13}\text{C-LA}$ en los EC de plasma materno (AUC) y la concentración total de $^{13}\text{C-LA}$ en plasma de vena umbilical.



DISCUSIÓN

La utilización de ácidos grasos marcados con isótopos estables, en embarazadas, ofrece una posibilidad magnífica para evaluar *in vivo* el proceso de transferencia placentaria de ácidos grasos, en un sistema de compartimentos tan complejo, como el que ofrece el ser humano.

Se denominan isótopos estables aquellos que no se desintegran para formar otros elementos y, por tanto, no emiten radiación alguna. Un elemento químico es definido por el número de protones de su núcleo, pero el número de neutrones puede diferir, y esto origina lo que llamamos isótopo de un elemento. En el caso del carbono, su forma natural es el ^{12}C , su isótopo estable es el ^{13}C , y el radioactivo (prohibido su uso en humanos) es el ^{14}C . Los isótopos estables persisten en la naturaleza como tales y así, todos los animales los toman en los alimentos que ingieren, en el agua que beben y en el aire que respiran; en el caso del ^{13}C , este contribuye en un 1.1% al pool natural del carbono. Obviamente no hay evidencia de que su uso en dosis trazas presente un riesgo identificable en humanos y así, ha sido ampliamente utilizado en niños sin que se haya detectado ningún efecto adverso (148;149).

La utilización de un equipo de cromatografía de gases-combustión-espectrómetro de masas de isótopo ratio, permite cuantificar concentraciones muy pequeñas de los isótopos con gran precisión y sensibilidad, sin embargo no permite diferenciar entre moléculas que están ligeramente marcadas, de aquellas que están totalmente marcadas, por tanto, el ^{13}C -DHA endógeno sintetizado desde el α -linolénico y ^{13}C -acetyl-CoA (resultantes de la ruptura del ^{13}C -PA, ^{13}C -OA, ^{13}C -LA o ^{13}C -DHA) podrían incrementar los valores de concentración del ^{13}C -DHA (potencialmente en placenta y en el lado materno y fetal), dando un ratio equívocamente superior al resto de ácidos grasos marcados. Sin

embargo, podemos asumir razonablemente que, el enriquecimiento de los grupos Acetyl-CoA es escaso, debido a la dilución de los productos de ruptura de los ^{13}C -ácidos grasos en un pool endógeno enorme, a que la proporción de α -linolénico convertido en DHA es muy baja (150) y a que no se ha administrado ^{13}C - α -linolénico entre los compuestos ingeridos por las embarazadas, por lo que el error introducido es despreciable.

Los primeros estudios sobre transferencia placentaria de ácidos grasos se llevaron a cabo utilizando placentas perfundidas, y en ellos se describía que los ácidos grasos linoleico (LA) y palmítico (PA) en forma de NEFA, cruzaban la placenta en proporciones similares (151;152) y que el ácido linoleico era transferido de forma preferente a la circulación fetal, respecto al ácido araquidónico (AA) (153). Estudios posteriores, utilizando el mismo modelo de perfusión, objetivan que la placenta transfiere selectivamente, desde la circulación materna a la fetal, los ácidos grasos DHA> α -linolénico>linoleico>oleico >araquidónico (154). Sin embargo, el modelo de perfusión placentaria ofrece muchas limitaciones para evaluar el proceso de transferencia placentaria de ácidos grasos en humanos, al hacerse fuera del ambiente intrauterino, con distintas condiciones enzimáticas, con diferentes concentraciones de albúmina (155) y en el que la cantidad del compuesto estudiado afecta su tasa de transferencia (52) .

Larqué et al (54), administraron a cuatro mujeres gestantes, cuatro horas antes de una cesárea electiva, la misma mezcla de ^{13}C -ácidos grasos y a la misma dosis que en nuestro experimento. Sin embargo, en dicho estudio, los ^{13}C -ácidos grasos sólo se detectaron en triglicéridos y NEFA del plasma materno en un estado de concentración relativamente estable, tras cuatro horas desde la ingestión de los compuestos marcados, mientras que los ^{13}C -ácidos grasos se detectaron débilmente en fosfolípidos y no se identificaron en ésteres de colesterol del plasma materno. Ello podría limitar de forma importante la transferencia placentaria de estos ácidos grasos al feto, ya que no se pudo evaluar el efecto de los ácidos grasos esterificados en fracciones lipídicas maternas tan importantes como los fosfolípidos o ésteres de colesterol.

Es muy difícil encontrar un momento para realizar la cesárea, en el que todos los ^{13}C -ácidos grasos hayan alcanzado un estado estable y similar en todas las fracciones

lipídicas del plasma materno, ya que cada ácido graso y cada fracción lipídica presenta una cinética diferente de incorporación y eliminación (aparición y desaparición). Además, la dificultad se agrava también, al necesitar un momento para realizar la cesárea que incluya el proceso de captación placentaria de ^{13}C -ácidos grasos y su liberación al cordón umbilical. Por tanto, ya que el estudio de cuatro horas no permitió detectar en sangre materna los ^{13}C -ácidos grasos en fosfolípidos ni ésteres de colesterol, ni evaluar los procesos más lentos del intercambio lipídico, decidimos extender el tiempo entre la aplicación del trazador y la cesárea a 12 horas.

Con la metodología empleada en este estudio, en el momento de la cesárea, tras 12 horas desde la ingestión de los ^{13}C -ácidos grasos, observamos su incorporación en todas las fracciones lipídicas del plasma materno, placenta y cordón umbilical (figuras 20-25). Este dato nos permite concluir que, el presente diseño experimental es adecuado para evaluar la transferencia placentaria de ácidos grasos en humanos, *in vivo*. Además, con este diseño, hemos confirmado la captación placentaria preferencial de DHA respecto al resto de ácidos grasos (figuras 28 y 29), y demostrado por primera vez, en humanos, *in vivo*, la transferencia preferencial del DHA a sangre fetal, respecto al resto de ácidos grasos (figuras 30 y 31).

Para evaluar la transferencia de los diferentes ^{13}C -ácidos grasos, es de gran ayuda conocer, la cinética de transferencia desde las fracciones lipídicas del plasma materno, plasma umbilical y placenta, para lo que es necesario conocer las variaciones en su concentración, a lo largo del tiempo. En el contexto clínico del estudio, durante las 12 horas previas a la cesárea programada, por razones éticas y a fin de no alterar demasiado el sueño de las participantes, no fue posible la toma de muestras a las embarazadas durante toda la noche, limitándonos a la extracción de muestras tres horas antes de la intervención. Por tanto, el área bajo la curva (AUC) de las fracciones lipídicas de cada ácido graso estudiado, sólo se pudo inferir de los datos obtenidos en las 3 horas previas a la cesárea, y en consecuencia asumimos, en el análisis de los datos, que el AUC de la concentración total de los ácidos grasos marcados, es proporcional al área calculada con los datos disponibles. Además, cabe mencionar que las muestras de sangre de cordón y de placenta, sólo pueden ser tomadas en el momento del nacimiento, existiendo, por tanto, limitaciones

en el análisis de los datos y en su interpretación. Estas limitaciones, totalmente justificadas, excluyen la posibilidad de calcular las tasas de transferencia absolutas y sólo permiten la comparación entre los diferentes ácidos grasos estudiados, en el momento de la cesárea.

Se considera que la transferencia materno-fetal de ácidos grasos, depende en parte de gradientes de concentración a través de la placenta (156), que mejoran gracias a la hiperlipemia materna (157). Este estudio confirma concentraciones superiores de ácidos grasos en plasma materno, respecto a plasma fetal (tabla 9), compatible con un gradiente de concentración que dirige el flujo de los ácidos grasos desde la madre hacia el feto. Los porcentajes de DHA, superiores en plasma de cordón respecto al plasma materno (tabla 11), se encuentran en el rango descrito previamente por otros autores (47;54;157), y están de acuerdo con una transferencia preferencial de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) a la circulación fetal.

Los porcentajes más elevados de DHA en sangre de cordón que en sangre materna parecen reflejar una transferencia placentaria preferencial de este ácido graso para alcanzar los requerimientos fetales (51;158). Sin embargo desde el dato de simples porcentajes no se puede deducir que sea por una transferencia preferencial de estos compuestos al feto, ya que el feto puede haber utilizado en mayor proporción los otros ácidos grasos, afectándose así el porcentaje del resto de compuestos. La evidencia del papel de la placenta en la captación preferencial de los LCPUFA y su acumulación en los tejidos fetales surgió de las investigaciones *in vitro* de las características de unión de los ácidos grasos, a los trofoblastos y células BeWo. Campbell et al (159), utilizando cuatro ácidos grasos diferentes, linoleico (LA), α -linolénico (ALA), araquidónico (AA) y oleico (OA), describió *in vitro*, que los lugares de unión de la membrana placentaria, presentaban mayor preferencia por los LCPUFA. Además, en estudios de suplementación con DHA en embarazadas, los porcentajes de DHA en los lípidos del plasma fetal se correlacionaron con los niveles de expresión del m-RNA de la proteína transportadora FATP-4 en el tejido placentario (80). Estas observaciones concuerdan con el experimento previo de Larqué et al (54), utilizando ácidos grasos marcados con ^{13}C cuatro horas antes de la cesárea, y con nuestro estudio, con un intervalo de 12 horas desde la ingestión de los compuestos, en los que se observa una proporción significativamente mayor de ^{13}C -DHA en placenta, respecto

al resto de ^{13}C -ácidos grasos investigados (figuras 28 y 29). Nosotros hemos demostrado en este trabajo, que la placenta incorpora preferentemente ^{13}C -DHA respecto al resto de ácidos grasos y, que esta transferencia preferente del ^{13}C -DHA también se observa en sangre venosa de cordón, 12 horas tras la administración a la madre de los compuestos marcados (figuras 30 y 31). Además, el ratio entre el ^{13}C -DHA placentario y el ^{13}C -DHA de plasma materno, aumenta con el tiempo (0.27 ± 0.04 a las 4 horas vs 38.81 ± 6.53 a las 12 horas). Este resultado indica que, la acumulación preferente de DHA en la placenta es un proceso lento, que se extiende más allá de cuatro horas, durando al menos, 12 horas.

Los ácidos grasos del plasma materno liberados por las lipasas placentarias, se unen a las proteínas transportadoras situadas en la membrana microvillositaria y son transportados al interior del sincitiotrofoblasto. Por tanto, la proporción significativamente mayor de ^{13}C -DHA en placenta, respecto al resto de ^{13}C -ácidos grasos investigados, está en consonancia con una captación selectiva de estos ácidos grasos sugerido para la proteína transportadora placentaria p-FABPpm por el DHA, descrita por otros autores (76;160). No obstante, también se podría producir por un metabolismo diferencial para este ácido graso en el tejido placentario.

La concentración específica de los ácidos grasos, en las diferentes fracciones lipídicas del plasma materno, puede tener importantes repercusiones en su transferencia al feto. En el presente estudio observamos el enriquecimiento de todos los ^{13}C -ácidos grasos en triglicéridos y NEFA del plasma materno (figura 20), lo que está en consonancia con el mecanismo clásico de captación placentaria de ácidos grasos mediado por la lipoproteína lipasa (LPL). A pesar de que las concentraciones plasmáticas de triglicéridos aumentan considerablemente durante el embarazo (7), los triglicéridos del plasma humano contienen concentraciones mucho más bajas de LCPUFA que los fosfolípidos (161). Así, nuestros datos muestran que la concentración materna del DHA es más alta en los fosfolípidos del plasma materno (83.53 ± 7.04 mg/l), que en los triglicéridos del plasma materno (9.3 ± 1.7 mg/l) (tabla 10).

La concentración de los ^{13}C -ácidos grasos saturados (representados por el ácido ^{13}C -palmítico, ^{13}C -PA) y monoinsaturados (representados por el ácido ^{13}C -oleico, ^{13}C -OA)

fue mayor en los triglicéridos maternos, mientras que los ^{13}C -ácidos grasos poliinsaturados (representados por el ácido ^{13}C -linoleico, ^{13}C -LA) y poliinsaturados de cadena larga (representados por el ácido ^{13}C -docosahexaenoico, ^{13}C -DHA) se encontraron fundamentalmente en fosfolípidos y triglicéridos (figura 20). Además, se observó una mayor tendencia a la incorporación del ^{13}C -DHA en los fosfolípidos del plasma materno que el ^{13}C -LA. En consonancia con nuestros resultados, Burdge GC et al (39) describieron que, durante el embarazo, el DHA se enriquecía preferentemente en los fosfolípidos, reflejando una regulación hepática del metabolismo de los LCPUFA n-3, posiblemente envuelta en la transferencia preferente del DHA a la placenta.

Ya que la información disponible sobre la enzima lipoproteína lipasa (LPL) de la placenta, no indica que la enzima discrimine entre los distintos ácidos grasos, esta vía no explica la captación placentaria preferente del ^{13}C -DHA respecto al resto de ^{13}C -ácidos grasos. Recientemente, la presencia de otra enzima, miembro de la familia génica de la TG lipasa, la endotelial lipasa (EL), ha sido descrita en ambas caras de la placenta humana y en las células del endotelio vascular (65). EL es ante todo, una fosfolipasa A1 con una capacidad reducida para liberar los ácidos grasos insaturados esterificados en la posición sn-2 de los fosfolípidos (162). Los ácidos grasos saturados, como hemos descrito en la introducción, se encuentran fundamentalmente en la posición sn-1 de los fosfolípidos, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se encuentran típicamente esterificados en la posición sn-2 (65). Así pues, la acción de EL produciría un NEFA y un lisofosfolípido enriquecido en LCPUFA. Gauster et al (162) propuso que el grado de insaturación y la longitud de la cadena del ácido graso de los fosfolípidos, afecta a la capacidad de la EL para escindir dichos ácidos grasos. Así, la EL es capaz de liberar el LCPUFA ácido araquidónico (20:4 n-6, AA), desde fosfatidilcolina en las HDL₃, 4.5 veces más lento que cuando dicho fosfolípido contiene su precursor, el ácido graso esencial linoleico (18:2 n-6, LA). La EL muestra gran selectividad por las especies de fosfolípidos que contengan DHA en la posición sn-2 y genera lisofosfolípidos ricos en DHA (163).

La actividad EL placentaria podría ser importante ya que una mujer embarazada con deficiencia en LPL da a luz a bebés de peso normal, indicando que la placenta puede transferir ácidos grasos en cantidad suficiente para permitir el desarrollo de un recién

nacido de peso normal, incluso en ausencia de actividad LPL (164). Un estudio en ratones ha demostrado recientemente que la EL puede compensar la ausencia de LPL en el tejido adiposo y mediar la captación de NEFA en este tejido (165). Además, se ha descrito una mayor expresión de EL en ratones con deficiencia de LPL (63).

Parece que la actividad EL incrementaría los niveles plasmáticos maternos de lyso-fosfolípidos enriquecidos en LCPUFA. Estos lyso-PL podrían ser una fuente adicional de ácidos grasos para la placenta, de forma similar a lo que ocurre en el cerebro. El cerebro es un tejido muy rico en DHA, en el que la lyso-fosfatidilcolina (lyso-PC), representa, en comparación a los NEFA, una mayor capacidad de transporte de DHA (66;67). De forma similar, los lyso-PC suministran de forma más eficiente el ^{13}C -DHA a los eritrocitos que los NEFA (68). Además, se ha postulado que los eritrocitos, que captan en su membrana lyso-PC, podrían tener un papel en el transporte de LCPUFA a la placenta, al actuar como partículas capaces de almacenar y liberar LCPUFA (166).

Los Lyso-PL también podrían contribuir a la formación de los fosfolípidos de la membrana placentaria, como sucede en la mucosa intestinal (167). Klinger et al (168) describió que, los fosfolípidos constituyen la principal fracción lipídica del tejido placentario ($87.5 \pm 4.2\%$), seguido de NEFA>triglicéridos>ésteres de colesterol. De forma similar observamos, en nuestro estudio, una mayor concentración de ^{13}C -ácidos grasos en los fosfolípidos de la placenta, que en el resto de las fracciones lipídicas (361.19 ± 24.32 mg/kg en fosfolípidos, 26.43 ± 6.98 mg/kg en NEFA, 15.09 ± 3.1 mg/kg en triglicéridos y 4.06 ± 0.51 mg/kg en ésteres de colesterol) (figura 23).

Para estimar la influencia de la distribución de los ácidos grasos marcados en las fracciones lipídicas de plasma materno, sobre su grado de captación placentaria, correlacionamos el AUC de la concentración materna de cada ^{13}C -ácido graso estudiado, en cada fracción lipídica, con la concentración total de dicho ácido graso marcado, en los lípidos de la placenta. Así, la concentración del ácido ^{13}C -palmítico y ácido ^{13}C -oleico en triglicéridos del plasma materno se correlacionó significativamente con su concentración total en los lípidos de la placenta (PA: $r=0.836$, $p=0.001$ –figura 32-y OA: $r=0.727$, $p=0.011$ –figura 33-), sugiriendo que estos ácidos grasos son captados principalmente, tras

ser liberados por la LPL. Por otra parte, la concentración del ácido ^{13}C -linoleico en los fosfolípidos del plasma materno, se correlacionó significativamente con su concentración en placenta ($r=0.793$ y $p=0.004$ –figura 34-), sugiriendo que este ácido graso es captado principalmente, tras la acción de la enzima EL sobre los fosfolípidos. Por último, en el caso del ácido ^{13}C -docosahexaenoico, la correlación entre su concentración, en las fracciones lipídicas del plasma materno y su concentración total en placenta, resultó significativa para todas las fracciones lipídicas maternas (PL: $r=0.697$, $p=0.017$; NEFA: $r=0.922$, $p=0.001$; TG: $r=0.724$, $p=0.012$ y EC: $r=0.643$, $p=0.045$ –figura 35-), sugiriendo que, posiblemente el DHA alcanza un enriquecimiento placentario preferente, en comparación con los ácidos grasos esenciales parentales, mediante su captación preferente por transportadores placentarios desde el plasma materno (57;77;80), y por su gran liberación por la LPL desde los triglicéridos del plasma materno y/o mediante la enzima EL, u otros posibles mecanismos no totalmente aclarados para el transporte de ácidos grasos.

Para estimar la influencia de la distribución de los ácidos grasos en las fracciones lipídicas de plasma materno, sobre su grado de transferencia fetal, correlacionamos el AUC de la concentración materna de cada ^{13}C -ácido graso estudiado, en cada fracción lipídica, con la concentración total de dicho ácido graso marcado en los lípidos del plasma de cordón umbilical. Sólo la concentración del ácido ^{13}C -linoleico en los fosfolípidos y ésteres de colesterol del plasma materno, se correlacionó significativamente con su concentración en plasma de cordón (PL: $r = 0.864$, $p = 0.001$ –figura 36- y EC: $r = 0.784$, $p = 0.007$ –figura 37-). Este hecho podría explicarse por el gran procesamiento que sufren los ácidos grasos en el interior de la placenta, que dificulta la correlación de sus concentraciones en sangre materna y fetal, así como por el escaso número de pacientes de la muestra, que podría limitar una correlación estadísticamente significativa. Szabo et al (169) estimó que tras 2 horas de incubación de tejido placentario humano con ^{14}C -palmitato, el 20% se esterificó en los triglicéridos placentarios. Crabtree et al (170) utilizando células BeWo de coriocarcinoma placentario humano como modelo *in vitro* describió que casi el 60% del (^3H)-DHA captado por las células fue esterificado en los triglicéridos, mientras que el 37% lo hizo en los fosfolípidos. Por otro lado, los NEFA en la placenta constituyen una fracción lipídica cuantitativamente muy pequeña, por lo que los NEFA que son liberados posteriormente a la circulación fetal podrían originarse de la actividad placentaria A2

fosfolipasa y triglicérido hidrolasa (76). La acción diferente de estas enzimas sobre los ácidos grasos, también podría explicar las diferencias encontradas entre las correlaciones.

Nuestro estudio muestra por primera vez, una mayor concentración de ^{13}C -DHA en plasma fetal respecto a plasma materno (figuras 30 y 31), en comparación con otros ^{13}C -ácidos grasos, en humanos, *in vivo*. Este resultado sugiere la transferencia materno-fetal preferente del DHA, respecto a otros ^{13}C -ácidos grasos, asociado a una acumulación preferente de ^{13}C -DHA en el tejido placentario (figuras 28 y 29). Haggarty et al (52) describieron en placentas humanas perfundidas que, la composición de la perfusión modifica de forma importante la transferencia de los ácidos grasos; cuando la placenta fue perfundida con los ácidos grasos en la misma proporción encontrada en los triglicéridos del plasma materno, en el tercer trimestre de gestación, la selectividad de transferencia fue DHA > α -linolénico > linoleico > araquidónico, sin embargo, cuando la placenta fue perfundida con los ácidos grasos en la misma proporción encontrada en los NEFA del plasma materno, en el tercer trimestre de gestación, la selectividad de transferencia cambió a DHA > araquidónico > α -linolénico > linoleico. Así pues, este estudio con isótopos estables permite de una forma más realista la evaluación de la transferencia de estos compuestos durante la gestación, y queda definitivamente demostrada en humanos.

Como hemos mencionado anteriormente, nuestro estudio no permite conocer cuantitativamente el flujo de ácidos grasos que se incorporan a la circulación fetal o que son retirados de la misma, al tener sólo un dato de concentración en plasma fetal. Esta limitación implica no poder decidir, en base a los datos experimentales, si la mayor concentración del ^{13}C -DHA en plasma fetal, respecto al resto de ^{13}C -ácidos grasos, se debió a una mayor transferencia placentaria del DHA o a una tasa de eliminación del mismo, en plasma fetal por los tejidos, más baja, respecto al resto de ácidos grasos. Sin embargo si que hemos podido demostrar que la placenta se enriquece selectivamente en DHA, respecto al resto de ácidos grasos, en un proceso lento de al menos 12 horas, que podría favorecer su transferencia preferencial al feto.

Hasta donde sabemos, no existe actualmente información disponible sobre la incorporación a los tejidos del feto, de los ácidos grasos estudiados, a partir del plasma

fetal o sobre su tasa de oxidación. En nuestro estudio, en el momento de la cesárea, al comparar la diferencia de concentración venosa-arterial de los ^{13}C -ácidos grasos, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ellos (figura 27). Por tanto, en la interpretación de nuestros datos asumimos que, la eliminación de los ^{13}C -ácidos grasos del plasma fetal y el potencial flujo de los ^{13}C -ácidos grasos desde los tejidos fetales al plasma fetal, fue similar para todos los ácidos grasos estudiados.

Es ampliamente conocido que el DHA es requerido en cantidades considerables para la síntesis del tejido nervioso y el cerebro fetal (118;171), y que el depósito rápido de LCPUFA ocurre durante la fase de desarrollo cerebral rápido, que se inicia en el tercer trimestre de gestación y continúa durante los dos primeros años de vida (118;172). Además, los bebés que consumen fórmulas carentes de LCPUFA, presentan niveles de DHA en plasma más bajos, que aquellos que se alimentan con leche materna, enriquecida de forma natural en DHA y otros LCPUFA (137;173). Por tanto, la acumulación del ^{13}C -DHA en el plasma fetal debido a una acumulación o metabolización relativamente baja por los tejidos fetales no parece plausible (118;171).

Nuestro estudio muestra por primera vez una transferencia de DHA preferente desde el plasma materno al feto, en humanos, *in vivo*. La mayor acumulación de este ácido graso en la placenta podría ser uno de los mecanismos que explican la transferencia preferente de ^{13}C -DHA a la circulación fetal, respecto al resto de ácidos grasos estudiados. Los factores nutricionales durante el desarrollo precoz no sólo tienen efectos a corto plazo en la fisiología, el crecimiento y la composición corporal, sino que también se asocian a efectos a largo plazo sobre la salud del individuo y el desarrollo de enfermedades en la edad adulta, fenómeno conocido como programación metabólica (140;141). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la provisión de DHA debe ser crucial para el desarrollo del feto, y resultan de gran valor para comprender el proceso tan complejo, de transferencia placentaria de ácidos grasos, en humanos. Conocer mejor los mecanismos que regulan el transporte de ácidos grasos, resulta fundamental para asegurar una adecuada nutrición en la embarazada, esencial para la futura salud del neonato.



CONCLUSIONES

1. La concentración de los ácidos grasos estudiados es mayor en plasma materno que en plasma fetal, tanto si analizamos su concentración en el total de ácidos grasos o por fracciones lipídicas, lo que es compatible con un gradiente de concentración que dirige el flujo de los mismos desde el compartimento materno al fetal.
2. Los porcentajes de ácido palmítico (PA, 16:0) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) se encuentran en mayor cantidad en plasma fetal en comparación con plasma materno, lo que no ocurre para los ácidos oleico (OA, 18:1n-9) y linoleico (LA, 18:2n-6). Si consideramos que la capacidad de síntesis del DHA (22:6n-3) en el feto es muy limitada, este dato señala una biomagnificación en la transferencia de este ácido graso a través de la placenta.
3. Los ^{13}C -ácidos grasos se distribuyen en el plasma materno en diferentes fracciones lipídicas, lo que podría afectar a su captación placentaria. El ^{13}C -palmítico y ^{13}C -oleico se esterifican principalmente en los triglicéridos maternos, mientras que ^{13}C -linoleico y, sobre todo, ^{13}C -docosahexaenoico en fosfolípidos y triglicéridos maternos.
4. En placenta, la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos analizados, es mayoritaria en los fosfolípidos, lo que se explica porque la placenta es un tejido fundamentalmente rico en membranas.

5. La diferencia de concentración venosa-arterial entre los ácidos grasos marcados con ^{13}C , en el momento del nacimiento, no muestra diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, el tiempo entre la ingesta de los ácidos grasos marcados y la cesárea (12 horas), no permite detectar diferencias en la captación de los ácidos grasos por los tejidos fetales.
6. La relación entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en plasma materno y su concentración en el tejido placentario es significativamente superior para el ^{13}C -DHA, respecto al resto de ^{13}C -ácidos grasos. Este dato señala una captación placentaria preferencial para este ácido graso, siendo un proceso lento que dura, al menos, 12 horas.
7. La relación entre la concentración de los ^{13}C -ácidos grasos en plasma de vena de cordón y su concentración en el plasma materno es significativamente superior para el ^{13}C -DHA, respecto al resto de ^{13}C -ácidos grasos. Este dato señala una transferencia materno-fetal preferente para este ácido graso, posiblemente mediado por la captación preferencial del DHA por la placenta.
8. La concentración del ácido ^{13}C -palmítico y ácido ^{13}C -oleico en TG del plasma materno se correlacionó significativamente con la concentración total de dichos ácidos grasos en los lípidos de la placenta, señalando el papel de esta fracción lipídica en el proceso de captación placentaria de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, posiblemente mediado por la enzima lipoproteína lipasa.
9. La concentración del ácido ^{13}C -linoleico en PL del plasma materno, se correlacionó significativamente con su concentración total en los lípidos de la placenta, apuntando el papel de esta fracción lipídica en su captación placentaria, posiblemente mediado por la enzima endotelial lipasa.
10. En el caso del ácido ^{13}C -docosahexaenoico, la correlación entre su concentración en las fracciones lipídicas del plasma materno y su concentración total en placenta, resultó significativa para todas las fracciones lipídicas. Este hecho refuerza la idea

de que este ácido graso es captado preferentemente por la placenta desde todas las fracciones lipídicas en las que está esterificado y apoya la hipótesis de que pudiera existir una proteína en la placenta que captara selectiva y preferentemente el DHA respecto al resto de ácidos grasos.

11. Sólo la correlación entre la concentración del ácido ^{13}C -linoleico en fosfolípidos y ésteres de colesterol del plasma materno, y su concentración total en vena umbilical, resultó significativa. Así pues, la placenta modula de forma importante, el paso de los ácidos grasos entre ambos compartimentos, lo que remarca el papel crucial de este órgano en la redistribución y transferencia placentaria de ácidos grasos al feto.

CONCLUSIÓN GENERAL

Nuestro estudio demuestra en humanos, in vivo, la captación y transferencia placentaria preferente del DHA respecto al resto de ácidos grasos, desde el plasma materno al fetal. Estos resultados parecen apoyar la importancia que este ácido graso tiene en el desarrollo fetal. El aporte de DHA durante la gestación resulta crucial para la correcta maduración neurológica y visual, necesaria para la adquisición de habilidades cognitivas, imprescindibles a lo largo de la vida.

1. The concentration of the studied fatty acids was higher in maternal plasma than in fetal plasma, expressed both as total fatty acid concentrations and per lipid fraction, which is compatible with a gradient-driven fatty acid flux from mother to fetus.
2. Palmitic acid (PA, 16:0) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) percentages were higher in fetal plasma than in maternal plasma, but not in the case of oleic acid (OA, 18:1n-9) or linoleic acid (LA, 18:2n-6). Since fetal DHA synthesis capacity is limited, this finding points to a biomagnification process in the transfer of DHA through the placenta.
3. ^{13}C -Fatty acids were distributed in different fractions in maternal plasma, which may influence the placental uptake of the same. ^{13}C -palmitic acid and ^{13}C -oleic acid were esterified, mainly in maternal plasma triglycerides, while ^{13}C -linoleic acid and ^{13}C -docosahexaenoic acid were mainly transported by maternal plasma phospholipids.
4. In placental tissue, ^{13}C -fatty acids were primarily found in phospholipids, which may be explained by the higher proportion of membranes in the structure of this tissue.
5. The difference in ^{13}C -fatty acid concentration between umbilical artery and umbilical vein at birth were not statistically significant. The time between the tracer

intake and the caesarean section (12 h) may have been insufficient to detect differences in fatty acid uptake by fetal tissues.

6. The ratio between ^{13}C -fatty acid concentrations in maternal plasma and placental tissue was significantly higher in the case of ^{13}C -DHA than for the other ^{13}C -fatty acids. This suggests the preferential placental uptake of DHA over PA, OA and LA, in a slow process that takes at least 12 hours.
7. The ratio between ^{13}C -fatty acid concentration in maternal plasma and umbilical vein plasma was significantly higher in the case of ^{13}C -DHA than for the other ^{13}C -fatty acids, suggesting a preferential maternal-fetal DHA transfer that might be mediated by a preferential DHA placental uptake.
8. Both ^{13}C -palmitic acid and ^{13}C -oleic acid concentrations in maternal triglycerides were significantly correlated with their concentration in placental lipids, underlining the role of this lipid fraction for the placental uptake of saturated and monounsaturated fatty acids. This uptake could be mediated by lipoprotein lipase activity.
9. ^{13}C -linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids was correlated with its concentration in placental lipids. This result emphasizes the role of PL in the placental uptake of linoleic acid, perhaps mediated by endothelial lipase activity.
10. The concentration of ^{13}C -docosahexaenoic acid in placenta was significantly correlated with DHA from all the maternal plasma lipid fractions. This correlation indicates that this fatty acid is preferentially taken up by the placenta from all maternal plasma lipid fractions. This result supports the hypothesis of a potential fatty acid binding protein that could selectively take this fatty acid from the maternal circulation.

11. Only the ^{13}C -linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids and cholesterol esters was correlated with ^{13}C -linoleic acid in umbilical vein lipids. Thus, the placenta modulates fatty acid exchange between maternal and fetal compartments, in a different way for each fatty acid, underlining the relevance of this tissue in fatty acid distribution and transfer to the fetus.

GENERAL CONCLUSION

Our research demonstrates in humans *in vivo*, a preferential placental uptake and transfer of DHA compared with other fatty acids. These results underline the importance of this fatty acid for fetal growth. DHA provision during pregnancy is crucial for the optimum visual and neurological development of the neonate, which is of major importance for acquiring cognitive skills that are essential during life.



SUMMARY

INTRODUCTION

The potential of the early diet for modulation of the normal trajectory of brain development is of great interest. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), particularly docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3/omega 3), are found in high proportions in structural lipids of the central nervous system, where they are critically important for an extensive array of membrane associated functions (112;115;116). Fetal tissue deposition of LC-PUFA depends on the quantity and composition of fatty acids (FA) delivered via the placenta. However, the mechanisms involved in the placental transfer of FA and the influence of maternal diet are not fully understood.

Placental lipoprotein lipase (LPL) hydrolyses maternal plasma triglycerides (TG) into non-esterified fatty acids (NEFA) for placental uptake and transfer (57;76). Endothelial lipase (EL) has recently been demonstrated in human placenta at term with even higher mRNA expression than LPL (69). The high phospholipase activity of EL (162;174) raises the question which quantitative contribution different lipid fractions provide for placental FA uptake and transfer to the fetus.

NEFA hydrolysed from esterified lipids may enter placenta cells through passive diffusion or a saturable protein-mediated transfer mechanism involving plasma membrane fatty-acid binding protein (FABPpm/GOT2), fatty acid translocase (FAT/CD36), fatty acid transport proteins (FATP), and fatty acid binding proteins (FABP) (57;76;77). Differences in the affinity of placental FA carriers towards individual FA may contribute to their rates of materno-fetal transfer. While proportions of essential fatty acids are lower in lipids of cord than of maternal plasma, LC-PUFA percentages are higher in cord plasma than in

maternal plasma lipids (47;51;171) which points towards a preferential placental transfer of these FA. On the other hand, it is well described the rapid accretion of LC-PUFA that occurs during brain growth spurt (2, 13).

Larqué *et al* previously reported a preferential uptake of ^{13}C -DHA by the placenta at term relative to the studied saturated (palmitic acid, PA, 16:0), monounsaturated (oleic acid, OA, 18:1 n-9) and essential (linoleic acid, LA, 18:2 n-6) fatty acids 4 h after their oral application, but they could not demonstrate a preferential appearance of ^{13}C -DHA in cord blood during this period (54). Using a prolonged sampling schedule we now aimed to detect preferential transfer of ^{13}C -DHA from the mother to the fetus, as already detected in placental tissue. In this previous study no incorporation of tracer into maternal phospholipids (PL) and cholesterol esters (CE) was detected and thus, any indication for a role of these maternal plasma lipid fractions in providing substrates for placental transfer was found. For studying the possible contribution of maternal plasma PL FA as well as other slow turnover pools to placental transfer, we extended the time period between tracer administration and cesarean section in this study.

The aim of the current study was to optimise a protocol for the evaluation of placental transfer of FA in healthy pregnant women by using a longer time interval between tracer application and elective caesarean section of 12 h. The different distribution of each labelled FA in maternal circulation, placenta and fetal circulation could help to improve the understanding of the mechanism involved in the placental transfer of FA.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Eleven pregnant women undergoing elective caesarean section were recruited for the study in the Service of Gynecology & Obstetrics, Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain). Recruitment of patients started in February 2006 and was completed in December 2007. Participants fulfilled the following inclusion criteria: singleton pregnancy

at term, age 18 to 40 years, non smoking and body mass index at the beginning of pregnancy lower than 30 kg/m^2 , and fetal Doppler scan within the normal reference range on the day before the cesarean section (175). All subjects habitually consumed an omnivorous diet, and none reported any health problems or pregnancy complications. Subjects consuming DHA supplements during pregnancy were excluded. The study protocol was approved by the local Ethical Committee. Written informed consent was obtained from all participating women after careful explanation of the study.

Twelve hours before delivery, the subjects received one oral dose of uniformly ^{13}C -labeled fatty acids (Martek, Bioscience, Columbia, MD) with 0.5 mg/kg body weight of ^{13}C -PA, 0.5 mg/kg of ^{13}C -OA, 0.5 mg/kg of ^{13}C -LA and 0.1 (99 % ^{13}C enrichment) or 0.01 (10 % ^{13}C enrichment) mg/kg of ^{13}C -DHA. Tracers were supplied as free fatty acids to the pregnant women on a sugar cube. The women remained otherwise fasted until caesarean section.

The behaviour of the tracer was the same in the patients receiving ^{13}C -DHA enriched at 10% than in those receiving the ^{13}C -DHA enriched at 99%, thus, we decided to combine the results of all the patients. The DHA at 99% ^{13}C enriched gave higher APE values than those at 10% enrichment, but it did not effect evaluating ratios between compartments at all; on other hand, for the results on concentration of ^{13}C -FA in only 1 compartment, the graphs showed absolutely the same trend of incorporation for DHA in lipid fractions using DHA at 10% that at 99%.

Blood and placenta sampling

Blood samples were collected from the mothers before tracer intake (-12 h) and at -3, -2, -1, 0 and +1 h relative to the time of caesarean section. Venous cord blood was sampled immediately after clamping the cord. Blood cells and plasma were separated within 1 h by centrifugation at $1000 \times g$ for 5 min. An aliquot of at least $200 \mu\text{L}$ plasma was frozen subsequently at -80°C for later analysis.

The total placenta was weighed immediately after delivery. Samples of $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}$ of placental central cotyledons were cut with a sharp knife. Placenta samples were subjected

to three washings with cold 0.9% NaCl solution until blood was eliminated as far as possible and were frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until later analysis. Processing of placenta samples was completed within 10 minutes or less after delivery.

Analysis of plasma and placenta fatty acids

FA from plasma and placental tissue were extracted using a modification of the Folch method (16). The lipid extract was taken to dryness under reduced pressure and the residue was taken up in 400 μL chloroform/methanol (1:1) for application on silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany). PL, TG, CE and NEFA were isolated by development of the plates in n-heptane/ diisopropylether/glacial acetic acid (60:40:3, by vol) (144). From the individual fractions FA methyl esters were synthesised in 3M methanolic HCl (Supelco, Bellefonte, PA, USA) by heating to 85°C for 45 min. Methyl esters were extracted into hexane and stored in hexane containing butylated hydroxytoluene as antioxidant at -20°C until gas chromatographic analysis.

Gas chromatography was performed on a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a BPX70 column (SGE, Weiterstadt, Germany) with 60 m length and 0.32 mm inner diameter (176). The ^{13}C -enrichment of individual fatty acid methyl esters was measured by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (Hewlett-Packard GC interfaced to a Finnigan MAT delta S mass spectrometer, Bremen, Germany) (176).

Expression of results

From the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of the samples measured by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, the ^{13}C atom percent excess (APE), representing the ^{13}C -enrichment (the percentage contribution of tracer ^{13}C to total carbon), were calculated (142). The concentration of the labelled fatty acids ($\mu\text{mol/L}$ or nmol/g) was calculated by multiplying the absolute concentrations of the fatty acids by their APE values.

The tracer FA transfer from the mother to the fetus was estimated as the percentage of tracer concentration ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/L}$) in venous cord blood relative to the area under the tracer concentration curve (AUC; $\mu\text{mol } ^{13}\text{C/L}$) in the maternal plasma at delivery.

The ratio of distribution of ^{13}C -tracer between placental tissue and AUC maternal plasma was calculated as the percentage of the tracer concentration in placenta ($\text{nmol } ^{13}\text{C/g}$) relative to the area under the tracer concentration curve ($\mu\text{mol } ^{13}\text{C/L}$) in the maternal plasma at delivery.

Statistics

Results are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. The comparison among ratios of distribution, FA lipid fractions or proportions of different FA was assessed using ANOVA followed by the *post hoc* Bonferroni procedure. The ^{13}C -fatty acid concentration in maternal plasma lipid fractions (AUC), were correlated with their total concentration in placenta and cord plasma using the Pearson correlation. The significance level was set to $P < 0.05$. All analyses were performed with the statistical software SPSS, version 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Table 5 shows the main anthropometric characteristics of the 11 participants. One of them was primigravida and the rest were multiparous.

Table 6 shows the biochemical parameters of the subjects before receiving the tracer isotopes. None of them had lipid disorders, but as expected due to the maternal physiological hypertriglyceridemia during late pregnancy, we found higher values for serum maternal cholesterol and tryglicerides than lab reference ranges for non pregnant women. The day before the caesarean section, the fetal and Doppler scanning were normal (146;147) for all the subjects (Table 7).

^{13}C -Fatty acids (FA) were detected in all lipid fractions (Figure 20), thus contribution of all plasma lipid fractions to maternal-fetal FA transfer could be considered. In maternal plasma ^{13}C -PA and ^{13}C -OA were highest in TG, while ^{13}C -LA and ^{13}C -DHA were mostly incorporated into both plasma PL and TG (Figure 20).

More than 90% of the fatty acids in placenta were found in PL (Table 10). Accordingly, ^{13}C -FA in placental tissue were predominantly esterified into placental PL, although significant amounts of ^{13}C -PA were also found in placental NEFA (Figure 23).

The ratio of the tracer concentrations and AUC of concentrations, respectively, of the studied FA between fetal and maternal plasma was significantly higher for ^{13}C -DHA than for the other FA (Figure 30). Similar results were found for the ratio placenta to maternal plasma (Figure 28).

To estimate how the distribution of labelled fatty acids in maternal plasma influences their uptake by the placenta, we correlated the ^{13}C -fatty acid concentration in maternal plasma lipid fractions (AUC), and their total concentration in placenta. Both ^{13}C -palmitic acid and ^{13}C -oleic acid concentrations in maternal triglycerides were significantly correlated with their concentration in placental lipids (PA: $r=0.836$, $p=0.001$, Figure 32 and OA: $r=0.727$, $p=0.011$, Figure 33). ^{13}C -linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids was correlated with its concentration in placental lipids ($r=0.793$ and $p=0.004$, Figure 34). As regards ^{13}C -docosahexaenoic acid, its concentration in placenta was significantly correlated with DHA from all the maternal plasma lipid fractions (PL: $r=0.697$, $p=0.017$; NEFA: $r=0.922$, $p=0.001$; TG: $r=0.724$, $p=0.012$ and CE: $r=0.643$, $p=0.045$, Figure 35).

To assess how the distribution of the labelled fatty acids in maternal plasma influenced their transfer to the fetal circulation, we correlate the ^{13}C -fatty acid concentration (AUC) in maternal plasma lipid fractions, and its total concentration in umbilical vein plasma. Only the ^{13}C -linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids and cholesterol esters was correlated with ^{13}C -linoleic acid in umbilical vein lipids (PL: $r=0.864$, $p=0.001$, Figure 36 and EC: $r=0.784$, $p=0.007$, Figure 37).

DISCUSSION

This study clearly demonstrates tracer enrichment in maternal plasma lipid fractions at the time of caesarean section, 12 hours after oral fatty acid tracer application, which leads us to conclude that this methodological approach is suitable to assess human placental FA transfer *in vivo*. Under these conditions, a significantly higher proportion of ¹³DHA appeared in cord blood as compared to all the other fatty acids investigated. This observation supports the hypotheses of a selective DHA transfer from the mother to the fetus, and of a preferential accretion of DHA in both placenta and fetus relative to other FA.

As the clinical setting of a scheduled cesarean section does not allow frequent maternal blood sampling during the 12 h period and as only at the time of delivery cord blood can be sampled, there are limitations to data analysis and interpretation. As during the first 9 hours after tracer intake no samples could be collected, kinetics of the fatty acid in the plasma lipid pools can not be determined and AUC for individual fractions and fatty acids can only be approximated by the data obtained around delivery. Thus, for the data analysis it is assumed that turnover is not different between the studied fatty acids and the total area under the tracer concentration curves is proportional to the area calculated from the available data. These assumptions seem well justified, but they preclude the determination of absolute transfer rates, and only comparisons between the studied fatty acids are possible. In respect to tracer appearance on the fetal side only the concentration at one time point is available, thus no kinetic data are obtained. As a consequence we focussed data analysis on the tracer distribution at the time on delivery. As influx and outflux for fatty acids in the fetal circulation is not quantitatively known, we can not decide from the experimental data, whether a higher tracer concentration is due to higher placental transfer or a lower elimination from fetal plasma. Our interpretation of the data is based on the assumption, that elimination from fetal plasma is similar for all the studied fatty acids. There is currently no information available about tissue incorporation or oxidation of individual fatty acids from fetal plasma, but DHA is required in considerable amounts for the synthesis of fetal brain and nervous tissue, thus an accumulation of DHA fetal plasma due to relatively low deposition or metabolisation seems not plausible (2, 13).

Larque *et al* previously reported a preferential placental uptake of DHA relative to other FA in pregnant women who received labelled fatty acids 4h before caesarean section. While in this study incorporation of tracer into maternal plasma and placental PL and CE was not detected, in the present study the administration of labelled fatty acids 12h prior to caesarean section led to significant tracer incorporation into all lipid fractions.

Maternal plasma concentrations of FA in specific lipid classes may have large effects on FA delivery to the fetus. Plasma concentration of the labelled saturated fatty acids (SFA, represented by ^{13}C -PA) and monounsaturated fatty acids (MUFA, ^{13}C -OA) were higher in maternal TG, while polyunsaturated fatty acids (PUFA, ^{13}C -LA and ^{13}C -DHA) were found mainly in PL and TG. There was even a trend to higher incorporation of ^{13}C -DHA into maternal plasma PL than of ^{13}C -LA. Human plasma TG contain much lower levels of LC-PUFA than PL (161). Even though plasma TG concentrations increase considerably during pregnancy (21), the concentration of LC-PUFA is highest in maternal PL. The incorporation of dietary PUFA into maternal plasma PL could be important for their placental uptake and transfer, which may involve placental EL activity.

Maternal plasma NEFA as well as NEFA released by LPL from maternal plasma TG are often considered as the most important sources for placental FA transfer (57;76). Since the available information on LPL does not indicate discrimination between FA, this pathway does not explain preferential placental uptake of DHA. However, recently the presence of another member of the TG lipase gene family, EL, was reported at both interfaces of human placenta and in vascular endothelial cells (65). EL is primarily a A1-phospholipase with a restricted ability to release sn-2 bound unsaturated FA from PL (162). SFA are predominantly found in the sn-1 position of PL, while PUFA are typically esterified to sn-2 (65). Therefore, EL activity may result in enhancing levels of maternal plasma lyso-PL enriched in LC-PUFA. These lyso-PL could be an additional source of FA for the placenta. This is supported by reports. that lyso-phosphatidylcholine may represent a preferred physiological carrier of DHA relative to NEFA (66;67). Similarly, lyso-phosphatidylcholine seem to deliver ^{13}C -DHA more efficiently to erythrocytes than NEFA (68).

The preferential enrichment of LC-PUFA over parent essential FA in the placenta (13C-LA) might be achieved via placental FA carriers (57;77;80) and/or the preferential release of lyso-PL enriched in LC-PUFA by EL. EL shows selectivity for the PL species containing DHA at the sn-2 position (163). Gauster et al. proposed that the degree of unsaturation and the acyl chain length affect the cleavage efficiency of FA by EL, since the LC-PUFA 20:4 n-6 was released by EL 4.5-fold lower from HDL₃-PC than the precursor essential fatty acid LA 18:2 n-6 (162).

Placental EL activity might be important given that a pregnant women with LPL-deficiency still can allow for transplacental LC-PUFA (and presumably other fatty acids) for apparently normal development (164). A study in mice actually demonstrated that EL can compensate for a lack of LPL in adipose tissue and mediates some of the NEFA taken up by the tissue (165). A higher placental EL expression was reported in LPL-deficient mice (63).

Both ¹³C-palmitic acid and ¹³C-oleic acid concentrations in maternal triglycerides were significantly correlated with their concentration in placental lipids (PA: r=0.836, p=0.001, Figure 32 and OA: r=0.727, p=0.011, Figure 33), suggesting a role for this lipid fraction in the placental uptake of saturated and monounsaturated fatty acids. This uptake could be mediated by lipoprotein lipase activity. ¹³C-linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids was correlated with its concentration in placental lipids (r=0.793 and p=0.004, Figure 34), which suggests that the role of PL in the placental uptake of linoleic acid might be mediated by endothelial lipase activity. As regards ¹³C-docosahexaenoic acid, its concentration in placenta was significantly correlated with DHA from all the maternal plasma lipid fractions (PL: r=0.697, p=0.017; NEFA: r=0.922, p=0.001; TG: r=0.724, p=0.012 and CE: r=0.643, p=0.045, Figure 35). These correlations indicate that this fatty acid is preferentially taken up by the placenta from all maternal plasma lipids fractions and support the hypothesis of a potential fatty acid binding protein that could selectively take this fatty acid from the maternal circulation (57;77;80).

¹³C-linoleic acid concentration in maternal plasma phospholipids and cholesterol esters was correlated with ¹³C-linoleic acid in umbilical vein lipids (PL: r=0.864, p=0.001,

Figure 36 and EC: $r=0.784$, $p=0.007$, Figure 37). Thus, the placenta modulates fatty acid exchange between maternal and fetal compartments, differently for each fatty acid, which underlines the relevance of this tissue in fatty acid distribution and their transfer to the fetus. Szabo *et al* (169) estimated that about 20% of isotope labeled palmitate was esterified in placental TG after 2 hours of incubation of human placental tissue. Crabtree *et al.* (170) using human placental choriocarcinoma (BeWo) cells as an *in vitro* model reported that almost 60% of the total amount of (^3H)-docosahexaenoic acid taken up by the cells was esterified into TG whereas 37% was found in PL (170). Since the NEFA fraction in the placenta is very small, NEFA that are later on released on the fetal side may well originate from A2-phospholipase and TG hydrolase activity of human placenta (76). The synthesis of apo B in human placenta (99) and the identification of small amounts of lipoproteins very similar to LDL and VLDL in human term placentas suggests further mechanisms of exportation of esterified FA to the fetal side. Both mechanism of FA release to fetal circulation need time, which has to be considered in planning and interpreting *in vivo* studies of placental FA transfer. It appears that a tracer experiment with a 12 h interval between tracer application and birth reflects the transfer process more completely than a shorter interval of only 4 h.

Higher DHA percentages in both placenta and cord than in maternal blood are in line with a preferential placental transfer to meet fetal requirements (51;158). This gradient of LC-PUFA may reflect a role of the placenta in the preferential transfer of LC-PUFA to the fetus (57). Evidence on the role of the placental uptake in preferential accumulation of LC-PUFA in fetal tissues emerged from research of the fatty acid binding characteristics of human placental membrane. Campbell *et al.* (159), using 4 different fatty acids, LA, ALA, AA and OA, reported that placental plasma membrane binding sites had a strong preference for LC-PUFA. Furthermore, DHA percentages in cord blood lipids were found to correlate with m-RNA expression of FATP-4 in placental tissue (80). In both, our present study and the previous 4 h interval study, we find preferential placental accretion of DHA relative to LA, OA and PA (54), and this ratio was higher at 12h than at 4h.

The current study shows for the first time a higher ratio of ^{13}C tracer in cord plasma to tracer in maternal plasma for DHA compared to some other fatty acids in humans *in*

vivo, which seems to be linked to higher DHA accumulation in placental tissue relative to other FA. A preferential placental DHA–transport to the fetus compared to PA, OA, and LA, as suggested by our data and the assumptions made for the interpretation, seems plausible in light of the importance of DHA for fetal growth and/or development. The results obtained support the assumption of an involvement of slow transfer processes and a potential importance of maternal plasma PL for maternal-fetal LC-PUFA transfer.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sánchez A, Gil A. Metabolismo de las lipoproteínas. In: Editorial Médica Panamericana, editor. Tratado de Nutrición. 2ª Edición ed. Madrid: 2010. p. 259-76.
- (2) Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res* 1995 Feb;36(2):229-40.
- (3) Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 1995 Dec;36(12):2471-7.
- (4) Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 2001 Jan;40(1-2):1-94.
- (5) Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 2001 Sep;36(9):885-95.
- (6) Chambaz J, Ravel D, Manier MC, Pepin D, Mulliez N, Bereziat G. Essential fatty acids interconversion in the human fetal liver. *Biol Neonate* 1985;47(3):136-40.
- (7) Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:59-64.
- (8) Hendrickse W, Stammers JP, Hull D. The transfer of free fatty acids across the

- human placenta. *Br J Obstet Gynaecol* 1985 Sep;92(9):945-52.
- (9) Lafond J, Simoneau L, Savard R, Gagnon MC. Linoleic acid transport by human placental syncytiotrophoblast membranes. *Eur J Biochem* 1994 Dec 1;226(2):707-13.
- (10) Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. *Biochimie* 2009 Feb 3.
- (11) Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009 Aug;81(2-3):187-91.
- (12) Kinsella JE. Lipids, membrane receptors, and enzymes: effects of dietary fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990 Sep;14(5 Suppl):200S-17S.
- (13) Sellmayer A, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in infants--physiological and pathophysiological aspects and open questions. *Lipids* 1999 Feb;34(2):199-205.
- (14) Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005 Sep;45(5):581-97.
- (15) Zamora S, Pérez-Llamas.F. Lípidos. In: Aula de Mayores., editor. *Nutrición y alimentación humana*. 1ª Edición ed. Murcia: Universidad de Murcia.; 2002. p. 43-54.
- (16) Doege H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 2006 Aug;21:259-68.
- (17) Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 2010 Jan;90(1):367-417.
- (18) Coburn CT, Hajri T, Ibrahimi A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane

- transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci* 2001 Apr;16(2-3):117-21.
- (19) Glatz JF, Luiken JJ, van BM, van d, V. Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. *Mol Cell Biochem* 2002 Oct;239(1-2):3-7.
- (20) Knudsen J. Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview. *Mol Cell Biochem* 1990 Oct 15;98(1-2):217-23.
- (21) Stahl A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch* 2004 Feb;447(5):722-7.
- (22) Eehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 2006 Mar;284(1-2):135-40.
- (23) Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry* 2000 Jun 20;39(24):7197-204.
- (24) Storch J, McDermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S126-S131.
- (25) Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 2008;28:73-95.
- (26) Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 2009 Jun;1791(6):494-500.
- (27) Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 2009 Jun;1791(6):419-40.

- (28) Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 1999 Mar;24(3):109-15.
- (29) Ackerman WE, Robinson JM, Kniss DA. Association of PAT proteins with lipid storage droplets in term fetal membranes. *Placenta* 2007 May;28(5-6):465-76.
- (30) Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 1986 Apr 15;876(2):288-93.
- (31) Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta* 2002 Apr;23 Suppl A:S9-19.
- (32) Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002 Oct;19(1):43-55.
- (33) Matorras R, Ruiz JI, Perteagudo L, Barbazan MJ, Diaz A, Valladolid A, et al. Longitudinal study of fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids during pregnancy. *J Perinat Med* 2001;29(4):293-7.
- (34) Otto SJ, Houwelingen AC, Antal M, Manninen A, Godfrey K, Lopez-Jaramillo P, et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1997 Apr;51(4):232-42.
- (35) Vlaardingerbroek H, Hornstra G. Essential fatty acids in erythrocyte phospholipids during pregnancy and at delivery in mothers and their neonates: comparison with plasma phospholipids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 Dec;71(6):363-74.
- (36) Stewart F, Rodie VA, Ramsay JE, Greer IA, Freeman DJ, Meyer BJ. Longitudinal assessment of erythrocyte fatty acid composition throughout pregnancy and post partum. *Lipids* 2007 Apr;42(4):335-44.
- (37) Al MD, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, de Jong AE, Hornstra G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their

- relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Br J Nutr* 1995 Jul;74(1):55-68.
- (38) Al MD, van Houwelingen AC, Hornstra G. Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy, and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):285S-91S.
- (39) Burdge GC, Sherman RC, Ali Z, Wootton SA, Jackson AA. Docosahexaenoic acid is selectively enriched in plasma phospholipids during pregnancy in Trinidadian women--results of a pilot study. *Reprod Nutr Dev* 2006 Jan;46(1):63-7.
- (40) De V, Sr., Dhont M, Christophe AB. FA composition of cholesteryl esters and phospholipids in maternal plasma during pregnancy and at delivery and in cord plasma at birth. *Lipids* 2003 Jan;38(1):1-7.
- (41) Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 2007 Jul;86(1):74-81.
- (42) Hodge AM, Simpson JA, Gibson RA, Sinclair AJ, Makrides M, O'Dea K, et al. Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007 Jul;17(6):415-26.
- (43) Astorg P, Bertrais S, Laporte F, Arnault N, Estaquio C, Galan P, et al. Plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of their dietary intakes: a cross-sectional study within a cohort of middle-aged French men and women. *Eur J Clin Nutr* 2008 Oct;62(10):1155-61.
- (44) Parra MS, Schnaas L, Meydani M, Perroni E, Martinez S, Romieu I. Erythrocyte cell membrane phospholipid levels compared against reported dietary intakes of polyunsaturated fatty acids in pregnant Mexican women. *Public Health Nutr* 2002 Dec;5(6A):931-7.
- (45) De V, Sr., Matthys C, De HS, De BG, Dhont M, Christophe AB. Maternal and

- umbilical fatty acid status in relation to maternal diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002 Dec;67(6):389-96.
- (46) Matorras R, Perteagudo L, Sanjurjo P. Biochemical markers of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid intake during pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25(4):135-8.
- (47) Berghaus TM, Demmelmair H, Koletzko B. Fatty acid composition of lipid classes in maternal and cord plasma at birth. *Eur J Pediatr* 1998 Sep;157(9):763-8.
- (48) Al MD, Hornstra G, van der Schouw YT, Bulstra-Ramakers MT, Huisjes HJ. Biochemical EFA status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Hum Dev* 1990 Dec;24(3):239-48.
- (49) Crawford MA, Doyle W, Drury P, Lennon A, Costeloe K, Leighfield M. n-6 and n-3 fatty acids during early human development. *J Intern Med Suppl* 1989;731:159-69.
- (50) Ruyle M, Connor WE, Anderson GJ, Lowensohn RI. Placental transfer of essential fatty acids in humans: venous-arterial difference for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Oct;87(20):7902-6.
- (51) Crawford MA, Hassam AG, Williams G. Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet* 1976 Feb 28;1(7957):452-3.
- (52) Haggarty P, Ashton J, Joynson M, Abramovich DR, Page K. Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta. *Biol Neonate* 1999;75(6):350-9.
- (53) Campbell FM, Clohessy AM, Gordon MJ, Page KR, Dutta-Roy AK. Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Lipid Res* 1997 Dec;38(12):2558-68.

- (54) Larque E, Demmelmair H, Berger B, Hasbargen U, Koletzko B. In vivo investigation of the placental transfer of (13)C-labeled fatty acids in humans. *J Lipid Res* 2003 Jan;44(1):49-55.
- (55) Ala-Kokko TI, Myllynen P, Vähäkangas K. Ex vivo perfusion of the human placental cotyledon: implications for anesthetic pharmacology. *International Journal of Obstetric Anesthesia* 2000;9:26-38.
- (56) Haggarty P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy
2. *Eur J Clin Nutr* 2004 Dec;58(12):1559-70.
- (57) Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review. *Placenta* 2002 Apr;23 Suppl A:S28-S38.
- (58) Larqué E. LCPUFA during pregnancy - its importance for early development of fetus and infant. *J Adv Nutr* 2006 Jun 1;4:4-7.
- (59) Waterman IJ, Emmison N, Dutta-Roy AK. Characterisation of triacylglycerol hydrolase activities in human placenta. *Biochim Biophys Acta* 1998 Nov 2;1394(2-3):169-76.
- (60) Bonet B, Brunzell JD, Gown AM, Knopp RH. Metabolism of very-low-density lipoprotein triglyceride by human placental cells: the role of lipoprotein lipase 6. *Metabolism* 1992 Jun;41(6):596-603.
- (61) Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2002 Dec;80(12):753-69.
- (62) Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 Aug;297(2):E271-E288.
- (63) Lindegaard ML, Olivecrona G, Christoffersen C, Kratky D, Hannibal J, Petersen BL, et al. Endothelial and lipoprotein lipases in human and mouse placenta. *J Lipid Res* 2005 Nov;46(11):2339-46.

- (64) Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD. Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res* 2002 Nov;43(11):1763-9.
- (65) Macdonald JI, Sprecher H. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1991 Jul 9;1084(2):105-21.
- (66) Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thies F, Croset M, et al. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *J Mol Neurosci* 2001 Apr;16(2-3):201-4.
- (67) Thies F, Delachambre MC, Bentejac M, Lagarde M, Lecerf J. Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-1-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J Neurochem* 1992 Sep;59(3):1110-6.
- (68) Brossard N, Croset M, Normand S, Pousin J, Lecerf J, Laville M, et al. Human plasma albumin transports [¹³C]docosahexaenoic acid in two lipid forms to blood cells. *J Lipid Res* 1997 Aug;38(8):1571-82.
- (69) Gauster M, Hiden U, Blaschitz A, Frank S, Lang U, Alvino G, et al. Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jun;92(6):2256-63.
- (70) Magnusson AL, Waterman IJ, Wennergren M, Jansson T, Powell TL. Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Sep;89(9):4607-14.
- (71) Lindegaard ML, Damm P, Mathiesen ER, Nielsen LB. Placental triglyceride accumulation in maternal type 1 diabetes is associated with increased lipase gene expression. *J Lipid Res* 2006 Nov;47(11):2581-8.
- (72) Freed KA, Moses EK, Brennecke SP, Rice GE. Differential expression of type II, IV and cytosolic PLA2 messenger RNA in human intrauterine tissues at term. *Mol Hum Reprod* 1997 Jun;3(6):493-9.

- (73) Waterman IJ, Emmison N, Sattar N, Dutta-Roy AK. Further characterization of a novel triacylglycerol hydrolase activity (pH 6.0 optimum) from microvillous membranes from human term placenta. *Placenta* 2000 Nov;21(8):813-23.
- (74) Rice GE, Wong MH, Farrugia W, Scott KF. Contribution of type II phospholipase A2 to in vitro phospholipase A2 enzymatic activity in human term placenta. *J Endocrinol* 1998 Apr;157(1):25-31.
- (75) Naoum HG, De Chazal RC, Eaton BM, Contractor SF. Characterization and specificity of lipoprotein binding to term human placental membranes. *Biochim Biophys Acta* 1987 Aug 20;902(2):193-9.
- (76) Dutta-Roy AK. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):315S-22S.
- (77) Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larque E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008 Oct;27(5):685-93.
- (78) Campbell FM, Dutta-Roy AK. Plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) is exclusively located in the maternal facing membranes of the human placenta. *FEBS Lett* 1995 Nov 20;375(3):227-30.
- (79) Cunningham P, McDermott L. Long chain PUFA transport in human term placenta. *J Nutr* 2009 Apr;139(4):636-9.
- (80) Larque E, Krauss-Etschmann S, Campoy C, Hartl D, Linde J, Klingler M, et al. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am J Clin Nutr* 2006 Oct;84(4):853-61.
- (81) Jia Z, Pei Z, Maignel D, Toomer CJ, Watkins PA. The fatty acid transport protein (FATP) family: very long chain acyl-CoA synthetases or solute carriers? *J Mol Neurosci* 2007 Sep;33(1):25-31.
- (82) Tobin KA, Johnsen GM, Staff AC, Duttaroy AK. Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across human placental choriocarcinoma (BeWo) cells.

- Placenta 2009 Jan;30(1):41-7.
- (83) Binnert C, Koistinen HA, Martin G, Andreelli F, Ebeling P, Koivisto VA, et al. Fatty acid transport protein-1 mRNA expression in skeletal muscle and in adipose tissue in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 Nov;279(5):E1072-E1079.
- (84) Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 1994 Nov 4;79(3):427-36.
- (85) Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, et al. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* 1999 Sep;4(3):299-308.
- (86) Hirsch D, Stahl A, Lodish HF. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jul 21;95(15):8625-9.
- (87) Fitscher BA, Riedel HD, Young KC, Stremmel W. Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4). *Biochim Biophys Acta* 1998 Dec 22;1443(3):381-5.
- (88) Berger J, Truppe C, Neumann H, Forss-Petter S. A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jun 18;247(2):255-60.
- (89) Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, Dutta-Roy AK. Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* 1998 Jul;19(5-6):409-15.
- (90) Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Nov;197(5):516.
- (91) Coleman RA, Haynes EB. Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture. *J Lipid Res* 1987 Nov;28(11):1335-41.

- (92) Bildirici I, Roh CR, Schaiff WT, Lewkowski BM, Nelson DM, Sadovsky Y. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Dec;88(12):6056-62.
- (93) Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999 Oct;4(4):585-95.
- (94) Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Oct;85(10):3874-81.
- (95) Tobin KA, Harsem NK, Dalen KT, Staff AC, Nebb HI, Duttaroy AK. Regulation of ADRP expression by long-chain polyunsaturated fatty acids in BeWo cells, a human placental choriocarcinoma cell line. *J Lipid Res* 2006 Apr;47(4):815-23.
- (96) Suzuki K, Takahashi K, Nishimaki-Mogami T, Kagechika H, Yamamoto M, Itabe H. Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid x receptor in human choriocarcinoma BeWo cells. *Biol Pharm Bull* 2009 Jul;32(7):1177-82.
- (97) Johnsen GM, Weedon-Fekjaer MS, Tobin KA, Staff AC, Duttaroy AK. Long-chain polyunsaturated fatty acids stimulate cellular fatty acid uptake in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Placenta* 2009 Dec;30(12):1037-44.
- (98) Davis RA. Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochim Biophys Acta* 1999 Aug 25;1440(1):1-31.
- (99) Madsen EM, Lindegaard ML, Andersen CB, Damm P, Nielsen LB. Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 2004 Dec 31;279(53):55271-6.
- (100) Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty

- acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 29;94(9):4312-7.
- (101) Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev* 2004 Sep;62(9):333-9.
- (102) Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999 Jul 10;354(9173):141-8.
- (103) Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001 Nov 30;294(5548):1866-70.
- (104) Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Oct;86(10):5017-24.
- (105) Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, et al. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001 Oct;142(10):4504-14.
- (106) Berry EB, Eykholt R, Helliwell RJ, Gilmour RS, Mitchell MD, Marvin KW. Peroxisome proliferator-activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term. *Mol Pharmacol* 2003 Dec;64(6):1586-90.
- (107) Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jul;90(7):4267-75.
- (108) 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 Aug;148(8):3625-34.
- (109) Duttaroy AK, Jorgensen A. Insulin and leptin do not affect fatty acid uptake and

- metabolism in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Jun;72(6):403-8.
- (110) de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, et al. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 2000 Dec 15;290(5499):2140-4.
- (111) van Houwelingen AC, Puls J, Hornstra G. Essential fatty acid status during early human development. *Early Hum Dev* 1992 Dec;31(2):97-111.
- (112) Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007 Apr;137(4):855-9.
- (113) Sastry PS. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 1985;24(2):69-176.
- (114) Clandinin MT, Jumpson J, Suh M. Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *J Pediatr* 1994 Nov;125(5 Pt 2):S25-S32.
- (115) Larque E, Demmelmair H, Koletzko B. Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Jun;967:299-310.
- (116) Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* 1988;8:517-41.
- (117) Martinez M, Ballabriga A, Gil-Gibernau JJ. Lipids of the developing human retina: I. Total fatty acids, plasmalogens, and fatty acid composition of ethanolamine and choline phosphoglycerides. *J Neurosci Res* 1988 Aug;20(4):484-90.
- (118) Martinez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 1992 Apr;120(4 Pt 2):S129-S138.

- (119) Anderson RE. Lipids of ocular tissues. IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species. *Exp Eye Res* 1970 Oct;10(2):339-44.
- (120) van Kuijk FJ, Buck P. Fatty acid composition of the human macula and peripheral retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992 Dec;33(13):3493-6.
- (121) Kishimoto Y, Agranoff BW, Radin NS, Burton RM. Comparison of the fatty acids of lipids of subcellular brain fractions. *J Neurochem* 1969 Mar;16(3):397-404.
- (122) Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 1991 Jun;26(6):421-5.
- (123) Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979 Mar;3(1):79-83.
- (124) Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 1980 Jun;4(2):121-9.
- (125) Clandinin MT, Chappell JE, Heim T, Swyer PR, Chance GW. Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues. *Early Hum Dev* 1981 Sep;5(4):355-66.
- (126) Su HM, Huang MC, Saad NM, Nathanielsz PW, Brenna JT. Fetal baboons convert 18:3n-3 to 22:6n-3 in vivo. A stable isotope tracer study. *J Lipid Res* 2001 Apr;42(4):581-6.
- (127) Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 2003 Jan;111(1):e39-e44.
- (128) Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandinin T, Hornstra G, Neuringer M, et al. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development.

- Acta Paediatr 2001 Apr;90(4):460-4.
- (129) Koletzko B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999 Jul;4(3):269-84.
- (130) Uauy RD, Birch DG, Birch EE, Tyson JE, Hoffman DR. Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. *Pediatr Res* 1990 Nov;28(5):485-92.
- (131) Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr Res* 1998 Aug;44(2):201-9.
- (132) Uauy R, Mena P, Valenzuela A. Essential fatty acids as determinants of lipid requirements in infants, children and adults. *Eur J Clin Nutr* 1999 Apr;53 Suppl 1:S66-S77.
- (133) Crawford M. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):275S-84S.
- (134) Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T, et al. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics* 2001 Nov;108(5):E82.
- (135) Colombo J, Kannass KN, Shaddy DJ, Kundurthi S, Maikranz JM, Anderson CJ, et al. Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. *Child Dev* 2004 Jul;75(4):1254-67.
- (136) 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 Feb 17;369(9561):578-85.
- (137) Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid

- composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 1994 Aug;60(2):189-94.
- (138) Koletzko B, Cetin I, Brenna JT. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr* 2007 Nov;98(5):873-7.
- (139) Williams C, Birch EE, Emmett PM, Northstone K. Stereoacuity at age 3.5 y in children born full-term is associated with prenatal and postnatal dietary factors: a report from a population-based cohort study. *Am J Clin Nutr* 2001 Feb;73(2):316-22.
- (140) Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989 Sep 9;2(8663):577-80.
- (141) Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989 Mar 4;298(6673):564-7.
- (142) Brossard N, Pachiaudi C, Croset M, Normand S, Lecerf J, Chirouze V, et al. Stable isotope tracer and gas-chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry to study the in vivo compartmental metabolism of docosahexaenoic acid
1. *Anal Biochem* 1994 Jul;220(1):192-9.
- (143) FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957 May;226(1):497-509.
- (144) Carnielli VP, Wattimena DJ, Luijendijk IH, Boerlage A, Degenhart HJ, Sauer PJ. The very low birth weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr Res* 1996 Jul;40(1):169-74.
- (145) Craig H. Isotopic standars for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 1957;12:133-49.

- (146) Acharya G, Wilsgaard T, Berntsen GK, Maltau JM, Kiserud T. Reference ranges for serial measurements of blood velocity and pulsatility index at the intra-abdominal portion, and fetal and placental ends of the umbilical artery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005 Aug;26(2):162-9.
- (147) Hadlock FP, Deter RL, Harrist RB, Park SK. Estimating fetal age: computer-assisted analysis of multiple fetal growth parameters. *Radiology* 1984 Aug;152(2):497-501.
- (148) Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotope use. *Eur J Pediatr* 1997 Aug;156 Suppl 1:S12-S17.
- (149) Koletzko B, Demmelmair H, Hartl W, Kindermann A, Koletzko S, Sauerwald T, et al. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Hum Dev* 1998 Dec;53 Suppl:S77-S97.
- (150) Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res* 2005 Feb;46(2):269-80.
- (151) Booth C, Elphick MC, Hendrickse W, Hull D. Investigation of [¹⁴C] linoleic acid conversion into [¹⁴C] arachidonic acid and placental transfer of linoleic and palmitic acids across the perfused human placenta. *J Dev Physiol* 1981 Jun;3(3):177-89.
- (152) Dancis J, Jansen V, Kayden HJ, Schneider H, Levitz M. Transfer across perfused human placenta. II. Free fatty acids. *Pediatr Res* 1973 Apr;7(4):192-7.
- (153) Kuhn DC, Crawford M. Placental essential fatty acid transport and prostaglandin synthesis. *Prog Lipid Res* 1986;25(1-4):345-53.
- (154) Haggarty P, Page K, Abramovich DR, Ashton J, Brown D. Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta. *Placenta* 1997 Nov;18(8):635-42.

- (155) Dancis J, Jansen V, Levitz M. Transfer across perfused human placenta. IV. Effect of protein binding on free fatty acids. *Pediatr Res* 1976 Jan;10(1):5-10.
- (156) Hay WW, Jr. Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res* 1994;42(4-5):215-22.
- (157) Friedman Z, Danon A, Lamberth EL, Jr., Mann WJ. Cord blood fatty acid composition in infants and in their mothers during the third trimester. *J Pediatr* 1978 Mar;92(3):461-6.
- (158) Crawford MA, Costeloe K, Ghebremeskel K, Phylactos A, Skirvin L, Stacey F. Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am J Clin Nutr* 1997 Oct;66(4 Suppl):1032S-41S.
- (159) Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK. Preferential uptake of long chain polyunsaturated fatty acids by isolated human placental membranes. *Mol Cell Biochem* 1996 Feb 9;155(1):77-83.
- (160) Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK. Placental membrane fatty acid-binding protein preferentially binds arachidonic and docosahexaenoic acids. *Life Sci* 1998;63(4):235-40.
- (161) Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake 4. *Prog Lipid Res* 2008 Sep;47(5):348-80.
- (162) Gauster M, Rechberger G, Sovic A, Horl G, Steyrer E, Sattler W, et al. Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 2005 Jul;46(7):1517-25.
- (163) Chen S, Subbaiah PV. Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues. *Biochim Biophys Acta* 2007 Oct;1771(10):1319-28.
- (164) Magnusson-Olsson AL, Lager S, Jacobsson B, Jansson T, Powell TL. Effect of

- maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency
2. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Jul;293(1):E24-E30.
- (165) Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Mar 4;100(5):2748-53.
- (166) Ghebremeskel K, Min Y, Crawford MA, Nam JH, Kim A, Koo JN, et al. Blood fatty acid composition of pregnant and nonpregnant Korean women: red cells may act as a reservoir of arachidonic acid and docosahexaenoic acid for utilization by the developing fetus. *Lipids* 2000 May;35(5):567-74.
- (167) Viola G, Mietto L, Secchi FE, Ping L, Bruni A. Absorption and distribution of arachidonate in rats receiving lysophospholipids by oral route. *J Lipid Res* 1993 Nov;34(11):1843-52.
- (168) Klingler M, Demmelmair H, Larque E, Koletzko B. Analysis of FA contents in individual lipid fractions from human placental tissue. *Lipids* 2003 May;38(5):561-6.
- (169) Szabo AJ, De LR, Grimaldi RD. Triglyceride synthesis by the human placenta. I. Incorporation of labeled palmitate into placental triglycerides. *Am J Obstet Gynecol* 1973 Jan 15;115(2):257-62.
- (170) Crabtree JT, Gordon MJ, Campbell FM, Dutta-Roy AK. Differential distribution and metabolism of arachidonic acid and docosahexaenoic acid by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Mol Cell Biochem* 1998 Aug;185(1-2):191-8.
- (171) Koletzko B, Muller J. Cis- and trans-isomeric fatty acids in plasma lipids of newborn infants and their mothers. *Biol Neonate* 1990;57(3-4):172-8.
- (172) Hsieh AT, Brenna JT. Dietary docosahexaenoic acid but not arachidonic acid influences central nervous system fatty acid status in baboon neonates.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2009 Aug;81(2-3):105-10.

- (173) Farquharson J. Infant cerebral cortex and dietary fatty acids. *Eur J Clin Nutr* 1994 Aug;48 Suppl 2:S24-S26.
- (174) McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* 2002 Jun;43(6):921-9.
- (175) Parra-Cordero M, Lees C, Missfelder-Lobos H, Seed P, Harris C. Fetal arterial and venous Doppler pulsatility index and time averaged velocity ranges. *Prenat Diagn* 2007 Dec;27(13):1251-7.
- (176) Demmelmair H, von SU, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B. Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of ¹³C content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995 Jul;21(1):31-6.



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico (20:4 n-6)
ACBP	Acyl CoA binding proteins
ADRP	Adipofilina (adipose/adipocyte differentiation related protein)
A-FABP	Adipocyte-fatty acid binding protein (FABP4)
ALA	Ácido α -linolénico (18:3 n-3)
APE	Porcentaje atómico en exceso (atom percent excess)
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C-II	Apolipoproteína C-II
Apo E	Apolipoproteína E
ATGL	Adipose triglyceride lipase
AUC	Área bajo la curva (area under the curve)
B-FABP	Brain-fatty acid binding protein (FABP7)
BHT	Butil hidroxitolueno
CGI-58	Comparative gene identification 58
DG	Diglicérido
DGHA	Ácido dihomo- γ -linoleico (20:3 n-6)
DHA	Ácido docosaheptaenoico (22:6 n-3)
EC	Ésteres de colesterol
EFA	Ácidos grasos esenciales (essential fatty acids)
EL	Endotelial lipasa
EPA	Ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3)
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos (fatty acid binding proteins)
FABPpm	Fatty acid binding proteins plasma membrane
FAT/CD36	Fatty acid translocase
FATP	Proteínas transportadoras de ácidos grasos (fatty acid transport proteins)
GDM	Diabetes gestacional (gestational diabetes mellitus)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (high density lipoproteins)
H-FABP	Heart-fatty acid binding protein (FABP3)
HSL	Lipasa sensible a hormona (hormone sensitive lipasa)
IMC	Índice de masa corporal
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (intermediate density lipoproteins)
IDDM	Diabetes mellitus insulino dependiente

IUGR	Crecimiento intrauterino retardado (intrauterine growth restriction)
IP	Índice de pulsatilidad
K-ABC	Kaufman Assessment Battery for Children
K-FABP	Keratinocyte-fatty acid binding proteína (FABP5)
LA	Ácido linoleico (18:2 n-6)
LCAT	Lecitin-colesterol aciltransferasa
LCPUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (long chain poliunsaturated fatty acids)
LD	Vacuolas lipídicas (lipid droplets)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins)
L-FABP	Liver-fatty acid binding protein (FABP1)
Liso-PL	Lisofosfolípidos
LP	Lipoproteína
LPL	Lipoproteína lipasa
LSDP5	Lipid storage droplet protein 5
MG	Monoglicérido
MGL	monoglicérido lipasa
MLDP	Myocardial lipid droplet protein
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)
MVM	Membrana microvillosa
NEFA	Ácidos grasos no esterificados, ácidos grasos libres (non-esterified fatty acids)
OA	Ácido oleico (18:1 n-9)
XPAT	Oxidative tissues enriched PAT protein
PA	Ácido palmítico (16:0)
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
p-FABPpm	Placental plasma membrane fatty acid-binding protein
PL	Fosfolípidos
PKA	Protein kinasa A
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element

PS	Fosfatidilserina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids)
QM	Quilomicrón
Rm	Remanentes de quilomicrón
RXR	Retinoid X receptor
SEM	Error estándar de la media
SD	Desviación estándar
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
TG	Triglicéridos
TIP47	Tail interactin protein de 47 kDa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoproteins)

“Ama, ama...y ensancha el alma...”