



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTADO PRENATAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DURANTE LA GESTACIÓN

Carla Martín Grau

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

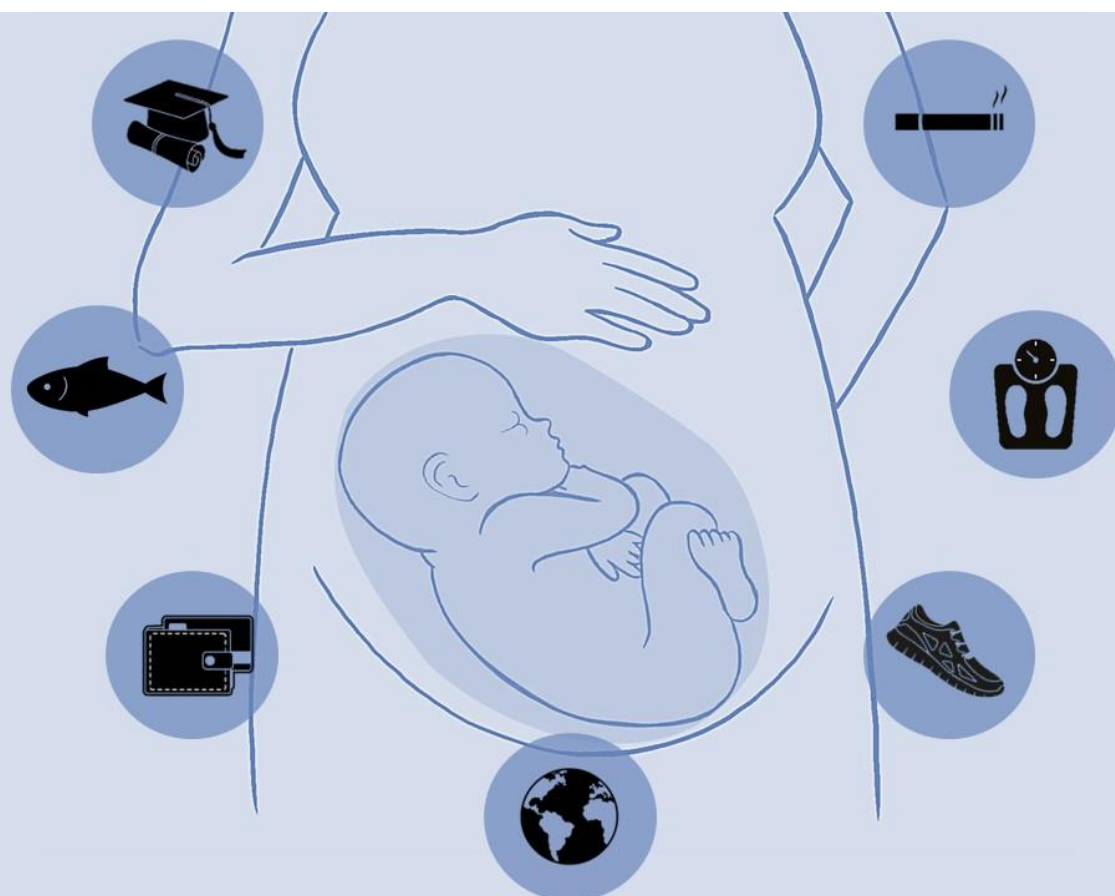
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto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

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



Estado prenatal de los ácidos grasos durante la gestación

CARLA MARTÍN GRAU



TESIS DOCTORAL 2022

Carla Martín Grau

**ESTADO PRENATAL
DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DURANTE LA GESTACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por la **Dra. Victoria Arija Val**

**Departamento de Ciencias Médicas Básicas
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud**



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

Tarragona, 2022



Departamento de Ciencias Médicas Básicas

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

C/ Sant Llorenç, 21. 43201 Reus (Tarragona)

Contacto secretaría: scmed@urv.cat; teléfono: 977 75 93 06

La Dra. **Victoria Arija Val**, catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat Rovira i Virgili,

HACE CONSTAR que:

el presente trabajo, titulado “Estado prenatal de los ácidos grasos durante la gestación”, que presenta **Carla Martín Grau** para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de esta universidad.

Reus, 25 de octubre de 2022

La directora de la tesis doctoral,

**Maria
Victòria
Arija Val**

Firmado
digitalmente
por Maria
Victòria Arija Val
Fecha:
2022.10.25
23:08:03 +02'00'

Victoria Arija Val

Directora

Este trabajo ha sido financiado por,



Ministerio de Ciencia e Innovación, mediante la concesión de ayudas para proyectos de investigación en el área de Ciencias de la Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Proyecto: *“Efectividad de la adaptación de la dosis de suplementación con hierro en el embarazo sobre la salud materno-filial. Ensayo clínico aleatorizado”* con número de referencia PI12/02777.

A mis padres,
A mi hermana,
A Carlos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar unas palabras y mostrar mi agradecimiento y cariño a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

“Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en una misma”

Marie Curie

En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Victoria Arija, por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su equipo de investigación, por la confianza que ha depositado en mí durante estos 3 años, por haberme formado, dirigido y animado en los momentos finales.

Gracias a las familias que han participado en este estudio, así como a todo el personal y servicios que se han involucrado en la elaboración de este gran proyecto. Especialmente, al equipo del grupo de investigación NUTRISAM dirigido por la Dra. Victoria Arija y la Dra. Fina Canals: Andrés Díaz, Carmen Hernández, Cristina Bedmar, Cristina Jardí, Estefanía Aparicio, Lucía Iglesias y Núria Voltas; y, al Centro de Ciencias Ómicas de Reus por el análisis de las muestras. Sin todos ellos, no habría sido posible realizar este estudio.

“No temas a las dificultades, lo mejor surge de ellas”

Rita Levi-Montalcini

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, expresamente a la Dra. Núria Serrat por orientarme a empezar la tesis doctoral con la Dra. Victoria Arija y ayudarme, al igual que la Dra. Cristina Gutiérrez, a compaginar el trabajo científico con el trabajo asistencial en el hospital; a Clara Benavent, Gemma Recio y Margarida Terrón por su amistad, apoyo y compañerismo, conciliar los años de Residencia con el trabajo de tesis y una pandemia mundial por la COVID-19 ha sido sin duda la mayor hazaña de mi vida.

A las compañeras de la Unidad de Genética del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia, por su apoyo en la recta final.

Gracias a mis padres, Lucía y Javier, por haberme motivado siempre a conseguir todo lo que me proponía. Sois un ejemplo de dedicación, perseverancia y constancia que me ha permitido ser la persona que soy ahora. Gracias a mi hermana María, su pasión por la investigación ha conseguido llegar hondo en esta familia. Pero, sobre todo, os agradezco a los tres vuestra paciencia, amor y apoyo incondicional.

Por último, quiero agradecerle a mi marido, Carlos, su paciencia y comprensión con este proyecto. Sin su inagotable amor, cariño y apoyo no habría llegado hasta aquí. Gracias por hacerme sonreír siempre en los momentos más difíciles.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes

El embarazo implica numerosos cambios fisiológicos en la mujer e impone necesidades nutricionales especiales tanto para ella como para el feto. Dentro de los nutrientes esenciales para ambos, están los ácidos grasos (AG), los cuales poseen multitud de funciones biológicas vitales para el organismo. En este sentido, el estado nutricional de los AG en la madre, especialmente el de los AG esenciales y AG poliinsaturados n-3 como el ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), juega un papel importante para ella y su descendencia. Durante el transcurso del embarazo, se ha visto que es necesaria una elevada cantidad de AG para satisfacer las demandas fetales. Por ello, es importante el mantenimiento de unas concentraciones óptimas de AG en suero durante el embarazo para facilitar su paso a través de la placenta y garantizar un correcto desarrollo y crecimiento en el feto. Sin embargo, en la bibliografía existen pocos estudios que realicen un seguimiento de las concentraciones de AG durante todo el embarazo.

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral fue determinar el estado nutricional de AG en la mujer embarazada mediante la identificación de factores maternos (socioeconómicos y de estilo de vida) relacionados con las concentraciones séricas de AG, describir dichas concentraciones, así como su evolución durante el embarazo y, establecer los intervalos de referencia de los AG en la gestante.

Metodología

El proyecto ECLIPSES-AG es un estudio observacional longitudinal multicéntrico realizado en una población de mujeres embarazadas sanas de una región Mediterránea del sur de Cataluña. Se reclutaron un total de 793 mujeres, pero finalmente, sólo 476 fueron evaluadas durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación. En relación a los factores maternos, se recogieron los datos sobre la historia clínica, el consumo de alimentos, el nivel socioeconómico y el estilo de vida. En cuanto a los AG, se analizó un perfil de ácidos grasos saturados (AGS) (totales, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico), monoinsaturados (AGMI) (totales, ácido palmitoleico y ácido oleico), poliinsaturados (AGPI) (n-6 totales, ácido linoleico (LA), ácido dihomo- γ -linolénico (DHGLA) y ácido araquidónico (AA); AGPI n-3 totales, EPA y DHA) y de cadena corta (AGCC) (ácido acético, propiónico, isobutírico y butírico). También, se calcularon varias relaciones de AG (n-6/n-3; AA/EPA; AA/(EPA+DHA); LA/DHGLA) y el índice de AG esenciales (índice EFA). Para la determinación de AGS, AGMI y AGPI se utilizó una combinación de cromatografía de gases y espectrometría de masas, mientras que, para los AGCC, se empleó una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas. Se establecieron valores medios de concentraciones séricas e intervalos de confianza para todos los AG. Todos ellos, se expresaron en términos absolutos ($\mu\text{mol/L}$) y relativos (porcentaje de AG

con respecto al total de AG). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 25 y se consideró un valor estadísticamente significativo cuando p -valor < 0,05.

Resultados

En relación a los factores maternos, la regresión lineal múltiple mostró que el nivel educativo alto y la edad avanzada se asociaban significativamente con mayores concentraciones de EPA y DHA y, valores más bajos de n-6/n-3 y AA/EPA en T1 y/o T3. En cuanto a la dieta, el consumo de pescado y marisco aumentó la concentración de EPA y redujo los valores de n-6/n-3 y AA/EPA en ambos trimestres, mientras que aumentó la concentración de DHA sólo en el T1. El tabaquismo se asoció con una menor concentración de DHA en T1 y con valores más altos de n-6/n-3 en ambos trimestres. El sobrepeso y la obesidad se asociaron con valores más altos de n-6/n-3 y AA/EPA en T1. No se observó una asociación estadísticamente significativa con los AGS y AGMI.

Referente a la evolución de las concentraciones séricas de AG desde T1 a T3, se observó un aumento significativo de los AGS totales, los AGMI totales y los AGPI n-6 totales ($p < 0,05$). Sin embargo, la concentración de AA, EPA y AGPI n-3 totales disminuyó durante la gestación ($p < 0,05$), y no se observó un cambio estadísticamente significativo para la concentración de DHA entre T1 y T3.

Con respecto a los intervalos de referencia establecidos (expresados en percentiles 2,5-97,5), se obtuvieron los siguientes valores absolutos en T1: 1884,32-8802,81 $\mu\text{mol/L}$ para los AGS totales, 959,91-2979,46 $\mu\text{mol/L}$ para los AGMI totales, 2325,77-7735,74 $\mu\text{mol/L}$ para los AGPI n-6 totales y 129,01-495,58 $\mu\text{mol/L}$ para los AGPI n-3 totales; y en T3: 3171,60- 20791,60 $\mu\text{mol/L}$ para los AGS totales, 1254,75- 6668,84 $\mu\text{mol/L}$ para los AGMI totales, 3126,65- 14348,43 $\mu\text{mol/L}$ para los AGPI n-6 totales y 133,12- 454,23 para los AGPI n-3 totales. Estos intervalos incluyeron la mayoría de los valores medios de concentraciones séricas publicados por otros estudios en poblaciones europeas. Sin embargo, se observó que los intervalos de referencia variaron en función de determinados factores maternos como la obesidad, el tabaquismo, el sedentarismo, el bajo nivel educativo y la etnia.

Los resultados sobre los AGCC determinaron que, los intervalos de referencia en suero (expresados en percentiles 2,5-97,5) para los ácidos acético, propiónico, isobutírico y butírico en T1 fueron de 16,4-103,8 $\mu\text{mol/L}$, 2,1-5,8 $\mu\text{mol/L}$, 0,16-1,01 $\mu\text{mol/L}$ y 0,32-1,67 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. En T3, los intervalos fueron muy similares a los del T1 a excepción del ácido butírico (0,37-2,09 $\mu\text{mol/L}$). Los intervalos de referencia no variaron con la edad materna, el peso corporal, la clase social o la dieta, pero disminuyeron con el tabaquismo, la alta actividad física, el bajo IMC y la primiparidad. En cuanto a la evolución, las concentraciones de butirato aumentaron con la mayoría de los factores maternos y categorías estudiadas, mientras que, el ácido acético y el ácido isobutírico disminuyeron sólo en algunas categorías maternas durante T3. Las concentraciones de ácido propiónico no se vieron afectadas por los factores maternos.

Conclusiones

Para concluir, los factores maternos relacionados con un alto nivel educativo, la edad avanzada, el consumo de pescado y marisco, y/o no fumar durante el embarazo, influyen positivamente sobre el perfil de AGPI n-3 en ambos trimestres del embarazo. La concentración sérica materna de AGS, AGMI y AGPI n-6 aumenta durante el embarazo, a la vez que los derivados de los AG esenciales, como el AA y el EPA, que disminuyen, y el DHA permanece inalterado. Por primera vez, este estudio establece los intervalos de referencia séricos de AGCC para las mujeres de nuestra región, tanto al principio como al final del embarazo. Los valores propuestos para las concentraciones e intervalos de referencia de AGS, AGMI y AGPI, obtenidos a partir de una amplia muestra de mujeres embarazadas, podrían usarse para evaluar el grado de adecuación de los AG en las embarazadas y para realizar intervenciones dietéticas en función de determinados factores maternos. Es cierto que es necesario seguir investigando para comprender el papel que desempeñan los AG a lo largo de la gestación, no obstante, la información aportada en este proyecto de tesis puede ser útil para monitorizar el seguimiento del embarazo y detectar valores de riesgo que afecten al estado de salud de la madre y su descendencia.

ÍNDICE

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN	28
ABREVIATURAS	32
LISTADOS	39
LISTADO DE FIGURAS	41
LISTADO DE TABLAS	42
INTRODUCCIÓN	44
1. ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO	46
1.1 Estructura química, nomenclatura y clasificación	46
1.2 Biosíntesis y metabolismo	51
1.2.1 Digestión, absorción y transporte de grasas	51
1.2.2 Formación endógena de ácidos grasos saturados y monoinsaturados	55
1.2.3 Formación endógena de ácidos grasos poliinsaturados	56
1.3 Funciones generales en el organismo	59
1.3.1 Propiedades aislantes y conductoras	59
1.3.2 Fuente de energía para el organismo	60
1.3.3 Unidad estructural en el organismo	60
1.3.4 Sustrato específico	62
1.3.5 Regulador de la expresión génica	62
1.3.6 Formación endógena de los eicosanoides	66
1.4 Fuentes alimentarias de los ácidos grasos y recomendaciones dietéticas	70
1.4.1 Ácidos grasos saturados	71
1.4.2 Ácidos grasos monoinsaturados	72
1.4.3 Ácidos grasos poliinsaturados	73
1.4.3.1 Ácidos grasos omega-3	74
1.4.3.2 Ácidos grasos omega-6	75
1.4.4 Ácidos grasos trans	75
1.5 Ácidos grasos de cadena corta	76
2. ÁCIDOS GRASOS DURANTE LA GESTACIÓN	79
2.1 Función y efecto de los ácidos grasos en la madre y su descendencia	79
2.1.1 Ácidos grasos y embarazo	79
2.1.1.1 Etapa gestacional	79
2.1.1.2 Etapa posparto	80
2.1.2 Ácidos grasos y descendencia	81

2.1.3.	Transporte de los ácidos grasos a través de la placenta	86
2.2.	Recomendaciones nutricionales de ácidos grasos durante el embarazo	90
3.	DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO	91
3.1.	Técnicas analíticas	91
3.2.	Expresión de los valores	93
4.	INTERVALOS DE REFERENCIA BIOLÓGICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS	94
4.1.	Concepto y definición de los intervalos de referencia en la población	94
4.2.	Estudios de validación de intervalos de referencia de ácidos grasos en población general y en embarazadas	95
4.2.1.	Ácidos grasos de cadena media-larga	95
4.2.2.	Ácidos grasos de cadena corta	99
4.3.	Factores que influyen en las concentraciones de los ácidos grasos	100
4.3.1.	Factores relacionados con el grupo poblacional seleccionado	100
4.3.2.	Factores relacionados con la metodología analítica	101
OBJETIVOS.....		104
MATERIAL Y MÉTODOS		108
1.	DISEÑO DEL ESTUDIO: PROYECTO ECLIPSES-AG	110
1.1.	Aspectos éticos.....	111
2.	POBLACIÓN A ESTUDIO. PROCEDIMIENTO Y RECOGIDA DE DATOS	111
2.1.	Ámbito de estudio	111
2.2.	Población estudiada	112
2.3.	Recogida de datos y variables a estudio	113
2.3.1.	Datos sociodemográficos	113
2.3.2.	Historia clínica	113
2.3.3.	Parámetros bioquímicos	115
2.3.3.1.	Obtención de la muestra de sangre	115
2.3.3.2.	Determinación de los ácidos grasos.....	115
3.	METODOLOGÍA ANALÍTICA	116
3.1.	Determinación de ácidos grasos de cadena media-larga en suero por cromatografía de gases	116
3.1.1.	Reactivos y patrones	116
3.1.2.	Instrumentación	117
3.1.3.	Procedimiento experimental.....	117
3.1.4.	Cuantificación y validación del método analítico.....	117
3.2.	Determinación de ácidos grasos de cadena corta en suero por cromatografía líquida	119

3.2.1.	Reactivos y patrones	119
3.2.2.	Instrumentación	120
3.2.3.	Procedimiento experimental.....	120
3.2.4.	Cuantificación y validación del método analítico.....	120
3.3.	Determinación de valores de referencia biológicos y estimación de los intervalos correspondientes en nuestra cohorte de mujeres embarazadas	121
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	122
RESULTADOS.....		125
1.	PUBLICACIÓN 1. Maternal factors associated with levels of fatty acids, specifically n-3 PUFA during pregnancy: ECLIPSES study.....	127
2.	PUBLICACIÓN 2. Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy.....	147
3.	PUBLICACIÓN 3. Trimester-specific reference ranges for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in serum of pregnant women: a cohort study from the ECLIPSES Group.	158
4.	PUBLICACIÓN 4. Short-chain fatty acid reference ranges in pregnant women from a mediterranean region of Northern Spain: ECLIPSES Study.	179
5.	RESULTADOS GENERALES.....	195
5.1.	Características de las mujeres embarazadas de la cohorte ECLIPSES-AG.....	195
5.2.	Resultados de las publicaciones.....	195
DISCUSIÓN		198
1.	CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO, POBLACIÓN Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO	200
2.	ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA Y LARGA DURANTE LA GESTACIÓN	201
2.1.	Factores maternos relacionados.....	202
2.2.	Concentraciones séricas de los ácidos grasos de cadena media y larga.....	203
2.3.	Intervalos de referencia séricos de los ácidos grasos de cadena media y larga.....	205
3.	ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA DURANTE LA GESTACIÓN.....	207
3.1.	Factores maternos relacionados.....	208
3.2.	Concentraciones séricas de los ácidos grasos de cadena corta	209
3.3.	Intervalos de referencia séricos de los ácidos grasos de cadena corta	210
4.	FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	211
PERSPECTIVAS DE FUTURO		214
CONCLUSIONES.....		218
BIBLIOGRAFÍA		223
ANEXOS.....		248
Anexo 1.	Cuestionario de frecuencia de consumo.	250

Anexo 2. Cuestionario de actividad física.....	253
Anexo 3. Publicaciones en congresos.....	254

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La esencialidad de los ácidos grasos (AG) fue descubierta por George y Mildred Burr en 1929. Este matrimonio de investigadores, observaron que la alimentación de ratas con una dieta carente totalmente de grasas producía un crecimiento muy pobre de los animales, una dermatitis severa especialmente en la cola, pérdida del pelaje, adelgazamiento y finalmente la muerte. No obstante, se dieron cuenta que, al añadir una pequeña cantidad de ácido linoleico (LA) y ácido araquidónico (AA) a la dieta de los animales, la clínica de las ratas revertía demostrando la importancia del LA como un AG esencial y del AA como derivado de este. Sin embargo, tuvieron que transcurrir más de 35 años desde el descubrimiento del matrimonio Burr para que se demostrará la necesidad de ciertos AG en la dieta humana.

Casi 100 años después, se ha demostrado que los AG son compuestos vitales para el organismo. Entre sus funciones más conocidas, se puede destacar que forman parte de numerosas estructuras celulares, como las membranas plasmáticas, o que participan en multitud de funciones biológicas, como la síntesis de eicosanoides para la mediación de la respuesta inmunológica. Debido a su ubicación y funcionalidad, se han relacionado principalmente con el desarrollo del sistema nervioso central, formación de la retina, metabolismo de lípidos y glúcidos, respuesta antiinflamatoria y sistema cardiovascular, entre otros.

Numerosos estudios han observado como la deficiencia, el exceso o el desequilibrio de los AG en las etapas clave del desarrollo fetal pueden tener consecuencias posteriores a largo plazo. Esto se debe a la alteración que se produce a nivel celular, en la expresión génica o en las respuestas metabólicas o neuroendocrinas donde están involucrados. Por tanto, es importante proseguir la investigación sobre los efectos de los AG y como sus concentraciones séricas desequilibradas pueden comprometer múltiples mecanismos y órganos, y la interrelación entre ellos. En el contexto prenatal, la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en relacionar el déficit de ciertos AG, especialmente los AG poliinsaturados de la serie omega-3 o n-3 (DHA y EPA respectivamente), con los efectos producidos en el feto. Todo ello, ha conducido a que la Organización Mundial de la Salud se postule en recomendar una ingesta diaria de 300 mg de DHA+EPA en la mujer embarazada para prevenir posibles efectos adversos en la salud del futuro bebé. No obstante, además de los AG poliinsaturados omega-3, existen multitud de AG (saturados, monoinsaturados y otros poliinsaturados) que apenas han sido estudiados en la mujer embarazada y que podrían estar relacionados con el correcto crecimiento y desarrollo fetal.

Con el presente proyecto se espera determinar el estado nutricional de los AG en la mujer embarazada durante su gestación. Para ello, se pretende determinar las concentraciones séricas de un amplio perfil de AG y su evolución a lo largo del embarazo, así como analizar si existen factores maternos que puedan estar involucrados o no en la fluctuación de dichas concentraciones. Por último, se espera establecer intervalos de referencia o de normalidad que sirvan como una herramienta útil para prevenir y/o detectar posibles desequilibrios en los AG durante la gestación y, además, fomentar un estado de salud favorable tanto para la madre como para su descendencia.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico, del inglés <i>Arachidonic acid</i>
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AF	Actividad física
AG	Ácidos grasos
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGCCR	Ácidos grasos de cadena corta ramificados
AGE	Ácidos grasos esenciales
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGL	Ácidos grasos libres
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AHA	Asociación Estadounidense del Corazón (del inglés, <i>American Heart Association</i>)
ALA	Ácido alfa-linolénico (del inglés, <i>Alfa-Linolenic Acid</i>)
ANGPTL4	Proteína relacionada con la angiopoyetina 4 (del inglés, <i>Angiopoietin-Like Protein 4</i>)
ANSES	Agencia Nacional de Seguridad y Salud Alimentaria (del francés, <i>Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire</i>)
Apo	Apolipoproteínas
ASSIR	Asistencia a la Salud Sexual y Reproductiva
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF, del inglés <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
CAP	Centros de atención primaria
CEN	Comité Europeo de Normalización
CFC	Cuestionario de frecuencia de consumo
CI	Consentimiento informado
CitP₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀ monooxigenasa
CLA	Ácido linoleico conjugado (del inglés, <i>Conjugated Linoleic Acid</i>)
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, del inglés, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
COX	Ciclooxigenasa
D5D	Δ 5-desaturasa
D6D	Δ 6-desaturasa
DDR	Dosis diaria recomendada
DGLA	Ácido dihomo-gamma-linolénico, del inglés <i>Dihomo-Gamma-Linolenic acid</i>
DHA	Ácido docosahexaenoico, del inglés <i>Docosahexaenoic acid</i>
DHET	Ácido dihidroxieicosatrienoico
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional

DPA	Ácido docosapentaenoico (del inglés, <i>Docosapentaenoic Acid</i>)
DS	Desviación estándar
EA	Ácido esteárico (del inglés, <i>Stearic Acid</i>)
EC	Ésteres de colesterol
EET	Ácido cis-epoxieicosatrienoico
EFA	Ácidos grasos esenciales (del inglés, <i>Essential Fatty Acids</i>)
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés, <i>European Food and Safe Authority</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenoico, del inglés <i>Eicosapentaenoic acid</i>
EPTRV	Grupo de Expertos en Teoría de Valores de Referencia (EPTRV, del inglés, <i>Expert Panel on Theory of Reference Values</i>)
FABP	Proteína de unión a los ácidos grasos (del inglés, <i>Fatty Acid-Binding Proteins</i>)
FADS	Enzima desaturasa de ácidos grasos (FADS, del inglés <i>Fatty Acid Desaturase</i>)
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés <i>Fatty Acids Methyl Esters</i>).
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FAT	Translocasa de ácidos grasos (del inglés, <i>Fatty Acid Translocase</i>)
FATP	Proteínas transportadoras de ácidos grasos (inglés, <i>Fatty Acid Transport Protein</i>)
FDA	Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos en Estados Unidos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
FESNAD	Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética
FFAR	Receptores de ácidos grasos libres (del inglés, <i>Free Fatty Acid Receptors</i>)
FL	Fosfolípidos
GC-MS	Cromatografía de gases (GC, del inglés <i>Gas Chromatography</i>) acoplada en tándem a espectrometría de masas (MS, del inglés <i>Mass Spectrometry</i>)
GLA	Ácido gamma-linolénico, del inglés <i>Gamma-Linolenic acid</i>
GLUT	Proteína transportadora de la glucosa (del inglés, <i>Glucose Transporter</i>)
GPG	Ganancia de peso gestacional
GPR	Receptores acoplados a proteína G (del inglés, <i>G-Protein-coupled Receptors</i>)
HDAC	Histona deacetilasas
HDL	lipoproteínas de alta densidad (del inglés, <i>High Density Lipoprotein</i>)
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HMD	Base de datos del metaboloma humano (del inglés, <i>Human Metabolome Database</i>)
IC	Intervalo de confianza
ICS	Instituto Catalán de la Salud
ICSH	Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH, del inglés, <i>the International Council for Standardization in Haematology</i>)
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (del inglés, <i>Intermediate Density Lipoprotein</i>)
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC, del inglés, <i>the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>)

IMC	Índice de masa corporal
ISO	Organización Internacional de Normalización (ISO, del inglés, <i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LA	Ácido linoleico (del inglés, <i>Linoleic acid</i>)
LCAT	Enzima lecitin-colesterol-acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés, <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LE	Lipasa endotelial/epitelial
LOX	Lipooxigenasa
LP	Lipoproteína
LPL	Lipoproteínlipasa
LT	Leucotrieno
MET	Equivalentes metabólicos
MP	Membrana plasmática
NIH	Instituto Nacional de Salud Estadounidense (del inglés, <i>USA National Institutes of Health</i>)
OA	Ácido oleico (del inglés, <i>Oleic acid</i>)
P	Fosfato (del inglés <i>Phosphate</i>)
PG	Prostaglandina
PGI	Prostaciclina
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PPAR	Receptor activador de la proliferación peroxisomal (del inglés, <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>)
PPRE	Elemento de respuesta a la proliferación peroximal (del inglés, <i>Peroxisome Proliferator-Response Elements</i>)
QM	Quilomicrones
RCIU	Retraso del crecimiento intrauterino
RCT	Ensayos controlados aleatorizados (del inglés, <i>Randomized Controlled Trial</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RNP	Recién nacido prematuro o pretérmino
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RXR	Receptor del ácido retinoico X
SEEN	Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SNC	Sistema nervioso central
SQDI	Índice de calidad de la dieta española (del inglés, <i>Spanish Diet Quality Index</i>)
T1	Primer trimestre de embarazo
T3	Tercer trimestre de embarazo
TAG	Triacilgliceroles
TX	Tromboxano
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, del inglés <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>) acoplada en tándem a espectrometría de masas (MS, del inglés <i>Mass Spectrometry</i>)

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés, <i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
WHO	Organización Mundial de la Salud (del inglés, <i>World Health Organization</i>)

LISTADOS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura esquemática de los ácidos grasos formando parte de lípidos complejos como los triacilgliceroles y fosfolípidos	47
Figura 2. Fórmula estructural y nomenclatura abreviada (C:Dn-x) según la serie del ácido graso (n-9, n-6 y n-3).....	48
Figura 3. Características principales de las lipoproteínas plasmáticas.	53
Figura 4. Esquema simplificado de la digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos exógenos al hígado y tejidos extrahepáticos.	54
Figura 5. Biosíntesis de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.....	57
Figura 6. Papel de los ácidos grasos en la regulación de la expresión génica en la célula	65
Figura 7. Síntesis de eicosanoides a partir de sus derivados.	68
Figura 8. Distribución y funciones biológicas de los eicosanoides.....	69
Figura 9. Esquema hipotético de la evolución de los ácidos grasos e ingesta de grasa.	71
Figura 10. Biosíntesis de los ácidos grasos de cadena corta por acción de la microbiota intestinal.	77
Figura 11. Efectos biológicos del DHA en el embarazo y periodo posnatal.....	83
Figura 12. Estructura placentaria y transporte de ácidos grasos vía materno-fetal.....	89
Figura 13. Descripción general del cromatógrafo de gases.	93
Figura 14. Diseño del estudio ECLIPSES-AG.	110
Figura 15. Seguimiento de las mujeres embarazadas durante el estudio.	112
Figura 16. Correlación de Pearson entre los valores séricos absolutos y relativos del ácido eicosapentaenoico (EPA) durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación.....	178
Figura 17. Nuevas perspectivas de futuro: Proyecto ECLIPSES-NEN.	216

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura y clasificación de los ácidos grasos analizados en las muestras biológicas de la cohorte del estudio ECLIPSES-AG	50
Tabla 2. Síntesis de eicosanoides a partir de sus precursores.....	67
Tabla 3. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos saturados.....	72
Tabla 4. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos monoinsaturados....	72
Tabla 5. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos poliinsaturados.....	73
Tabla 6. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos de cadena corta detectados en nuestra cohorte de mujeres.....	76
Tabla 7. Suplementación de DHA durante el embarazo y en recién nacidos pretérmino y sus efectos posnatales a largo plazo.....	84
Tabla 8. Recomendaciones dietéticas de ácidos grasos en la mujer gestante.....	91
Tabla 9. Estudios publicados que reportan concentraciones séricas de ácidos grasos en adultos.....	96
Tabla 10. Estudios publicados que reportan concentraciones séricas de ácidos grasos en mujeres embarazadas.....	97
Tabla 11. Validación del método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la cuantificación de ácidos grasos de cadena media-larga en muestras de suero.....	118
Tabla 12. Validación del método de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en muestras de suero.....	121
Tabla 13. Correlación de Pearson entre los valores séricos absolutos y relativos de los ácidos grasos durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación.....	177

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO

Los ácidos grasos (AG) son moléculas hidrocarbonadas con un alto contenido energético. Tanto si están en forma libre (AGL) como formando parte de lípidos complejos, los AG desempeñan una serie de funciones clave en el metabolismo. Los AG son un importante combustible metabólico, tanto en forma de energía almacenada en el interior celular (por ejemplo, componente de los triacilgliceroles (TAG) en el tejido adiposo) como en forma de energía transportada (por ejemplo, componente de los TAG y ésteres de colesterol (EC) de las lipoproteínas sanguíneas). Su metabolismo en la beta-oxidación aporta una gran fuente de ATP y poder reductor (NADH y FADH₂) a la célula. Además de la función energética, poseen otras dos funciones vitales: (i) estructural, forman parte de los componentes esenciales de las membranas celulares como fosfolípidos (FL), glucolípidos o esfingolípidos y (ii) de señalización o reguladora, actúan como factores de transcripción regulando la expresión génica, forman parte de hormonas, contribuyen a los procesos inmunológicos y regulan la temperatura corporal (**Figura 1**) [1–3].

1.1 Estructura química, nomenclatura y clasificación

Los AG son moléculas orgánicas con una cadena hidrocarbonada (R-), de longitud variable y generalmente lineal, compuesta por un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo metilo (-CH₃) en cada uno de sus extremos (**Figura 2**) [4,5]. El átomo de carbono próximo al grupo carboxílico se denomina el carbón α y el siguiente el carbón β .

Los AG se clasifican en función de la longitud (número de átomos de carbono) y el grado de insaturación (presencia o ausencia de dobles enlaces) en el esqueleto carbonado. Por tanto, en función de la longitud que conforma la cadena, pueden clasificarse en AG de cadena corta (2-6 átomos de carbono), de cadena media (8-12 carbonos), de cadena larga (14-20 carbonos) y de cadena muy larga (superior a 22 carbonos). En cuanto al grado de insaturación, se distinguen AG saturados (AGS) que son moléculas que no contienen dobles enlaces, AG monoinsaturados (AGMI) que contienen un doble enlace y AG poliinsaturados (AGPI) con dos o más dobles enlaces (**Figura 2**) [6].

La disposición de los dobles enlaces en los AG insaturados (AGI) permite la isomería en torno al doble enlace, pudiendo estar en *cis* o *trans*. En condiciones fisiológicas, los dobles enlaces preferiblemente adoptan una conformación tipo *cis* lo que significa que los átomos de hidrógeno unidos a los dobles enlaces se encuentran en el mismo plano. La configuración *cis*, le confiere a la molécula determinadas propiedades fisicoquímicas: 1) permite formar un ángulo en la

posición del doble enlace que produce pliegues en las cadenas hidrocarbonadas y ayudan a disminuir las fuerzas de *Van der Waals* entre los AGI adyacentes (dificultando el empaquetamiento de los AGI entre sí) y 2) disminuye el punto de fusión de la molécula lo que le permite adquirir un estado líquido a temperatura ambiente [3,5]. Así pues, el grado de insaturación o número de dobles enlaces en *cis* y la longitud de la cadena carbonada de los AG que constituyen los FL de la membrana (**Figura 1**), influyen considerablemente en la fluidez y grosor de las membranas celulares y, en consecuencia, sobre la función de las proteínas unidas a dichas membranas (enzimas, receptores celulares, transportadores y canales iónicos) [5].

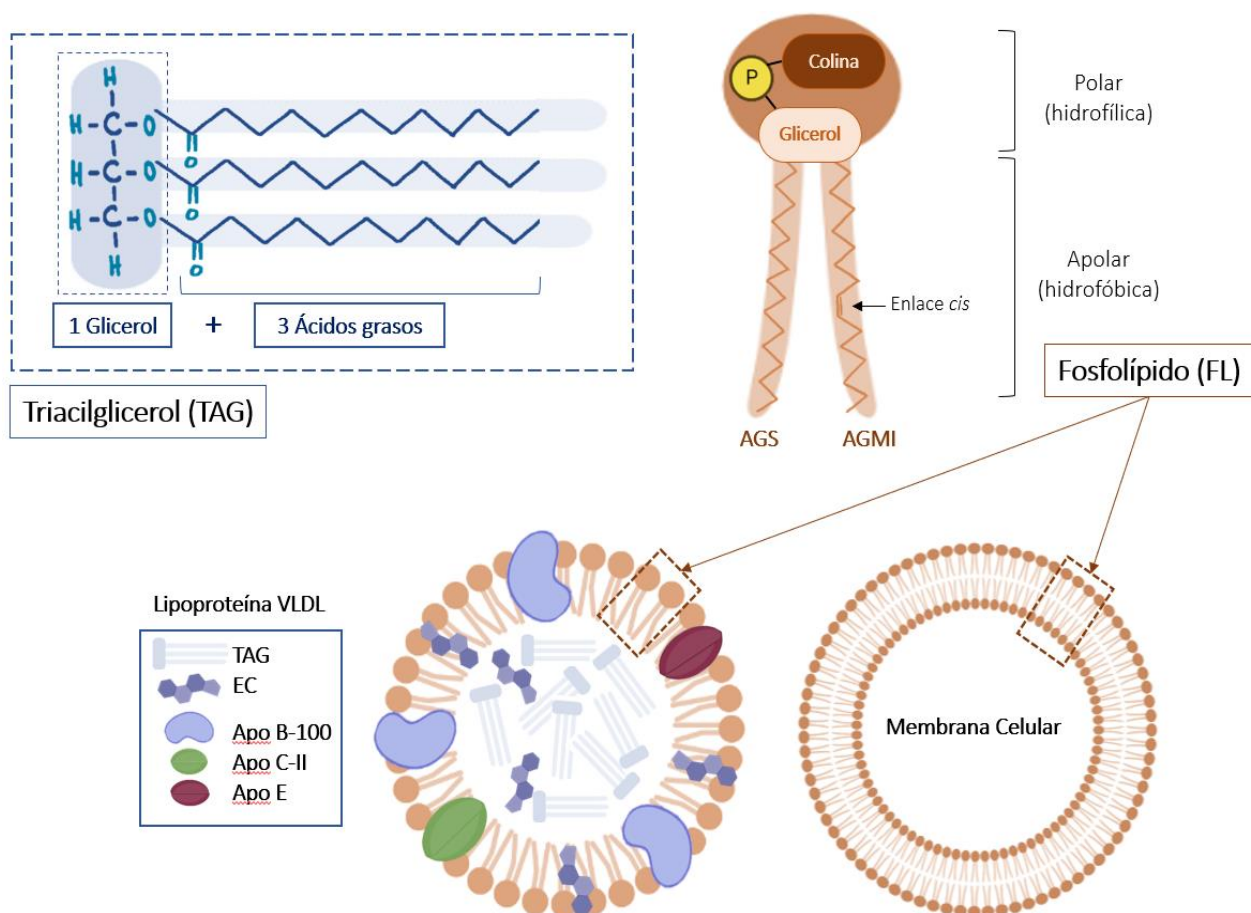


Figura 1. Estructura esquemática de los ácidos grasos formando parte de lípidos complejos como los triacilgliceroles y fosfolípidos. Los triacilgliceroles (TAG) están formados por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos. Los TAG son transportados en el interior de lipoproteínas como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés Very Low Density Lipoprotein), las cuales están compuestas por ésteres de colesterol (EC), determinadas apolipoproteínas (Apo) y fosfolípidos (FL). Además, los FL (en la figura se representa el FL tipo fosfatidilcolina) son el componente mayoritario de las membranas celulares y su estructura tiene dos partes: una cabeza polar formada por un grupo fosfato (P, del inglés Phosphate), un alcohol (colina, serina, inositol, etanolamina, etc.) y un glicerol; y un cuerpo apolar formado por dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos (que suelen contener entre 14-24 carbonos). Normalmente una de las cadenas suele ser un ácido graso saturado (AGS) y la otra un ácido graso monoinsaturado (AGMI) o poliinsaturado. En función de la longitud y nivel de saturación (enlaces *cis*) de los AG que componen los FL, se caracterizan las propiedades de la membrana celular, concretamente juegan un papel fundamental en la fluidez y estabilidad. Figura adaptada de Albert et al. [3] y Brunzell, J., & Chait, A. [7].

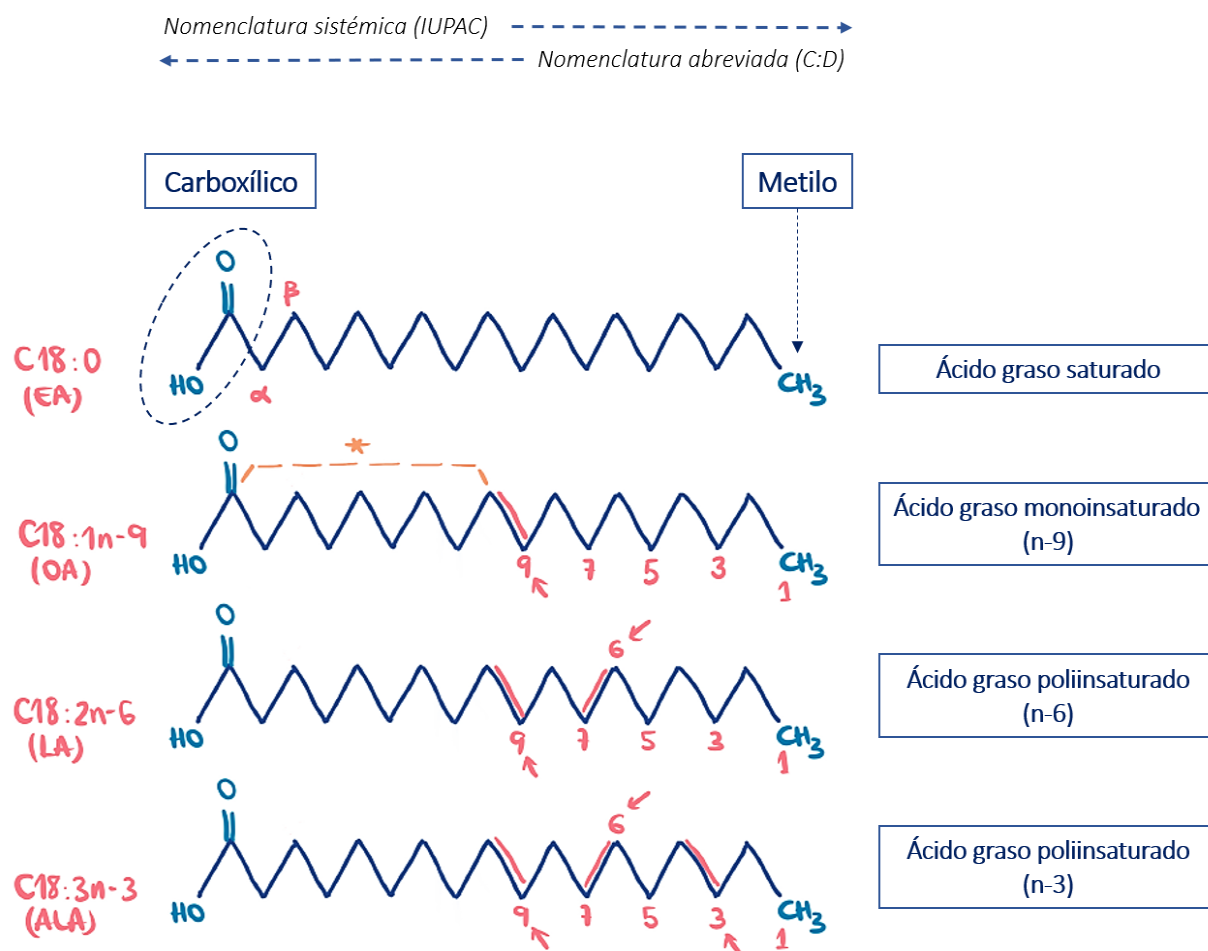


Figura 2. Fórmula estructural y nomenclatura abreviada (C:Dn-x) según la serie del ácido graso (n-9, n-6 y n-3). Las flechas indican la introducción de un doble enlace cuyo número dependerá del tipo de serie del ácido graso. (*) Los mamíferos no pueden desaturar en las posiciones n-6 ni n-3 por lo que LA y ALA se consideran ácidos grasos esenciales. Abreviaturas: EA, ácido esteárico (del inglés *Stearic acid*); OA, ácido oleico (del inglés, *Oleic acid*); LA, ácido linoleico (del inglés, *Linoleic acid*); ALA, ácido alfa-linolénico (del inglés, *alpha-Linolenic acid*).

Como se muestra en la **Tabla 1**, existen diferentes sistemas para la nomenclatura de los AG. En el caso de seguir la nomenclatura química estándar recomendada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*), los AG se nombran considerando el carbono del grupo carboxílico como carbono 1 [4]. Por ejemplo: el ácido oleico con el sistema IUPAC, se nombraría *cis*-9-octadecenoico por tener un doble enlace en configuración *cis* en el carbono 9 a partir del extremo carboxílico y una cadena de 18 átomos de carbono. Pese a que la nomenclatura de la IUPAC es sistemática, precisa y técnicamente clara, los nombres de los AG son largos y complejos. Por esa razón, normalmente en investigación e industria alimentaria, los AG son referidos bien por nombres comunes o bien por una notación más sencilla y abreviada. Existen varias nomenclaturas abreviadas pero la más utilizada se basa en la forma **C:D**, en la que **C** representa el número de átomos de carbono y **D** el número de dobles enlaces. Además, los AGI en *cis* pueden subdividirse en familias o series en

función de la posición del primer doble enlace y, para ello, se utiliza la letra “n” o el símbolo “ ω ” donde el sistema de notación n-x o ω -x hace referencia a la posición del primer doble enlace a partir del grupo metilo terminal de la cadena carbonada. A diferencia del sistema IUPAC, en la forma C:D se tiene en cuenta el carbono del grupo metilo como el carbono 1. Por ejemplo: el ácido oleico (nombre común) con este sistema se nombraría como C18:1n-9, lo cual indica que es un AG que posee 18 átomos de carbono y una insaturación o doble enlace ubicado en el carbón 9 desde el grupo metilo terminal [6] (**Figura 2**). Otro sistema abreviado utilizado es el sistema delta y se emplea el símbolo “ Δ ” para determina la posición de todos los dobles enlaces a partir del extremo carboxílico en la molécula y, además, denominar las enzimas desaturasas específicas que se encargan de introducir dicho doble enlace en la molécula [8]. Por ejemplo: el ácido oleico, con un único doble enlace, se nombraría C18:1 Δ 9 y, el ácido gamma-linolénico, con varios dobles enlaces, se nombraría C18:3 Δ 9,12,15.

En la naturaleza, las familias o series mayoritarias de AGI son: (i) la familia n-9 u omega-9 (ω -9), siendo su principal componente es el ácido oleico (OA, C18:1n-9), (ii) la familia n-6 u omega-6 (ω -6) cuyo AG principal es el ácido linoleico (LA, C18:2n-6) y, finalmente, (iii) la familia n-3 u omega-3 (ω -3) donde el AG más importante es el ácido alfa-linolénico (ALA, C18:3n-3). Además, existen otros ácidos grasos n-7 o n-11, pero son minoritarios [4].

Tabla 1. Nomenclatura y clasificación de los ácidos grasos analizados en las muestras biológicas de la cohorte del estudio ECLIPSES-AG.

Tipo de AG y serie	Nombre común	Nombre Abreviado (sistema C:D)	Nombre sistemático (IUPAC)
Ácidos grasos saturados			
AGCC	Acético	C2:0	Eetanoico
	Propiónico	C3:0	Propanoico
	Butírico	C4:0	Butanoico
	Isobutírico	C4:0	2-Metilpropanoico
	Caproico	C6:0	Hexanoico
	Caprílico	C8:0	Octanoico
	Cáprico	C10:0	Decanoico
	Láurico	C11:0	Undecanoico
		C12:0	Dodecanoico
	Mirístico	C13:0	Tridecanoico
		C14:0	Tetradecanoico
	Palmítico	C15:0	Pentadecanoico
		C16:0	Hexadecanoico
	Esteárico	C17:0	Heptadecanoico
		C18:0	Octadecanoico
	Aráquico	C20:0	Eicosanoico
		C21:0	Heneicosanoico
	Behénico	C22:0	Docosanoico
C23:0		Tricosanoico	
Lignocérico	C24:0	Tetracosanoico	
Ácidos grasos monoinsaturados			
Omega-5	Miristicoleico	C14:1n-5	<i>cis</i> -9-Tetradecenoico
	Pentadecenoico	C15:1n-5	<i>cis</i> -10-Pentadecenoico
Omega-7	Palmitoleico	C16:1n-7	<i>cis</i> -9-Hexadecenoico
	Heptadecenoico	C17:1n-7	<i>cis</i> -10-Heptadecenoico
	Vaccénico	C18:1n-7	<i>cis</i> -11-Octadecenoico
Omega-9	Oleico	C18:1n-9	<i>cis</i> -9-Octadecenoico
	Gadoleico	C20:1n-9	<i>cis</i> -9-Eicosenoico
	Erúcico	C22:1n-9	<i>cis</i> -13-Docosenoico
	Nervónico	C24:1n-9	<i>cis</i> -15-Tetracosenoico
Ácidos grasos poliinsaturados			
Omega-6	Linoleico (LA)	C18:2n-6	<i>cis</i> -9,12-Octadecadienoico
	Linolelaídico	C18:2n-6	<i>trans</i> -9,12-Linolelaídico
	γ-Linolénico (GLA)	C18:3n-6	<i>cis</i> -6,9,12-Octadecatirenoico
	Eicosadienoico	C20:2n-6	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoico
	Dihomo- γ-linolénico (DGLA)	C20:3n-6	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoico
	Araquidónico (AA)	C20:4n-6	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico
	Docosadienoico	C22:2n-6	<i>cis</i> -13,16-docosadienoico
	Docosapentaenoico (DPA)	C22:5n-6	<i>cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoico
Omega-3	α-Linolénico (ALA)	C18:3n-3	<i>cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoico
	Eicosatrienoico	C20:3n-3	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoico
	Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n-3	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico
	Docosahexaenoico (DHA)	C22:6n-3	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico

Abreviaturas: AGCC, Ácidos grasos de cadena corta; LA, del inglés *Linoleic acid*; GLA, del inglés *Gamma-Linolenic acid*; DGLA, del inglés *Dihomo-Gamma-Linolenic acid*; AA, del inglés *Arachidonic acid*; DPA, del inglés *Docosapentaenoic acid*; ALA, del inglés *Alfa-Linolenic acid*; EPA, del inglés *Eicosapentaenoic acid*; DHA, del inglés *Docosahexaenoic acid*. Tabla adaptada de la bibliografía [5,8,9].

1.2. Biosíntesis y metabolismo

Los AG llegan a las células de nuestro organismo principalmente por dos vías: (i) vía exógena, a través de las grasas ingeridas por la dieta (el 95% en forma de TAG) y, en menor medida, por (ii) vía endógena mediante dos procesos, (a) una lipólisis a partir de las grasas almacenadas en tejidos especializados (como el tejido adiposo) y (b) una lipogénesis de grasas sintetizadas procedentes del exceso de glúcidos que serán exportadas a otros tejidos para su consumo [10].

Al tratarse de moléculas insolubles en plasma, el transporte de los AG por el organismo se produce necesariamente a través de proteínas plasmáticas como las lipoproteínas (principalmente) y la albúmina. Cabe destacar que las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares que se componen de una parte lipídica y otra proteica [7,11]:

- La fracción proteica está compuesta por apolipoproteínas (Apo) que presentan funciones estructurales en la membrana y que, además, actúan como ligandos de receptores permitiendo interaccionar con otras lipoproteínas, hígado u otros tejidos para su metabolismo.
- La fracción lipídica está formada por lípidos apolares (TAG y EC) y polares (FL y colesterol no esterificado). Se estima que los AG más abundantes en los TAG de las lipoproteínas son el OA (40%), ácido palmítico (22%) y LA (20%). Sin embargo, los AG predominantes en los EC son el LA (~50%), el OA (18%), el ácido palmítico (15%) y el AA (7%) [5].

Las lipoproteínas presentan una gran heterogeneidad, su estructura y composición va a depender de su origen y función en el organismo. Clásicamente se han categorizado en 5 clases según su densidad y tamaño (a menor densidad, mayor tamaño): quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very Low Density Lipoproteins*); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *Intermediate Density Lipoproteins*); lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High-Density Lipoproteins*) (**Figura 3**) [7,11–13].

1.2.1. Digestión, absorción y transporte de grasas

Tras la ingesta de alimentos con contenido en grasas, los TAG de la dieta deben ser previamente hidrolizados para poder ser absorbidos a través de la membrana intestinal. La digestión de los TAG se produce por la acción de las lipasas linguales o bucales, gástricas y pancreáticas que dan lugar a AGL de diferente tamaño. Los AG de cadena corta y media liberados son directamente absorbidos por el intestino, mientras que los AG de cadena larga se emulsionan con las sales biliares para formar micelas mixtas que favorezcan su transferencia hacia el interior del enterocito [6,10]. No obstante, aquellos AG con más de 18 carbonos no son fácilmente absorbidos y serán eliminados por las heces. Una vez en el interior del enterocito, se produce la reesterificación de los TAG y, junto con FL, EC, vitaminas liposolubles y Apo específicas (Apo B-48 y Apo C-III) sintetizadas *de novo*, se forman los QM “nacientes”. Subsecuentemente, estos QM son secretados al torrente sanguíneo y actúan como lipoproteínas de gran tamaño

encargadas de vehiculizar el aporte exógeno de lípidos al organismo [2]. Una vez en circulación, estos QM adquieren proteínas de membrana cedidas por las HDL como la Apo C-II y Apo E transformándose en QM “maduros”. Posteriormente, parte de los TAG del interior de estos QM son eliminados liberando de nuevo AG y glicerol al plasma por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) presente en el endotelio vascular (activada por la liberación de insulina). Estos AGL en circulación podrán atravesar las paredes de los capilares para ser utilizados por las células del organismo como fuente de energía (en forma de ATP mediante la β -oxidación en el interior de las mitocondrias) o almacenados en forma de gotas de grasa (de nuevo como TAG) principalmente en el tejido adiposo [14]. Algunos de los AG liberados al torrente sanguíneo se unen a proteínas plasmáticas como la albúmina y son conducidos al hígado para su metabolización (**Figura 4**) [6,7,11]. El QM resultante interacciona con las HDL y, a través de la acción de la enzima lecitin-colesterol-acil transferasa (LCAT), se le transfiere colesterol esterificado dando lugar a los QM “remanentes”. Finalmente, y gracias a la Apo E, el QM remanente es reconocido y catalizado vía receptores específicos en el hígado (**Figura 3**).

Los restos de los QM remanentes obtenidos del aclaramiento hepático son utilizados para volver a sintetizar TAG a partir de AG y generan las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL se sintetizan únicamente en el hígado y se caracterizan por presentar proteínas estructurales tipo Apo B-100, C-II y E en su membrana y estar compuestas mayoritariamente de TAG y pequeñas cantidades de EC en su interior [7]. Al contrario que los QM, las VLDL son los transportadores principales de TAG, y por tanto de AG, de síntesis endógena. A su paso por el torrente sanguíneo, en primer lugar, se verán sometidas a la hidrólisis de las LPL endoteliales que favorecerán la liberación de una parte de los AG a los tejidos periféricos, como tejido adiposo y músculo. En segundo lugar, la enzima LCAT permitirá la interacción entre VLDL y HDL haciendo que se transfieran EC desde la HDL a la VLDL. Este proceso de pérdida de TAG y ganancia de EC, da lugar a una disminución del tamaño y un aumento de la densidad de la lipoproteína transformándola en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y, finalmente, con sucesivas hidrólisis de TAG y transferencias de EC, en lipoproteínas de baja densidad (LDL) mucho más ricas en EC y con tendencia a ser movilizadas desde el plasma a los tejidos periféricos. Tanto las IDL como las LDL son lipoproteínas de síntesis plasmática a consecuencia del catabolismo de las VLDL e IDL, respectivamente. Por el contrario, las HDL son lipoproteínas de síntesis mayoritariamente hepática y, en menor medida, también provienen del catabolismo de las VLDL y QM remanentes. Se caracterizan por ser las lipoproteínas con mayor contenido proteico y presentar en superficie la Apo C-II, Apo E y mayoritariamente la Apo A-I que es la encargada de activar la enzima LCAT. Además, las HDL son las responsables de movilizar el colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado mediante el "sistema de transporte inverso o reverso del colesterol" para ser eliminado posteriormente por las vías biliares [6,7,11] (**Figura 3**).

Introducción

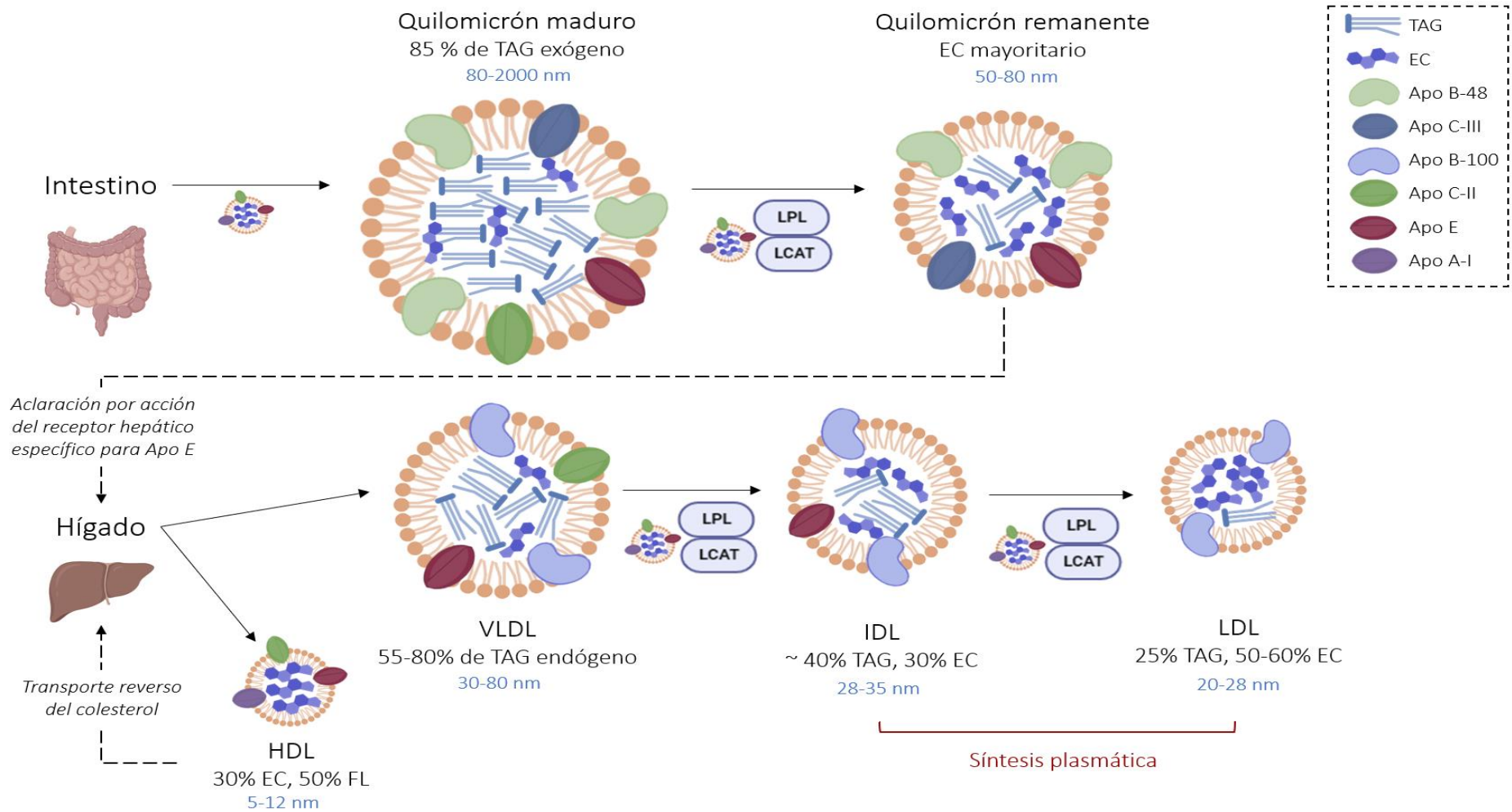


Figura 3. Características principales de las lipoproteínas plasmáticas. Los quilomicrones (QM) son de síntesis intestinal mientras que las VLDL y HDL se sintetizan en el hígado. En menor medida, la HDL también proviene del catabolismo de las VLDL y QM remanentes. Las IDL y LDL se sintetizan en el plasma por el catabolismo de la lipoproteína que le precede gracias a la participación de las HDL y a la acción conjunta de las enzimas LPL y LCAT. Abreviaturas: TAG, triacilgliceroles; EC, ésteres de colesterol; Apo, apolipoproteína, VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; LPL, lipoproteína lipasa; LCAT, Lecitin-Colesterol-Acil transferasa.

Introducción

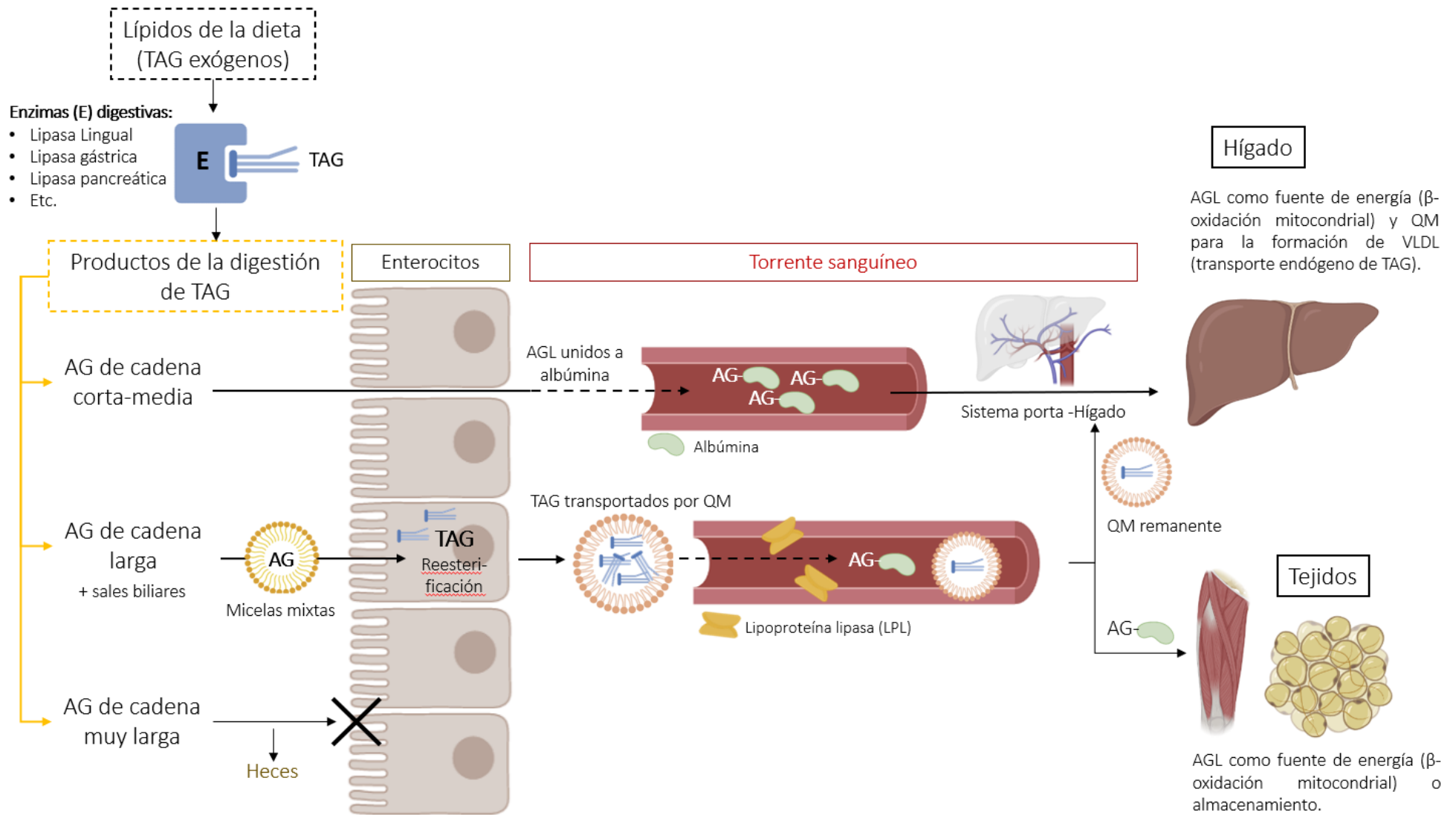


Figura 4. Esquema simplificado de la digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos exógenos al hígado y tejidos extrahepáticos. Abreviaturas: AG, ácido graso; TAG, triacilgliceroles; AGL, ácido graso libre; QM, quilomicrones; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

Además de la presencia de AG en el torrente sanguíneo por las lipoproteínas circulantes, el tejido adiposo puede movilizar las grasas almacenadas al plasma mediante la acción de la triacilglicérido-lipasa o lipasa hormono-sensible presente en el citosol de los adipocitos [2]. Como su nombre indica, esta enzima está influenciada por muchas hormonas: la insulina será la hormona principal encargada de inhibir la lipólisis mientras que, por el contrario, el glucagón, el cortisol, las hormonas de crecimiento o tiroideas aumentarán la lipólisis. También hay que tener en cuenta que determinadas situaciones fisiológicas (ayuno, ejercicio) y patológicas (obesidad, diabetes, hipertiroidismo, hepatopatías, etc.) pueden aumentar la lipólisis. Finalmente, los AG liberados del tejido adiposo serán transportados en sangre por la albúmina hasta llegar a otros tejidos para servir de combustible. El hígado, el músculo esquelético, el corazón y la corteza renal son los principales órganos aceptores de AG para producir energía. Cabe destacar, que el hígado es el único órgano que presenta un doble papel en el metabolismo de los AG, además de la beta-oxidación de los AG también participa en la formación de VLDL que permiten el transporte y suministro de los AG a los tejidos extrahepáticos [9,10].

1.2.2. Formación endógena de ácidos grasos saturados y monoinsaturados

La síntesis *de novo* de los AG tiene lugar en el citoplasma de las células, siendo el hígado el principal órgano de producción de AG seguido de la glándula mamaria y el tejido adiposo. El precursor inmediato de la lipogénesis es el acetyl-CoA, metabolito procedente de la glucólisis y algunos aminoácidos, que permite la formación del ácido palmítico (C16:0) como producto final.

Para que se dé lugar a la formación del ácido palmítico, se requiere que las moléculas de acetyl-CoA salgan de la mitocondria al citoplasma celular mediante un sistema de lanzadera denominado "lanzadera citrato" por acción del enzima citrato liasa. Una vez en el citoplasma, las moléculas de acetyl-CoA se condensan con bicarbonato para formar el malonil-CoA por acción del enzima acetyl-CoA carboxilasa. La combinación de un acetyl-CoA iniciador, una molécula de malonil-CoA (se requiere una por cada 2 carbonos que contenga el AG que se quiere formar) y NADPH, permiten al complejo enzimático ácido graso sintetasa formar AG de hasta 16 átomos de carbono [6].

En caso de que el organismo requiera de AG con cadenas superiores a 16 carbonos, se emplean las enzimas elongasas. La elongación, como parte de la lipogénesis, tiene lugar en el citosol de las células y permite añadir carbonos sobre la cadena del ácido palmítico que se utiliza como molde [15]. Las elongasas originan el ácido esteárico (C18:0) y otros homólogos de hasta 24 átomos de carbono menos abundantes. A su vez, los AGS pueden someterse a procesos de desaturación por acción de enzimas acil graso-CoA desaturasas presentes en el retículo endoplasmático (RE). Estos sistemas enzimáticos introducen dobles enlaces en posiciones específicas (determinado por la nomenclatura *delta*-X o Δ -X) a partir de AGS de más de 6 carbonos. La desaturasa más ampliamente distribuida entre los mamíferos es la Δ 9-desaturasa (D9D) y es responsable de la síntesis de los AG monoinsaturados mayoritarios en nuestras células: el ácido palmitoleico (C16:1n-7) a partir del ácido palmítico y el ácido oleico (OA, C18:1n-9) a partir del ácido esteárico mediante la introducción de un doble enlace *cis* entre el carbono 9 y 10 [6,10].

De esta manera, participando en diversas rutas metabólicas de elongación y desaturación, el ácido palmítico puede dar lugar a la formación de AGS con mayor longitud de cadena carbonada y/o AGMI de la serie n-7 y n-9 con la introducción de un doble enlace (**Figura 5**) [10]. La regulación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de AGS y AGMI viene determinada principalmente por la dieta y determinadas hormonas. Una dieta rica en hidratos de carbono o pobre en grasas incrementará la síntesis de estos AG mientras que un elevado aporte de lípidos en la dieta o concentraciones elevadas de AGPI inhibirá su síntesis. De la misma manera, una situación de ayuno promoverá una disminución de estos AG y un aumento de la síntesis de glucosa para aportar energía al músculo y sistema nervioso central. Paralelamente, un aumento de insulina producirá un aumento de su síntesis mientras que, en presencia de glucagón y catecolaminas, se producirá una disminución de las enzimas encargadas de la biosíntesis de estos AG [4].

1.2.3. Formación endógena de ácidos grasos poliinsaturados

Los AGPI pueden formar parte de cuatro series diferentes denominadas n-7, n-9, n-6 y n-3 en función del AG precursor utilizado para su síntesis. De este modo, se originan a partir del ácido palmitoleico, el ácido oleico (OA), el ácido linolénico (LA) y el ácido alfa-linolénico (ALA) las series n-7, n-9, n-6 y n-3, respectivamente. Para ello, se requiere de la participación de elongasas y desaturasas, concretamente la $\Delta 5$ -desaturasa (D5D) y $\Delta 6$ -desaturasa (D6D).

No obstante, aunque los mamíferos pueden introducir dobles enlaces en la posición $\Delta 9$ para formar los precursores de la serie n-7 y n-9, estos carecen de las desaturasas capaces de introducir un doble enlace en los carbonos 12 ($\Delta 12$ -desaturasa, D12D) y 15 ($\Delta 15$ -desaturasa, D15D) de la cadena carbonada hacia el extremo metilo terminal. Por lo tanto, no pueden sintetizar LA (C18:2n-6) ni ALA (C18:3n-3), respectivamente. Sin embargo, las plantas y el fitoplancton marino pueden producir ambos AG al introducir dobles enlaces en las correspondientes posiciones $\Delta 12$ y $\Delta 15$.

Por tanto, el LA y ALA se definen como ácidos grasos esenciales (AGE) debido a que el organismo no es capaz de sintetizarlos de forma endógena y es completamente dependiente de su ingesta dietética [1,5]. Una vez obtenidos de la dieta, actúan como precursores de los AGPI de las series n-6 y n-3, los cuales se sintetizan principalmente en el hígado y glándula mamaria de madres lactantes [16]. Para ello, se requiere de la acción de las desaturasas (D5D y D6D), de las elongasas del sistema microsómico y de un acortamiento final de la cadena mediante una beta-oxidación en los peroxisomas (**Figura 5**).

El primer paso consiste en la inserción de un doble enlace en la posición $\Delta 6$ del LA y del ALA mediante la acción de D6D, seguido de la introducción de dos carbonos en la cadena mediante la elongasa y un doble enlace posterior en la posición $\Delta 6$ mediante la D5D para formar el ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), respectivamente. En el segundo paso, el AA y EPA son alargados por acción de varias elongasas hasta formar una cadena de 24 carbonos: 24:4n-6 y 24:5n-3, respectivamente. Posteriormente, estos derivados son desaturados por acción de la D6D y finalmente acortados en un ciclo de la ruta beta-peroxisómica formando el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-6) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (**Figura 5**) [4,6,17].

La conversión de los AGE en sus derivados permite que estos se incorporen rápidamente en los FL formando parte de las membranas celulares, particularmente en células y tejidos especializados como el cerebro, la retina, los testículos, el corazón, el hígado y los riñones [18]. Cuando existe una carencia en LA y ALA procedentes de la dieta, se produce una disminución en sangre periférica de dichos precursores que se caracteriza por la formación de AGPI de la serie-9. Este hecho se debe a que el OA (C18:1n-9) actúa como sustrato para la síntesis del ácido eicosatrienoico (C20:3n-9) como efecto compensatorio a la imposibilidad de formar AGPI n-3 y n-6 [4,19]. No obstante, la sustitución de ALA y LA por AGPI de la serie n-9 es compleja para el organismo humano y conllevará a determinados problemas de salud. Entre los signos clínicos característicos de la deficiencia en AGE se encuentran las anomalías neurológicas, dermatológicas, infertilidad, pérdida de tonificación muscular y peso, degeneración renal, pulmonar y hepática, así como problemas inmunológicos [20].

Tal y como se ha comentado anteriormente, las elongasas y desaturasas pueden actuar indistintamente sobre los AG de las diferentes series n-7, n-9, n-6 y n-3 compitiendo entre sí por las transformaciones. No obstante, las desaturasas, y en especial la enzima D6D, tienen mayor afinidad por los AG más insaturados y, por tanto, el orden de preferencia por las diferentes series de AG será el siguiente: serie n-3 > n-6 > n-9 > n-7 con una ratio de afinidad de 10:3:1:>1, respectivamente [5]. Sin embargo, la prioridad de la D6D por la síntesis de derivados de la serie n-3 a partir del ALA puede verse afectada por diferentes razones:

- **Competición enzimática y dietas ricas en AGPI omega-6**

La conversión del ALA por acción de la D6D va a depender de la concentración plasmática y niveles celulares del LA y sus derivados. Un exceso de AGPI n-6 puede afectar al metabolismo del ALA reduciendo la incorporación de sus derivados, EPA y DHA, a los tejidos y alterando sus funciones biológicas. Para determinar si existe un desequilibrio entre ambos tipos de AGPI, se emplea la ratio n-6/n-3 [18]. Se estima que para conseguir efectos beneficiosos para la salud la ratio n-6/n-3 debe mantenerse en torno 5:1-10:1 como máximo [4,21]. No obstante, otros autores han determinado que la ratio óptima para reducir considerablemente el riesgo de determinadas patologías (enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, cáncer, enfermedades autoinmunes, etc.) varía entre 1:1 a 4:1 en función de la enfermedad considerada y su severidad [22–24]. No obstante, el cambio en la composición de la dieta en las últimas décadas ha supuesto que, en algunas áreas urbanas de países occidentales se alcancen ratios del orden de 15-20:1 y en países orientales se supere incluso el valor de >35:1 [23]. Este marcado desequilibrio se debe principalmente a la falta de consumo de dietas ricas en pescados y derivados marinos pero también al aumento de alimentos procesados con alto contenido en AGPI n-6 [21,23], todo ello favorece que la vía prioritaria de actuación de la D6D sea la síntesis de derivados de la serie n-6 en lugar de n-3 [16,18].

- **Rendimiento de la transformación de AGPI omega-3**

Con respecto a las rutas de síntesis de los AGPI n-6 y n-3, hay que saber que son independientes la una de la otra y no se produce reacción cruzada entre ambas. Además, en caso de que hubiera un déficit de alguna de las series, ninguno de sus compuestos puede sintetizarse de forma alternativa a partir de un AG de la otra serie. Frente a esta limitación se suma que, aunque se consiga la conversión del ALA en sus derivados, las rutas de síntesis de la serie n-3 son poco

eficientes en el organismo [5], especialmente para el DHA [25–27]. Algunos autores han concluido que, en el caso de las mujeres, el porcentaje de conversión es mayor debido posiblemente a un efecto regulador del estrógeno [25,28]. La formación de EPA y DHA se caracteriza principalmente por estar condicionada por la biodisponibilidad de su precursor ALA. Otro factor importante es la variabilidad genética del individuo en los genes de las desaturasas que pueden afectar al metabolismo de estos AG. Por estos motivos, se pone de manifiesto la necesidad de nuestro organismo por contar con el consumo directo de EPA y DHA en la dieta (ver apartado **1.4.1.3. Ácidos grasos omega-3**).

Para evaluar la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis de AGPI y/o la producción equilibrada de los AGPI n-6 y n-3, algunos autores han establecido una serie de índices que permiten orientar sobre qué ruta enzimática está actuando mayoritariamente (si predomina aquella que produce AGPI n-6 o n-3) y, además, indicar si en una misma ruta el funcionamiento es correcto (es decir, que no se genera una acumulación de sustratos o precursores de los productos finales de la reacción enzimática). Entre estos índices, podemos destacar: (i) el índice n-6/n-3 ampliamente utilizado [22–24,29]; (ii) los índices AA/EPA y AA/(EPA + DHA) para valorar la producción de los AGPI n-6 con respecto a los AGPI n-3 [30]; (iii) el índice LA/DGLA para valorar la ruta de síntesis de los AGPI n-6 [30]; y, (iv) el índice EFA (del inglés, *Essential Fatty Acids*) como indicador del estado global de los AGE y AGPI [31].

En general, es importante que exista un balance entre el consumo de AGPI de la serie n-6 y n-3 para conseguir efectos beneficiosos por la salud y reducir el riesgo de enfermedades crónicas (con alta prevalencia) en los países desarrollados.

1.3. Funciones generales en el organismo

Los AG tienen un papel fundamental en el organismo debido a las diferentes funciones biológicas que ejercen. Las más importantes a destacar son:

- Propiedades aislantes y conductoras
- Combustible energético
- Unidad estructural: formación de membranas celulares y de proteínas asociadas a membrana.
- Sustrato con especificidad por determinadas enzimas
- Regulador de la expresión génica: factor de transcripción de receptores de membrana nucleares.
- Precursores de mediadores lipídicos: formación de eicosanoides.

1.3.1. Propiedades aislantes y conductoras

Los tejidos con un alto contenido en TAG, como el tejido graso subcutáneo o visceral, actúan como aislantes térmicos y mecánicos (amortiguan de posibles traumatismos) [20]. A nivel cutáneo, los AGPI de cadena muy larga que forman la estructura principal de las ceramidas presentes en el estrato corneo de la epidermis, intervienen en la regulación de la permeabilidad

de la barrera cutánea (intercambio de líquidos entre interior y exterior de la piel) y, por tanto, evitan la pérdida hídrica y la sequedad cutánea. Para ello, la formación de las ceramidas depende de un aporte notable de AGE a la piel [32]. A nivel del sistema nervioso central (SNC) los AG actúan como conductores. Estos se encuentran en gran abundancia en la capa de mielina que recubre las neuronas favoreciendo un grosor adecuado de dicha capa y permitiendo que la conducción sea más rápida a lo largo del axón [20].

1.3.2. Fuente de energía para el organismo

En el organismo, los lípidos constituyen la principal fuente de energía del organismo. Los AG en forma de TAG procedentes de la dieta son almacenados en el citoplasma de las células adiposas. Estas células del tejido adiposo son las encargadas tanto de la síntesis y almacenamiento de TAG, como de su hidrólisis y movilización a través del torrente sanguíneo como moléculas de combustible energético para otros tejidos [4]. La obtención de la energía a través de los AG se consigue mediante un proceso de degradación oxidativa o β -oxidación que tiene lugar en las mitocondrias, especialmente en tejidos como el hígado, músculo esquelético, miocardio, riñones o pulmones. Este proceso metabólico permite la obtención de una importante cantidad de moléculas de ATP. Por ejemplo, por cada molécula de ácido palmítico (activado a palmitoil-CoA), se obtiene un total de 129 moléculas de ATP.

A diferencia de los carbohidratos y proteínas, los lípidos aportan mayor cantidad de energía en el organismo. Alrededor de un 25-35% de la energía diaria de la dieta proviene de la ingesta de grasas, lo que equivale a 56-78 gr de grasa/día o al estándar de 8400 kJ o 2000 kcal al día [20].

1.3.3. Unidad estructural en el organismo

- **Componente estructural de membranas celulares**

Todas las células del cuerpo humano están formadas por una membrana plasmática (MP), citoplasma y núcleo. La MP es una barrera dinámica que además de proteger a la célula del exterior, permite el transporte de sustancias desde el espacio intracelular al espacio extracelular y viceversa. La MP está formada por una bicapa lipídica donde más del 50% de su estructura la conforman lípidos y el resto está formado principalmente por proteínas. Los lípidos mayoritarios son los fosfolípidos [3,33] que están formados por una cabeza polar o hidrofílica y una cola apolar o hidrofóbica con dos AG y ejercen funciones celulares específicas, metabólicas y de señalización. Según el tipo de célula, las membranas tendrán diferente composición en AG lo que influye en la fluidez, la flexibilidad y estabilidad de dichas membranas [34]. Estas características de la membrana también dependerán de la interacción de los AG con el colesterol y proteínas presentes también en la membrana [20].

En cuanto a la naturaleza de los AG, uno de los factores que más influye en la fluidez de la membrana es su grado de insaturación. En caso de tratarse de AGS o AGI en conformación *trans*, estos se disponen en forma empaquetada, disminuyendo el espacio/movimiento entre ellos y la fluidez de la membrana. Contrariamente, los AGI en conformación *cis* ocupan un mayor espacio y son más móviles lo que se traduce en un aumento de la permeabilidad de la membrana y un mejor desplazamiento de las proteínas a través de la bicapa lipídica [20,35]. En el caso de

los AGPI, todavía aportan mayor fluidez a la membrana y esto, por ejemplo, ayuda a aumentar la flexibilidad de la pared arterial y venosa contribuyendo a un efecto beneficioso en enfermedades cardiovasculares [36].

No obstante, se ha descrito que los AGPI se oxidan fácilmente por lo que un aumento de estos en la membrana celular puede conducir a una peroxidación lipídica y afectar seriamente la integridad de la célula [1,36]. Los derivados obtenidos de este proceso de autooxidación se emplean como marcadores del daño oxidativo celular [20]. Un claro ejemplo, es la peroxidación de los FL ricos en AGPI n-6 presentes en la membrana de las lipoproteínas LDL, lo que produce una modificación de la estructura de dicha LDL favoreciendo su fagocitosis por macrófagos e iniciando el desarrollo de la aterosclerosis [1]. Sin embargo, cuando se trata de FL ricos en AGPI n-3 (en particular, el DHA) se ha visto que se produce un cambio significativo en la fluidez de la membrana y en la función de determinadas proteínas asociadas a la membrana. Además, los AGPI n-3 poseen un efecto antioxidante que resulta necesario para células con elevada actividad metabólica como las células de la retina (la elevada presencia de DHA favorece el transporte de rodopsina por la MP de los bastones necesario para el ciclo visual) y para los axones neuronales ya que favorecen el potencial eléctrico y la transmisión de la señal [36]. De hecho, el DHA representa el 50% de los AG presentes en los FL de la retina y el 40% en la membrana sináptica de las neuronas [10], por lo que, una disminución del porcentaje de estos derivados tiene un efecto directo en el SNC [37].

Hay que destacar que la dieta también tiene un papel importante en la cantidad y tipo de AG que compone la membrana celular pudiendo producir cambios significativos en la función celular. Es el caso particular de los AGPI n-3, una ingesta abundante de estos permite la incorporación de EPA y DHA en cantidades elevadas produciendo un efecto positivo en las propiedades físicas y biológicas de las membranas [1]. Por tanto, una óptima función tisular y celular requiere de un suministro adecuado y equilibrado de AGPI a través de la dieta para que pueden ser incorporados a las membranas celulares.

- **Componente estructural de proteínas asociadas a membrana**

La S-acilación de proteínas es una modificación postraduccional que consiste en la adición covalente de una molécula lipídica de cadena larga sobre residuos de cisteína, a través de un enlace tioéster. Por lo general, el lípido añadido es el ácido palmítico, motivo por el cual esta modificación es comúnmente llamada palmitoilación [38]. Sin embargo, algunas proteínas también están aciladas con ácido esteárico (18:0) o mirístico (14:0) e incluso con algunos AGPI. La reacción de acilación en determinadas proteínas es crucial para que adquieran su función biológica ya que permite el correcto plegamiento de dichas proteínas y su anclaje en las membranas (mejora su estabilidad, interacción con otras proteínas y su actividad catalítica) [1,20]. En los últimos años, el interés por la S-acilación ha incrementado debido a que se ha visto involucrada en numerosos procesos de gran relevancia biológica, como la transducción de señales y la transmisión sináptica pero también en procesos patológicos, como la discapacidad intelectual y distintos tipos de cáncer [38].

1.3.4. Sustrato específico

Las funciones biológicas de determinados AG dependen de su unión a enzimas o receptores. Un claro ejemplo, es la incorporación preferente de los AGPI n-3 en los FL de membrana al ser sustratos con mayor afinidad por las enzimas responsables de la síntesis de AG, como la D6D [1,5]. En el caso concreto del DHA, una elevada concentración de este AG en la MP puede influir en algunas de las proteínas asociadas a dicha membrana aumentando su actividad. Por ejemplo, la bomba ATP_{asa} de Na^+ y K^+ aumentará su actividad a nivel del SNC para proporcionar un aporte extra de energía y los canales iónicos de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} dependientes de voltaje aumentarán su actividad en las células cardíacas para favorecer su actividad [36]. Los AG también pueden actuar como segundos mensajeros desencadenando la activación de la protein kinasa C, enzima que cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares y actúa en multitud de procesos celulares [20].

Además, los AG actúan como ligandos de las proteínas de unión a los ácidos grasos (FABP, del inglés, *Fatty Acid-Binding Proteins*). Las FABP son una familia de proteínas transportadoras de sustancias lipófilas como los AG, los eicosanoides y los retinoides. Se han identificado al menos 9 isoformas diferentes de FABP: hepática (L-FABP/FABP1), intestinal (I-FABP/FABP2), cardíaca (H-FABP/FABP3), en los adipocitos (A-FABP/FABP4/aP2), epidérmica (E-FABP/FABP5/mal1), en el íleon (II-FABP/FABP6), cerebral (B-FABP/FABP7), en la mielina (M-FABP/FABP8) y en los testículos (T-FABP/FABP9) [39,40]. No obstante, no son específicas de un determinado tejido y se pueden localizar en varios de ellos. Concretamente, la placenta dispone de FABP1, FABP3, FABP4, FABP5 y FABP7 [41]. La expresión de las proteínas FABP estará aumentada en función del aporte de lípidos y necesidades metabólicas que requiera la célula. En ese sentido, los hepatocitos, los adipocitos y los cardiomiocitos, que emplean cantidades elevadas de AG para la biosíntesis de energía, presentan un porcentaje elevado de FABP a nivel de la membrana y citosol para facilitar el flujo de AG. También se ha visto que las proteínas FABP pueden tener un papel en la regulación de la expresión génica al dirigir los AG al interior del núcleo celular y favorecer su unión a ciertos factores de transcripción (**Figura 5**) [40]. No obstante, la expresión de estas proteínas se verá incrementada cuanto mayor sea su exposición a los AG. En los últimos años, se ha visto que las FABP juegan un papel clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas e inflamatorias, como la obesidad, la diabetes mellitus, la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares [39].

En condiciones fisiológicas, las proteínas FABP tienen mayor afinidad por los AG de cadena larga, especialmente por el LA y ALA, favoreciendo su transporte al interior de las células y orgánulos intracelulares (**Figura 5**) y garantizando la síntesis de los correspondientes derivados de la serie n-6 y n-3. A nivel cerebral, la FABP7, tiene elevada afinidad por el DHA [40]. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo inducido por obesidad u otros trastornos del metabolismo de los lípidos, el ácido palmítico adquiere mayor afinidad por las proteínas FABP [39].

1.3.5. Regulador de la expresión génica

Los AG sintetizados o procedentes de la dieta (principalmente AGPI) pueden actuar, directa o indirectamente, como reguladores de la homeostasia lipídica mediante su interacción con receptores de membrana nucleares denominados receptores activadores de la proliferación

peroxisomal o PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) [10]. En condiciones fisiológicas (cuando existen niveles correctos de AG en el organismo), los AG actúan como ligandos o factor de transcripción del receptor PPAR haciendo que se active (activación transcripcional) y forme un heterodímero con otro receptor nuclear, el receptor del ácido retinoico X (RXR). Ambos, a su vez, se une a un elemento de respuesta a la proliferación peroximal o PPRE (*Peroxisome Proliferator-Response Elements*) en la molécula de ADN. Mediante este mecanismo de regulación génica, los AG ejercen de estimuladores de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en rutas metabólicas cruciales para el organismo (metabolismo de los propios AG, de los carbohidratos y proteínas, así como en el crecimiento y diferenciación celular) [1,4,10,20,42] (**Figura 6**).

Los receptores PPAR constituyen una superfamilia de receptores nucleares que controlan la expresión génica de las hormonas esteroideas, glucocorticoides, tiroxina, ácido retinoico y vitamina D y, con lo cual, intervienen en diversos aspectos del desarrollo, reproducción y homeostasia energética en el organismo humano. Se conocen tres isoformas de receptores PPAR, denominadas α , β/δ y γ , que son codificadas por genes específicos para cada isoforma [43]. Cada tipo se expresa en un tejido específico: el receptor PPAR- α se expresa principalmente en tejidos implicados en la oxidación lipídica como el hígado, tracto gastrointestinal, glándula adrenal y riñón; el receptor PPAR- β/δ se expresa prácticamente en todos los tejidos, aunque destaca en el músculo cardíaco y en el tejido nervioso; finalmente, el receptor PPAR- γ se expresa predominantemente en el tejido adiposo y en menor medida en el bazo, intestino, ganglios linfáticos (células del sistema inmunitario), endotelio vascular así como en ciertos tumores [4,43,44].

En cuanto a los efectos biológicos que producen estos receptores, se sabe que PPAR- α regula principalmente el metabolismo energético, activando el catabolismo de AG y lipoproteínas y estimulando la gluconeogénesis. El incremento de la oxidación de los AG disminuye la concentración de TAG en sangre circulante y los lípidos almacenados en hígado, músculo y tejido adiposo [43,45]. Este receptor se activa principalmente por eicosanoides derivados del AA, LA, OA, ácido palmítico y, agonistas sintéticos tipo fibratos que se usan actualmente para el tratamiento de las dislipemias [45,46]. Por otro lado, PPAR- γ participa fundamentalmente en la diferenciación de los adipocitos y metabolismo de los AG. También tiene un papel importante en el metabolismo de la glucosa mejorando la sensibilidad a la insulina, de forma que, el empleo de agonistas sintéticos de receptores PPAR- γ (tiazolidinedionas y glitazonas) ayudan en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) [45]. Además, promueve la detención del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina en varias células tumorales [43]. Este receptor se activa de forma endógena por LA, ALA y sus derivados oxidativos, y prostaglandinas [46]. Por último, el receptor PPAR- β/δ es el menos caracterizado hoy en día, pero se sabe que actúa en la regulación de los niveles de colesterol HDL y control glucémico, mejora la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina [43]. Este receptor se activa de manera no específica por eicosanoides y por ésteres del ácido palmítico y oleico [46].

En cuanto al papel de la dieta, se conoce que el tipo de AG ingerido con la dieta guarda estrecha relación con la actividad de los receptores PPAR como reguladores transcripcionales [34]. En caso de una ingesta adecuada de AGPI, especialmente de n-3, se producirá un aumento de estos en los FL de las membranas celular desde donde contribuirán a las funciones celulares y la

capacidad de respuesta de las células antes mencionadas. No obstante, si predomina una dieta rica en AGS y AG *trans* (que, además, aportan bajas cantidades de AGE n-6 y n-3), se producen efectos antagonistas sobre los receptores PPAR. Concretamente, producen una disminución de la estimulación de los receptores PPAR que conlleva a una disminución de la oxidación de los lípidos y acumulación en estos en los tejidos. Como consecuencia del desequilibrio en el aporte de AGE, se modifica la composición de AG en los FL de las membranas celulares debido a la menor disponibilidad de AA, EPA o DHA. Esto generará cambios en la respuesta de los receptores y enzimas cuya actividad está asociada a las membranas. Finalmente se traducirá en una alteración del metabolismo, como es el aumento de la resistencia a la insulina, lo cual a su vez aumenta el riesgo de patologías como la obesidad, la diabetes tipo II y las dislipemias [4].

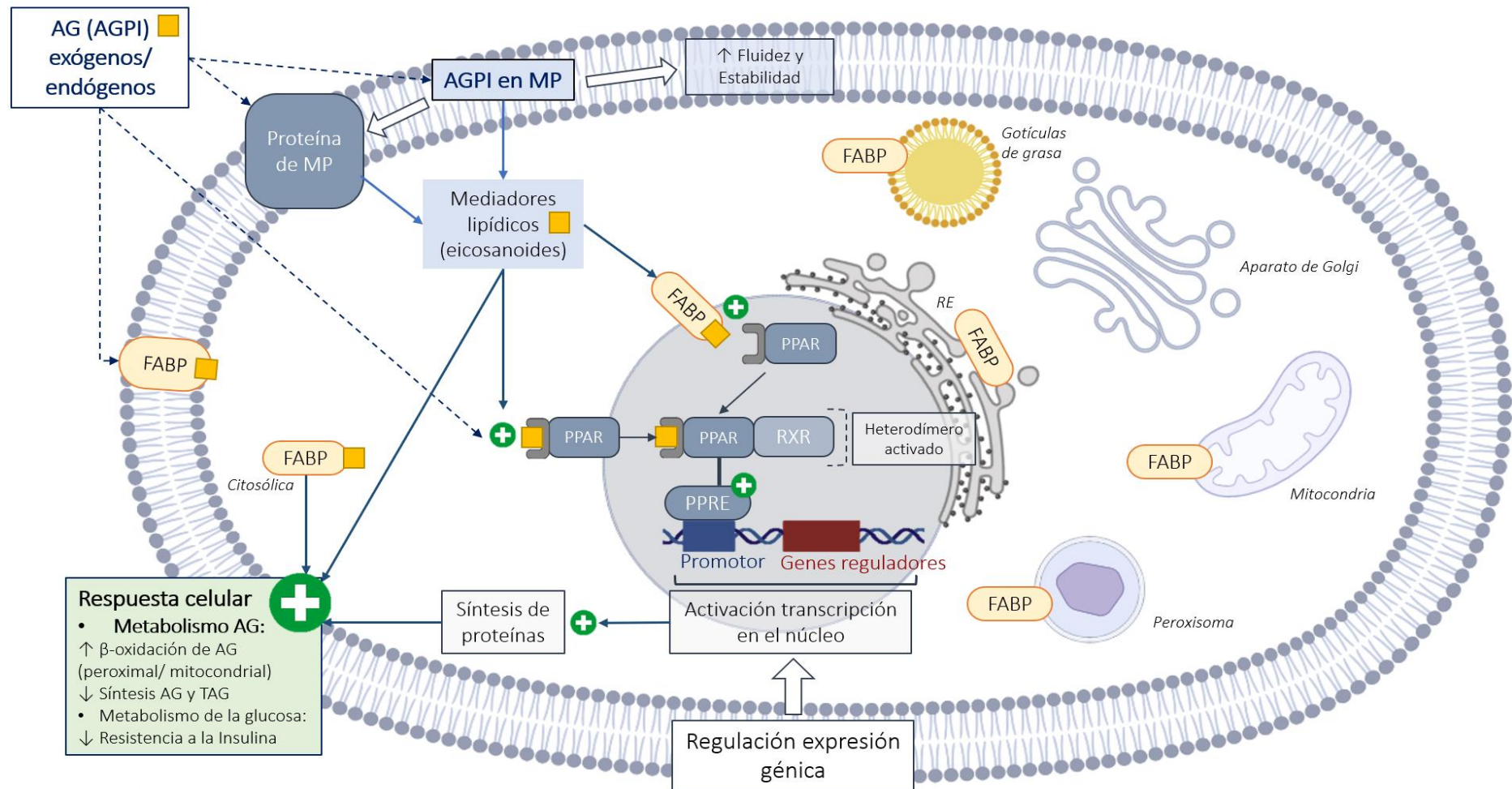


Figura 6. Papel de los ácidos grasos en la regulación de la expresión génica en la célula. A nivel intranuclear, la unión de los AGPI y/o derivados eicosanoides al receptor PPAR permite su activación y promueve la formación de un heterodímero entre dicho receptor y el receptor del ácido retinoico (RXR). A su vez, el receptor PPAR se une a secuencias específicas (PPRE) del ADN localizadas en las regiones promotoras de los genes diana o reguladores. Las proteínas de unión a los AG (FABP) transportan los AG a los compartimentos específicos de la célula para su metabolización. Las FABP acceden al núcleo en determinadas condiciones y dirigen los AG a los factores de transcripción como PPAR. Abreviaturas: MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplasmático. Figura adaptada de Djuricic, I. & Calder, P.C. [34] y Gil-Sánchez et al. [41].

1.3.6. Formación endógena de los eicosanoides

La palabra eicosanoide, del griego *eikosa* que significa 20, denota el número de átomos de carbono de los AGPI que actúan como sus precursores [1]. Son moléculas con una gran actividad biológica, de vida media corta y que actúan como hormonas a nivel local debido a su rápido catabolismo [47]. Los eicosanoides derivan por lo tanto del ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA, 20:3n-6), el AA (C20:4n-6) y el EPA (C20:5n-3). Estos tres AGPI precursores se encuentran formando parte de los FL de las membranas celulares y serán liberados por enzimas de la familia de las fosfolipasas. Concretamente la fosfolipasa A₂ es la que libera al AA mayoritariamente [10]. Las fosfolipasas se activan frente a determinados estímulos como los procesos inflamatorios [48]. Una vez liberados, el DGLA, AA y EPA sirven de sustrato para las enzimas ciclooxigenasas, lipooxigenasas y citocromos P₄₅₀ monooxigenasas (**Figura 7**) [10,49,50].

- **Ciclooxigenasas:** intervienen dos tipos de ciclooxigenasas, la COX-1 que se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos y, la COX-2 que está presente en niveles bajos hasta que es inducida por estímulos inflamatorios como la liberación de citoquinas, endotoxinas, sustancias promotoras de tumores y algunos lípidos [49]. La acción de estas enzimas sobre DGLA, AA y EPA originan prostaglandinas (PG), tromboxanos (TXA) y prostaciclina (PGI) que se engloban en el término genérico de prostanoides.
- **Lipooxigenasas:** intervienen varias isoformas (n-LOX) como la 5-, 8-, 12- y 15-LOX que dan lugar a los leucotrienos (LT), lipoxinas y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (8-, 12-, y 15-HETE). La enzima 5-LOX es la que juega un papel fundamental en la formación de los leucotrienos.
- **Citocromo P₄₅₀ monooxigenasa:** origina derivados dihidroxi- y epoxi-ácidos.

Dado que el número de dobles enlaces del DGLA, AA y EPA son diferentes, cada uno de ellos dará lugar a una serie diferente de eicosanoides (**Tabla 2**). Se considera que los eicosanoides derivados del AA son biológicamente más activos que los derivados del EPA y DGLA.

También hay que tener en cuenta que las enzimas que participan en estas rutas (COX, LOX, etc.) carecen de especificidad por los sustratos AA, EPA o DGLA. Por lo tanto, la síntesis de una serie u otra de eicosanoides dependerá de la disponibilidad de dichos sustratos en la membrana celular y de la competencia enzimática que se produzca entre ellos. No obstante, dado que las membranas celulares están compuestas principalmente por AA y, en menor medida por EPA y DGLA, el sustrato dominante para la síntesis de eicosanoides es el AA [47]. En los últimos años se han identificados nuevos eicosanoides derivados del EPA y DHA, las denominadas resolvinas de la serie E procedentes del EPA y, las resolvinas de la serie D, protectinas y maresinas procedentes del DHA denominadas en términos generales como docosanoideos (**Tabla 2**) [4,10,47,49,50]. Un consumo elevado de ambos omega-3 puede incrementar su concentración en las membranas celulares y servir de sustrato prioritario para las enzimas COX y LOX reduciendo así la síntesis de eicosanoides derivados del AA y sus efectos fisis-patológicos [6,47].

Tabla 2. Síntesis de eicosanoides a partir de sus precursores.

Precusores omega-6 y omega-3	Eicosanoides sintetizados
DGLA	PG, PGI y TX de la serie 1 y LT de la serie 3
AA	PG, PGI y TX de la serie 2 y LT de la serie 4
EPA	PG, PGI y TX de la serie 3, LT de la serie 5, resolvinas de la serie E
DHA	Resolvinas de la serie D y protectinas (neuroprotectina D1)

Abreviaturas: PG, prostaglandinas; PGI, prostaciclina; TX, tromboxanos.

Otras características que definen a los eicosanoides es que su distribución tisular es variable: los PG se forman prácticamente en todos los tejidos mientras que el resto de eicosanoides tienen localizaciones más específicas. Así pues, los TX se originan en el interior de las plaquetas, las PGI están presentes en el endotelio vascular y los LT se hallan mayoritariamente en los leucocitos (**Figura 8**) [50].

Además, las funciones de los eicosanoides también son muy diversas y se conoce que aquellos derivados del AA son biológicamente más activos que los derivados del EPA y DGLA. Por lo general, los que provienen del AA tienen carácter proinflamatorio y proagregante mientras que los derivados del EPA son antiinflamatorios y antiagregantes [50]. Los TXA₂ ejercen un poderoso efecto estimulante de la agregación plaquetar, tienen una acción vasoconstrictora y promueven la contracción de la musculatura lisa. Como antagonistas de los TX, las PGI₂ inhiben la agregación de las plaquetas en el endotelio vascular, presentan acción vasodilatadora que favorece la disminución de la presión arterial y permiten la relajación a nivel de músculo liso. Por lo tanto, la homeostasis vascular y la regulación del tono vascular dependen principalmente de un adecuado equilibrio entre ambos prostanooides [47]. En cuanto a las prostaglandinas, por un lado, las PGE₂ regulan procesos inflamatorios, liberan citoquinas mediadoras y poseen efecto vasodilatador, además, ejercen una doble acción sobre las plaquetas: a bajas dosis potencian el efecto de los TXA₂, pero a dosis alta inhiben la agregación plaquetar como las PGI₂. Por otro lado, las PGD₂ tienen un efecto proinflamatorio a nivel de vías aéreas, piel y mucosas y actúa como antiagregante plaquetar [51]. Los LT también participan en procesos inflamatorios y alérgicos, concretamente, los LTB₄ actúan como mediadores quimiotácticos favoreciendo la migración de los leucocitos al foco inflamatorio [4,50] (**Figura 8**). Por último, las resolvinas, protectinas y maresinas derivadas del EPA y DHA tienen un potente efecto antiinflamatorio y previenen del daño tisular especialmente a nivel neuronal y en el tejido adiposo [49].

A grandes rasgos, los eicosanoides juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria y sistema inmunológico, también a nivel vascular y cardiovascular (TXA₂ y PGI₂) [49,52,53], renal (PGI₂ y PGE₂) [54], gastrointestinal (PGI₂ y PGE₂) [55], aparato reproductivo y embarazo (PGE₂) [47,56,57]. Son moléculas muy importantes desde un punto de vista fisiológico, pero un exceso o desequilibrio en su producción puede estar relacionado con determinadas patologías como enfermedades inflamatorias crónicas (psoriasis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria intestinal) o cáncer [47].

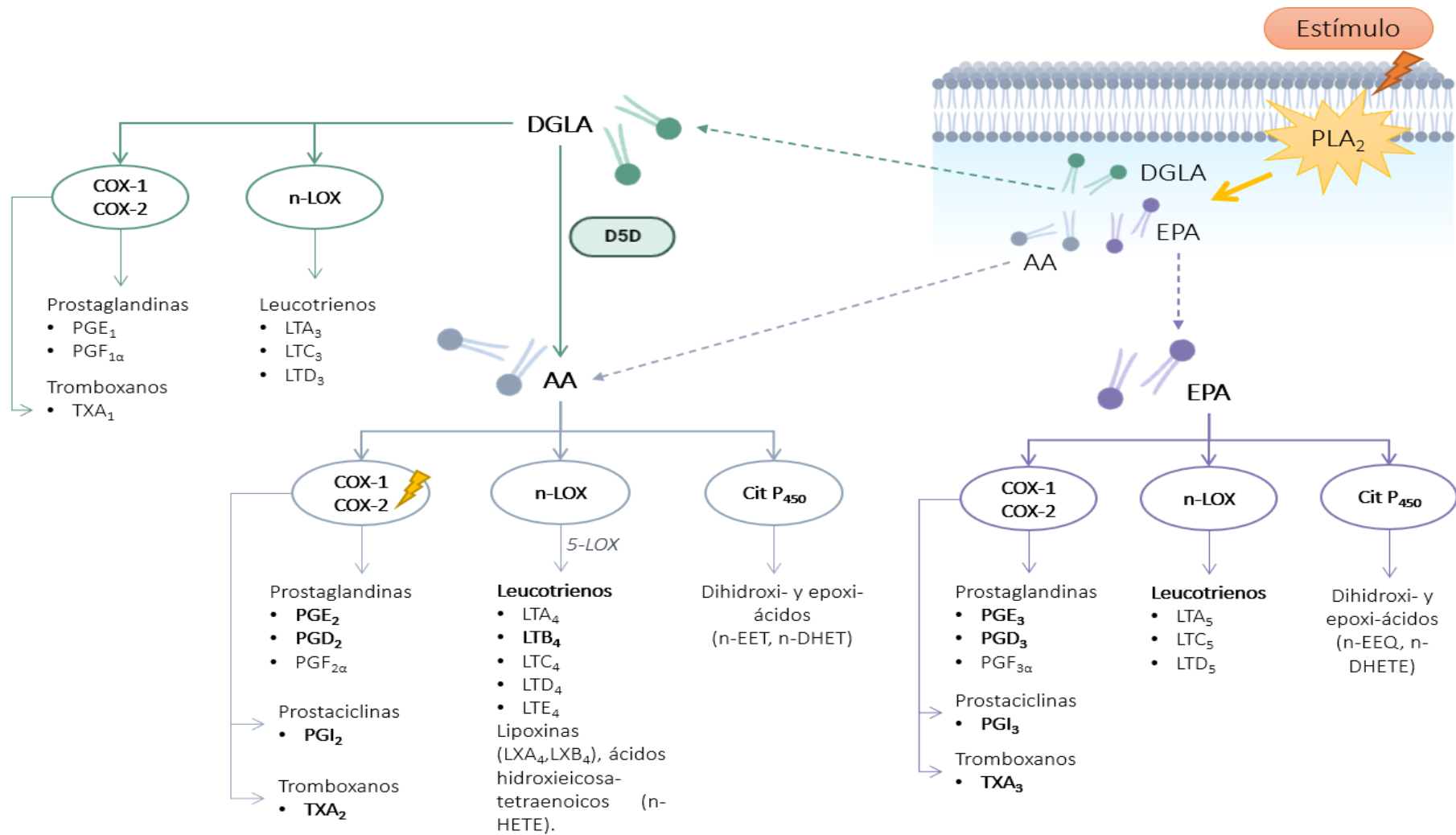


Figura 7. Síntesis de eicosanoides a partir de sus derivados. La COX-2 es inducible y se activará en presencia de endotoxinas, citoquinas y mitógenos mientras que se inhibirá por fármacos antiinflamatorios esteroideos como los glucocorticoides o inhibidores selectivos (-coxibs). Abreviaturas: DGLA, ácido dihomogamma-linólico; AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; PLA₂, Fosfolipasa A₂; D5D, Δ5-desaturasa; COX, ciclooxigenasa; LOX, lipooxigenasa; Cit P₄₅₀, citocromo P₄₅₀ monooxigenasa; PG, prostaglandina; LT, leucotrieno; TX, tromboxano; EET, ácido cis-epoxieicosatrienoico; DHET, ácido dihidroxieicosatrienoico. Figura adaptada de la bibliografía [1,4,49,50].

Introducción

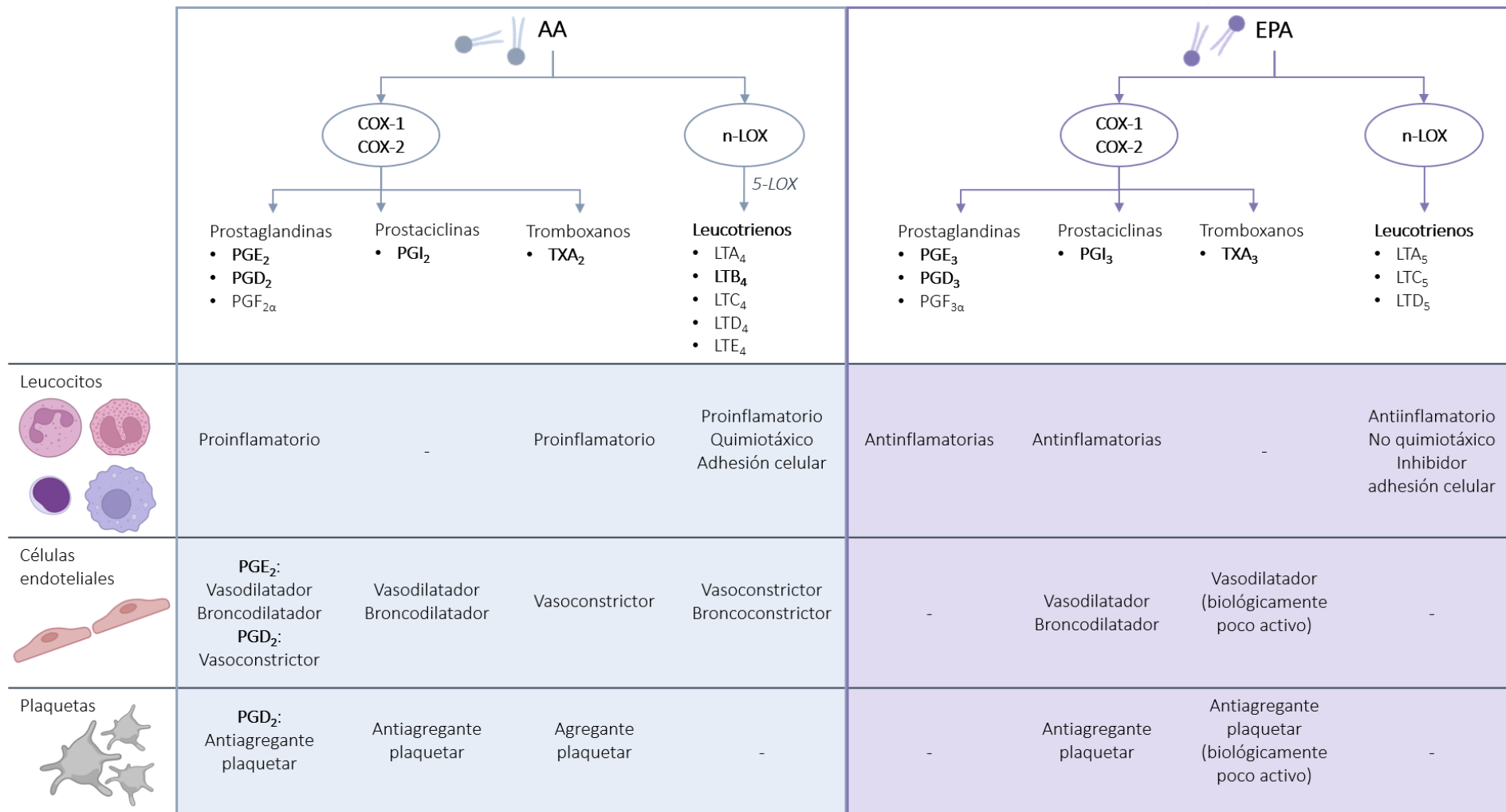


Figura 8. Distribución y funciones biológicas de los eicosanoides. En líneas generales, los eicosanoides derivados del AA tienen un potente efecto proinflamatorio y antiagregante mientras que los derivados del EPA tienen un efecto antiinflamatorio y antiagregante, pero con menor potencia. Abreviaturas: AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; COX, ciclooxigenasa; LOX, lipooxigenasa; PG, prostaglandina; LT, leucotrieno; TX, tromboxano. Nota: el símbolo (-) implica que se desconoce la función que ejerce el eicosanoide en esta célula.

1.4. Fuentes alimentarias de los ácidos grasos y recomendaciones dietéticas

La ingesta de AG en la dieta ha ido variando paulatinamente durante la evolución del ser humano hasta sufrir cambios importantes en los dos últimos siglos. Hace 40.000 años, el ser humano era un cazador-recolector y su alimentación dos últimos siglos era particularmente abundante en carnes magras, peces, vegetales verdes, frutas, raíces y miel, una dieta que en su conjunto aportaba una adecuada cantidad de AGE n-6 y n-3 (aproximadamente 1:1) y un consumo total de grasa que no debía superar el 20%. Posteriormente, hace 10.000 años, se inició la agricultura lo que permitió introducir cereales como el trigo, arroz o maíz y, además, domesticar a los animales. El ser humano se alimentaba entonces de los productos de su propia cosecha y animales de crianza. Pese a la introducción de los cereales, no se produjeron cambios relevantes en el aporte en AGE y grasas. No fue hasta la Revolución Industrial (segunda mitad del siglo XIX) cuando se modificó la alimentación con la introducción de procesos industrializados para la obtención de alimentos y conservación de los mismos durante periodos largos. En el caso particular de las grasas, se desarrollaron procedimientos para su extracción a partir de tejidos animales y semillas vegetales lo que produjo una modificación del perfil lipídico: se aumentó la composición en AGS y AGMI, mientras que los aportes de AGE eran muy escasos. Más adelante, en el siglo XX, la nueva era industrial permitió incorporar el proceso de hidrogenación de las grasas para lograr un mejor manejo y estabilidad de los aceites de origen vegetal y animal. La hidrogenación afecta a los AG más insaturados como los AGE disminuyendo aún más sus concentraciones y, además, genera nuevos derivados o isómeros *trans* perjudiciales para la salud. Estos isómeros *trans* son capaces de competir con la enzima D6D y disminuir/inhibir la formación de los AG derivados de los AGE [4] (**Figura 9**). Con la industrialización, se empezaron a introducir en los alimentos procesados aceites vegetales ricos en AGS y LA (presentes, por ejemplo, en el aceite de girasol, maíz, coco o palma) y aceites hidrogenados *trans* (sin aporte de AGE), para abaratar los costes de producción y mejorar la palatabilidad de los productos. Con ello, aumentó considerablemente el consumo de grasas diarias y se generó una notable desproporción en la ratio n-6/n-3 (superando ratios >15:1 según la población) con efectos negativos para la salud [22,58].

Actualmente, los AG ingeridos a través de la dieta deben representar aproximadamente el 25-30% de la energía total [1]. Para la mayoría de los individuos adultos, se recomienda una ingesta mínima de AG del 15% para asegurar un consumo adecuado de energía total, AGE y vitaminas liposolubles. Por otro lado, se estima que la ingesta máxima no debe sobrepasar el 35% [6]. No obstante, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) [59] recomienda no superar el 30% de la ingesta calórica total aunque, en la población española, la ingesta de AG ronda el 35-40%. En general, las fuentes alimentarias más importantes que aportan AG son los aceites vegetales, productos lácteos, carne, pescado o aceites de pescado, semillas y frutos secos.

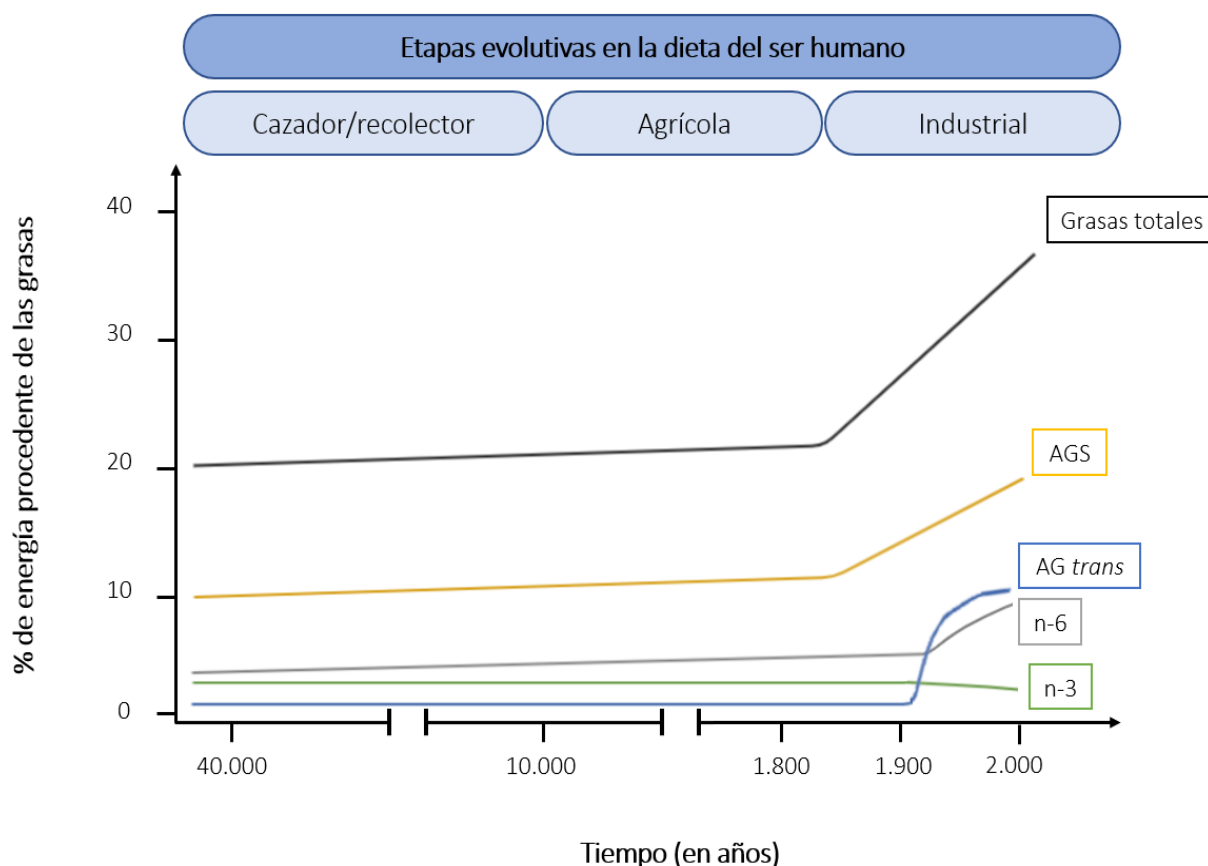


Figura 9. Esquema hipotético de la evolución de los ácidos grasos e ingesta de grasa. Figura adaptada de Simopoulos, A.P. [22,60].

1.4.1. Ácidos grasos saturados

Los AGS provienen principalmente de productos de origen animal como los derivados lácteos (mantequilla, quesos, leche entera) y las carnes grasas. También están en elevadas cantidades en productos manufacturados (como la bollería industrial). Los AGS abundan en aceites vegetales como el de palma, coco, cacahuete o manteca de cacao (Tabla 3). Se considera que los AGS predominantes en la dieta humana son el ácido palmítico (C16:0), seguido del esteárico (C18:0) y en menor medida del ácido mirístico (C14:0) [1,5,6,14].

Según la valoración de la Consulta de Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el caso de los AGS, se recomienda que la ingesta no exceda el 10% de la energía total [6]. Uno de los motivos por los que se deben de limitar en la dieta es porque modifican la concentración de colesterol en las lipoproteínas plasmática, concretamente los AGS C12:0, C14:0, C16:0, incrementan el colesterol en las LDL. Además, una vez ingeridos y depositados en el tejido adiposo, los AGS se oxidan más lentamente que los AGI y por tanto permanecen más tiempo en el organismo [6]. Existe una evidencia clara de que se deben sustituir los AGS (C12:0-C16:0) por AGPI, de esa manera, se consigue disminuir la concentración de colesterol de las LDL y la relación colesterol total/colesterol HDL y, por tanto, el riesgo de enfermedad coronaria. También podrían sustituirse por AGMI, pero el efecto sería menor en comparación a los AGPI.

Tabla 3. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos saturados.

Nombre común	Abreviatura	Fuentes principales
Caproico	C6:0	Grasas lácteas
Caprílico	C8:0	Grasas lácteas, aceite de coco y de palma
Cáprico	C10:0	Grasas lácteas, aceite de coco y de palma
Láurico	C12:0	Aceite de coco y de palma
Mirístico	C14:0	Grasas lácteas, aceite de coco y de palma
Palmítico	C16:0	En la mayoría de grasas y aceites
Esteárico	C18:0	En la mayoría de grasas y aceites
Aráquico	C20:0	Aceite de cacahuete
Behénico	C22:0	Aceite de cacahuete
Lignocérico	C24:0	Aceite de cacahuete

Tabla adaptada de la FAO [6].

1.4.2. Ácidos grasos monoinsaturados

Existen muchos tipos de AGMI en la naturaleza, pero el más abundante en la dieta occidental es el ácido oleico. Está presente en cantidades considerables en alimentos tanto de origen animal como vegetal, aunque predomina en el aceite de oliva, aceite de canola y algunos frutos secos (Tabla 4). No obstante, existen algunas poblaciones donde el AGMI mayoritario es el ácido erúcico debido a un elevado consumo de aceite de mostaza o colza.

Tabla 4. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos monoinsaturados.

Nombre común	Abreviatura	Fuentes principales
Palmitoleico	C16:1n-7	Aceites de origen marino, aceite de nuez de macadamia, la mayoría de aceites animales y vegetales
Vaccénico	C18:1n-7	La mayoría de aceites vegetales
Oleico	C18:1n-9	Todos los aceites y grasas, especialmente el aceite de oliva, de canola, de girasol y cártamos ricos en ácido oleico. Almendras, cacahuete, avellanas, semillas de sésamo, piñones, nueces de macadamia
Gadoleico	C20:1n-9	Aceites de origen marino
Erúcico	C22:1n-9	Aceite de semilla de mostaza, aceite de colza
Nervónico	C24:1n-9	Aceites de origen marino

Tabla adaptada de la FAO [6] y Kathleen, L. & Raymond, J.L. [17].

Como cabe esperar, el consumo del AGMI puede variar en función del tipo de dieta. La dieta mediterránea se caracteriza por aportar efectos beneficiosos para la salud y proteger frente a enfermedades cardiovasculares, inflamación y cáncer [61]. Estos atributos se deben, en parte, a un consumo elevado de AGMI que provienen del aceite de oliva (compuesto por un 55-83% de ácido oleico, 3-21% de otros AG y 2% de polifenoles [62]). No obstante, en una dieta como la Norte Americana, el aporte mayoritario de AGMI proviene de una ingesta de alimentos que a su vez poseen un alto contenido en AGS y AG *trans* por lo que, en este caso, se debería reducir el consumo para evitar efectos perjudiciales para la salud [16]. En el caso de los AGMI, la ingesta

recomendada se calcula por la diferencia entre: $AGMI = \text{Ingesta total de grasas (\%)} - \text{AGS (\%)} - \text{AGPI (\%)} - \text{AG trans (\%)}$. Por tanto, puede resultar muy variable en función del tipo de grasas presentes en la dieta [6].

1.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Los AGPI con mayor interés nutricional son los AG de la serie n-3 y n-6. Como se ha comentado con anterioridad, los precursores de estas series, el ALA y LA respectivamente, se consideran AGE para el organismo humano al no disponer de la capacidad para sintetizarlos de manera endógena y, por tanto, su inclusión en la dieta diaria es crucial. Sin una ingesta adecuada de ambos, la formación de los derivados de la serie n-3 y n-6, especialmente el AA, EPA y DHA, se vería afectada y repercutiría sobre las funciones biológicas que ejercen en nuestras células (ver el apartado anterior: **1.3. Funciones generales en el organismo**).

El LA y ALA se encuentran en prácticamente todas las grasas de la dieta y presentan mayores proporciones en los aceites vegetales, algunas semillas y frutos secos. No obstante, la disponibilidad del ALA es menor en los alimentos que la del LA. El AA se encuentra en carnes, huevos, pescado, algas y otras plantas marinas. El EPA y el DHA son los lípidos mayoritarios en los animales marinos. De hecho, la caballa, el salmón, la sardina, el arenque y el eperlano destacan por ser fuentes muy ricas en EPA y DHA. Los aceites de pescado son considerados un buen suplemento alimenticio rico en EPA y DHA [6,63] (**Tabla 5**).

Tabla 5. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos poliinsaturados.

Serie	Nombre común	Abreviatura	Fuentes principales
n-6	Linoleico (LA)	C18:2n-6	La mayoría de aceites vegetales (aceite de girasol, maíz, cártamo, germen de trigo, pepita de uva y cacahuete), nueces pecanas, avellanas, semillas de cáñamo
	γ-Linolénico (GLA)	C18:3n-6	Aceites de semillas de onagra, borraja y grosella negra
	Dihomo- γ-linolénico (DGLA)	C20:3n-6	En tejidos animales (cantidades muy reducidas)
	Araquidónico (AA)	C20:4n-6	Grasas animales (mantecas), hígado, lípidos del huevo, carnes
	Docosapentaenoico (DPA)	C22:5n-6	En tejidos animales (cantidades muy reducidas)
n-3	α-Linolénico (ALA)	C18:3n-3	Aceites de lino, perilla, canola y soja. Nueces, semillas de chía y linaza. Algas
	Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n-3	Pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano, caballa y peces de aleta). Cangrejo, gambas y ostras
	Docosahexaenoico (DHA)	C22:6n-3	Pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano, caballa y peces de aleta). Cangrejo, gambas y ostras

Tabla adaptada de la FAO [6] y Kathleen, L. & Raymond, J.L. [17].

Con el fin de prevenir los síntomas derivados de una deficiencia de AGE, se estima que la ingesta mínima diaria debe ser 2-2,5% y 0,5-1,0% de la energía total para el LA y ALA, respectivamente [1,6]. Con respecto a los AGPI totales (conjunto de AG n-6 y n-3), el intervalo recomendable es 6-11% de la energía total evitando así problemas derivados del déficit o exceso de estos [6].

Como se ha mencionado en apartados anteriores, hay que tener en cuenta la ratio n-6/n-3 como herramienta para determinar si existe un desequilibrio nutricional entre AGPI n-6 y n-3 en la dieta. A modo de recordatorio, la ratio n-6/n-3 debe mantenerse en torno 5:1-10:1 (como máximo) para conseguir efectos beneficios para la salud [4,21]. No obstante, otros autores estiman que debe estar comprendida entre 1:1 a 4:1 para reducir considerablemente el riesgo de determinadas enfermedades cardiovascular, inflamatorias, e inmunitarias [22–24]. Según la Fundación Española de la Nutrición (www.fen.org.es), la ratio en España se sitúa en 15:1-16:1 y se considera que existe una tendencia a un estado proinflamatorio. Este desequilibrio se debe a los cambios que ha ido sufriendo la dieta Mediterránea con el paso del tiempo.

1.4.3.1. Ácidos grasos omega-3

Gracias al conocimiento actual sobre los derivados n-3, se ha estimado que la ingesta mínima diaria de EPA+DHA debe ser 0,2-0,3% de la energía total o 0,250-0,50 gr/día para evitar signos o síntomas por déficit [1,6,64]. En las últimas décadas, se han publicado numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sobre la suplementación dietética de omega-3 (EPA+DHA) y sus efectos beneficios a nivel del sistema cardiovascular. El Instituto Nacional de Salud Estadounidense (NIH, *USA National Institutes of Health*) [65] destaca los siguientes trabajos:

- ✓ En 2019, se publicó un metaanálisis de 13 ensayos clínicos con un total de 127477 participantes donde se administró una dosis de 0,376– 4 gr/día de EPA+DHA durante 5 años. Se concluyó que la suplementación con estos omega-3 redujo el riesgo de infarto de miocardio, muerte por enfermedad coronaria y muerte por enfermedad cardiovascular y, los efectos parecían estar relacionados con la dosis [66].
- ✓ En 2020, una revisión sistemática de 86 ensayos clínicos publicados entre 1968 y 2019 descubrió que la ingesta de 0,5 g/día hasta 5 g/día de omega-3 entre 12-88 meses en un total de 162.796 participantes redujo los niveles de TAG en suero en aproximadamente un 15% y disminuyó ligeramente las tasas de mortalidad cardiovascular y enfermedad coronaria [67].
- ✓ La Asociación Estadounidense del Corazón (AHA, *American Heart Association*) concluyó que la prescripción de 4 gr/día de omega-3 redujo los niveles de TAG cuando estos se utilizaban solos o como complemento de otros medicamentos hipolipemiantes [68].

En base a estos resultados, las últimas guías alimentarias (*Dietary Guidelines for Americans, U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services* [64], *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* [69] y la FAO [6]) concluyen que el consumo diario de AGPI omega-3 como parte de una dieta equilibrada se asocia a una disminución de los niveles de TAG y a un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y, por tanto, se establece un intervalo recomendable de 0,250-2,0 gr/día (EPA+DHA) o 2% de la energía total en adultos. Se considera que a partir de 1,0-2,0 gr/día se observan efectos beneficiosos para la salud. Esta ingesta diaria se debe aportar ya sea a través de la dieta, mediante la ingesta de alimentos enriquecidos o directamente con suplementos nutricionales. No obstante, la evidencia científica

del efecto protector de los suplementos de omega-3 es más sólida para las personas con cardiopatía coronaria existente que para los individuos sanos.

Para llegar al objetivo diario de EPA+DHA, la agencia española AESAN [59] y la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) [70] recomiendan el consumo de al menos 2-4 raciones semanales de pescado y derivados (siendo 1-2 raciones de pescado azul). Si comparamos nuestras recomendaciones con el resto de países de la Unión Europea, en el caso de los países Nórdicos (como Finlandia, Noruega o Suecia) se recomienda consumir más de 2-3 raciones/semana o que dichas raciones sean abundantes. No obstante, en el Reino Unido o Francia, se recomienda el consumo de 2 raciones/semana (1 de ellas de pescado azul) mientras que en Alemania la ingesta recomendada es de 1-2 raciones/semana [59].

1.4.3.2. Ácidos grasos omega-6

En cuanto a los AGPI omega-6, hay pocos estudios publicados que establezcan la ingesta diaria de LA. No obstante, la FAO y otros autores han estimado que la ingesta mínima adecuada de LA debe ser de 2-3% de la energía total [6,34]. Teniendo en cuenta que la ingesta máxima diaria de AGPI totales y de AGPI omega-3 es de 11% y 2% de la energía total respectivamente, el intervalo aceptable para la ingesta de AG omega-6 (LA) será de 2-9%. El valor más bajo corresponde a la prevención de los signos relacionados con el déficit de AGPI omega-6 (problemas cutáneos principalmente), mientras que el valor más alto forma parte de una dieta saludable. Una ingesta adecuada de omega-6 permite remplazar parcialmente los AGS en plasma y ayuda a disminuir las concentraciones de colesterol total y colesterol de las LDL y, por tanto, del riesgo de enfermedad coronaria [34].

1.4.4. Ácidos grasos trans

Los AG *trans* pueden obtenerse en la industria alimentaria por procesos de hidrogenación parcial de algunos aceites vegetales o de pescado generando isómeros *trans*. Este proceso produce una saturación parcial de los enlaces en la cadena hidrocarbonada de los AG confiriéndoles una consistencia semisólida favoreciendo su aplicación en la fabricación de determinados productos alimentarios: margarinas y mantequillas comerciales, bollería, salsas comerciales, alimentos fritos, productos ultraprocesados con grasas hidrogenadas, etc. [17].

Estos AG *trans* incrementan los factores de riesgos y accidentes cardiovasculares [6], por lo que, se debe limitar su ingesta a menos de 1% de la energía total. Sin embargo, existen AG *trans* naturales presentes en carnes, leche y productos lácteos de animales rumiantes que se generan a nivel intestinal por la acción de la microbiota de estos animales [1]. Concretamente, se conocen el ácido linoleico conjugado (CLA, del inglés *Conjugated Linoleic Acid*) e isómeros de este (como, el *cis-9,trans-11 CLA*), su aporte en la dieta humana es relativamente bajo pero sus efectos sobre la salud no son nocivos [5].

En resumen, las recomendaciones dietéticas en cuanto al consumo de ácidos grasos serían las siguientes:

- ↓ AGS: se recomienda que la ingesta debe estar por debajo del 10% de la energía total diaria.
- ↑ AGMI: se debe sustituir en la medida de la posible la ingesta de AGS por AGMI.
- ↑ AGPI: ingesta entre el 6-11% de la energía total diaria. Asegurar la ingesta mínima de AGE: 2-2,5% y 0,5-1,0% de la energía total para el LA y ALA, respectivamente.
- ↓ la ratio n-6/n-3 para evitar un desequilibrio nutricional entre AGPI.
- ↑ AGPI omega-3: se debe alcanzar la cantidad mínima diaria de 0,25 gr de EPA+DHA para evitar problemas por déficit de estos AGPI.
- Evitar el consumo de AG *trans* de origen industrial.

Si se mantiene una dieta equilibrada con estas indicaciones se puede conseguir disminuir el colesterol presente en las LDL y la ratio colesterol total/colesterol HDL y, por tanto, el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además, se disminuirá el riesgo de enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes (se mejora la sensibilidad a la insulina), el síndrome metabólico, la obesidad, el hígado graso, dermatitis o artritis y, enfermedades neurológicas.

1.5. Ácidos grasos de cadena corta

En términos químicos, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas formadas por 1 a 6 carbonos y entre los que destaca el ácido acético (C2: 0), el ácido propiónico (C3: 0), el ácido butírico, (C4:0), el ácido valérico (C5: 0) y el ácido caproico (C6: 0). Los AGCC pueden estar presentes en alimentos de origen animal pero se obtienen principalmente a través del metabolismo de las bacterias presentes en la superficie de la pared intestinal [71], las cuales llevan a cabo la fermentación de los hidratos de carbono procedentes de la dieta, concretamente los almidones resistentes y fibra (ver **Tabla 6** y **Figura 10**) [72].

Tabla 6. Fuentes alimentarias principales de obtención de ácidos grasos de cadena corta detectados en nuestra cohorte de mujeres.

Nombre común	Abreviatura	Fuentes principales
Acético	C2:0	Fermentación de los HC producida por la MI
Propiónico	C3:0	Fermentación de los HC producida por la MI
Butírico	C4:0	Grasas lácteas y fermentación de la fibra producida por la MI
Isobutírico	C4:0	Aminoácidos de la degradación de las proteínas dietéticas

Abreviaturas: HC, hidratos de carbono; MI, microbiota intestinal. Tabla adaptada de la FAO [6].

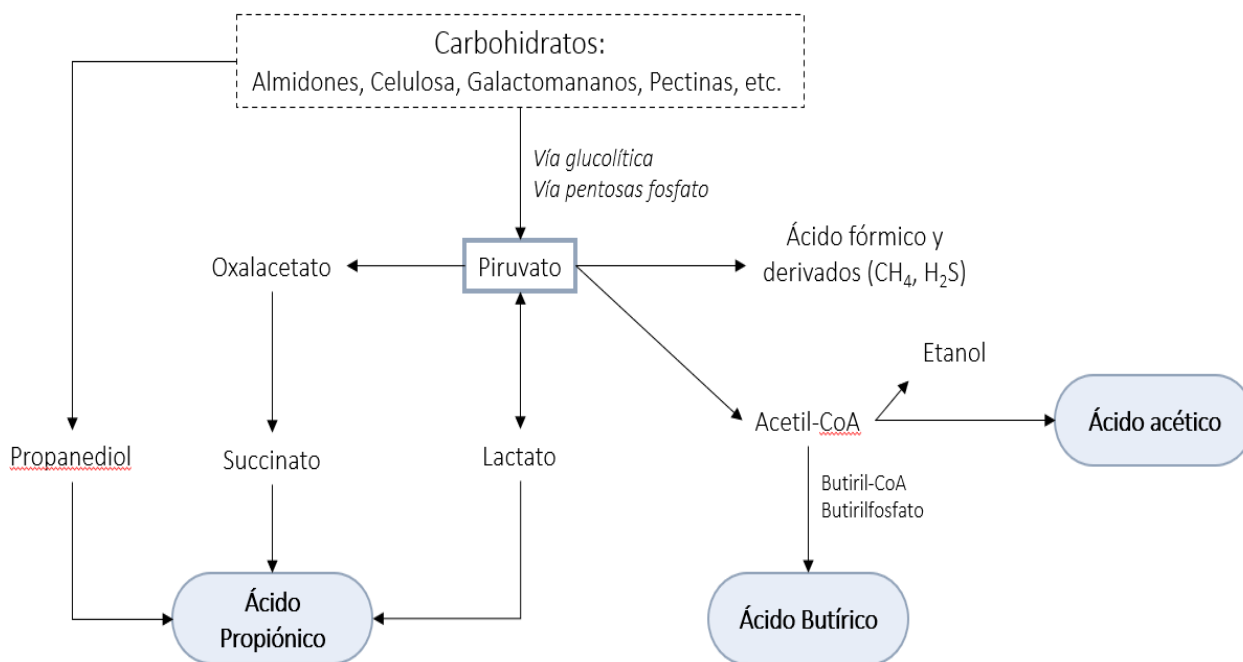


Figura 10. Biosíntesis de los ácidos grasos de cadena corta por acción de la microbiota intestinal. Figura adaptada de Ríos-Covián, et al. [73] e Hijova, E. & Chmelarova, A. [74].

El ácido acético, el ácido propiónico y el butírico son los más abundantes en el organismo y representan el 90-95% de los AGCC presentes en el colón en una proporción aproximada de 60:25:15, respectivamente [72,75]. En menor medida, están el isobutirato, isovalerato y 2-metilbutirato, conocidos como AGCC ramificados (AGCCR), que constituyen el 5% de la producción total de AGCC y provienen de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina obtenidos de la descomposición de las proteínas dietéticas [73]. La cantidad de AGCC producidos por la microbiota intestinal va a depender del tipo y predominio de la especie bacteriana en la microflora colónica, la fuente de sustrato utilizado por las bacterias y el tiempo de tránsito intestinal de los alimentos [72,76,77].

Los AGCC proporcionan aproximadamente el 10% de las necesidades calóricas diarias [75,78] en los seres humanos y, en cuanto a su metabolismo, la mayor parte de los AGCC (>90%) se absorbe fácilmente a través de la mucosa intestinal pasando al torrente sanguíneo y el 5% se excreta con las heces [72]. En general, el butirato es la principal fuente de energía para los colonocitos, mientras que el propionato es absorbido en gran medida por el hígado y el acetato entra en la circulación periférica para ser metabolizado por los tejidos periféricos [72].

En los últimos años, los AGCC han surgido como importantes moléculas de señalización en la regulación de la homeostasis metabólica. Se ha demostrado que los AGCC activan los receptores de la superficie celular conocidos como receptores de ácidos grasos libres (FFAR, del inglés, *Free Fatty Acid Receptors*), específicamente FFAR2 (o GPR43) y FFAR3 (o GPR41). Los FFAR pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPR) presentes en las membranas celulares y se caracterizan por tener siete dominios transmembrana (con un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular) [79]. La afinidad por estos receptores varía según el tipo de AGCC. En humanos se conoce que la afinidad por el receptor

FFAR2 es similar para el ácido acético y propiónico mientras que el ácido butírico tiene menor afinidad. No obstante, sucede lo contrario para el receptor FFAR3 donde la afinidad es la siguiente: ácido butírico = ácido propiónico > ácido acético [80]. Estos receptores están presentes en multitud de tejidos como en el intestino, tejido adiposo, hígado, páncreas, músculo, pulmones, corazón, médula ósea, cerebro, neuronas simpáticas periféricas y células del sistema inmunitario [78,81].

Los AGCC también actúan como inhibidores de la histona desacetilasa nuclear de clase I (especialmente, HDAC1 y HDAC3), cuyo efecto es el de regular las vías de señalización en la respuesta inflamatoria [82]. Concretamente, el ácido butírico ejerce mayor poder inhibitorio en la expresión de los genes HDAC y, con ello, regula la proliferación celular e induce la diferenciación o la apoptosis de las células, lo que le otorga propiedades antitumorales a nivel del intestino [83].

Dentro de las numerosas funciones biológicas que se les atribuyen, se ha visto que los AGCC actúan principalmente a nivel intestinal (mayoritariamente el ácido butírico [75]) promoviendo la integridad de la barrera intestinal, mediante la producción de la mucosidad, y, modulando la respuesta inmunitaria-antiinflamatoria que contribuye a disminuir el riesgo de desarrollar trastornos gastrointestinales como el cáncer colorrectal [78]. En el caso del ácido butírico, incluso se estudia su administración exógena como terapia para el cáncer de colon puesto que reduce la inflamación de la mucosa e induce la apoptosis de las células cancerosas [84]. Además, también se les han atribuido otros efectos biológicos importantes sobre el eje intestino-cerebro [85]; la prevención de enfermedades cardiovasculares [81,86]; la regulación de la función mitocondrial en el hígado; el metabolismo de la glucosa y tejido adiposo [87]. Concretamente el acetato/butirato aumentan la lipogénesis mientras que el propionato aumenta la gluconeogénesis e inhibe la lipogénesis. Por ello, se han relacionado con enfermedades metabólicas como la obesidad y la DM2 [73,88]); modulación del sistema inmunitario; control del apetito y el sueño [73,78].

- **Ácidos grasos de cadena corta y embarazo**

La gestación está marcada por cambios inflamatorios e inmunitarios que alteran la función intestinal materna y la composición bacteriana a medida que avanza el embarazo. En un contexto fisiológico, estos cambios en la microbiota intestinal materna contribuyen a disminuir las complicaciones obstétricas y favorecer el correcto desarrollo del feto [89,90]. Esta función de la microbiota, se debe a su mediación en la síntesis de AGCC, los cuales influyen considerablemente en la función inmunitaria, la respuesta inflamatoria y el metabolismo de los carbohidratos y lípidos durante el embarazo [72,91]. Cuando el estado de salud de la embarazada se ve comprometido, se produce una modificación de la microbiota que puede conllevar a cambios importantes en el perfil de AGCC a nivel intestinal y sistémico. Por ejemplo, en las embarazadas con obesidad o diabetes mellitus gestacional, las concentraciones de ácido propiónico aumentan en respuesta a las adaptaciones metabólicas que requiere el organismo, mientras que, se han visto disminuidas en el curso de una gestacional normal [90]. Otro claro ejemplo se produce en gestantes que presentan un estado hipertensivo y/o riesgo de sufrir preeclampsia, ante esta situación se generan menores concentraciones de ácido butírico por una disminución de las bacterias productoras de este AGCC. No obstante, en una situación fisiológica, se produce un aumento de las concentraciones de ácido butírico durante el

embarazo para modular cierto grado de inflamación necesario para el transcurso correcto de la gestación y el momento del parto [72,92,93].

2. ÁCIDOS GRASOS DURANTE LA GESTACIÓN

El embarazo implica numerosos cambios fisiológicos en la mujer e impone necesidades nutricionales especiales tanto para ella como para el feto [94–96]. En lo relacionado a los AG, como ya se ha mencionado con anterioridad, estos poseen multitud de funciones biológicas vitales para el organismo como fuente de energía, estructura de las membranas plasmáticas o precursores de los eicosanoides, los cuales ejercen un importante efecto sobre la gestación y el aparato reproductor femenino [56]. En este sentido, el estado nutricional de los AG (especialmente AGE y AGPI) en la madre, no sólo jugará un papel importante para ella sino también para el correcto desarrollo de su descendencia [97].

2.1. Función y efecto de los ácidos grasos en la madre y su descendencia

2.1.1. Ácidos grasos y embarazo

2.1.1.1. Etapa gestacional

En las primeras etapas del desarrollo embrionario, el blastocisto (o embrión de 5/6 días en desarrollo tras la fecundación) está formado por una masa celular interna de la que se origina el embrión y de una capa periférica de células que formará la placenta. Esta capa externa denominada trofoblasto, protege y adhiere al blastocisto a la pared del útero. Este comportamiento invasivo del trofoblasto desencadena la remodelación de las arterias espirales uterinas para aumentar el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno al feto y garantizar su viabilidad [98,99]. Este proceso de angiogénesis es un factor crítico para el correcto desarrollo placentario y para evitar patologías derivadas de un aporte sanguíneo insuficiente como la preeclampsia, retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) o parto pretérmino [100]. Todas ellas, son complicaciones importantes y frecuentes del embarazo con consecuencias perjudiciales tanto para la salud fetal y materna.

La angiogénesis es un proceso complejo mediado por la acción de numerosos factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) o el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF, del inglés *Basic Fibroblast Growth Factor*). La acción proangiogénica de la prostaglandina PGE₂ (sintetizada a partir del AA), aumenta la expresión de estos factores implicados en la angiogénesis placentaria [99,101]. Además, se ha visto que el DHA, posee una acción similar a nivel del trofoblasto donde activa la producción de VEGF y otros factores, como el ANGPTL4 (del inglés, *Angiopoietin-Like Protein 4*), el FABP4 (del inglés, *Fatty Acid-Binding Protein 4*) y FABP3, favoreciendo la proliferación de las células endoteliales [97,99]. Tanto los eicosanoides (prostaglandinas)

derivados de los AGPI n-6 como el DHA ayudan al desarrollo del trofoblasto durante el primer trimestre del embarazo y, por tanto, al crecimiento adecuado de la placenta [99] (**Figura 11**).

En el transcurso normal de una gestación, por lo general, se produce un aumento progresivo de la resistencia a la insulina que alcanza su máximo en el tercer trimestre y que puede desencadenar una diabetes mellitus gestacional (DGM) [102]. El estado hiperglucémico de la gestante aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (preeclampsia) o metabólicas (obesidad, DM2 posparto, etc.) entre otras. Además, la exposición continuada de los tejidos fetales a un ambiente diabético se traduce en una extensa variedad de complicaciones perinatales y posnatales, como el aumento de abortos espontáneos, muerte fetal intraútero, anomalías congénitas, problemas en el neurodesarrollo fetal [103,104], RCIU, peso inadecuado al nacer o la macrosomía asociada a un riesgo elevado de obesidad y/o DM2 al nacer [102,105]. No obstante, existen un gran número de estudios sobre el efecto protector de los AGPI n-3 en mujeres con riesgo de desarrollar una DMG o que la estén padeciendo. Concretamente, el uso de los AGPI n-3, como el DHA, mejora la función metabólica materna y promueve un estado metabólico adecuado en el recién nacido que ayuda a disminuir el riesgo de desarrollar un síndrome metabólico a largo plazo. También aumenta la sensibilidad a la insulina durante el embarazo y ayuda a disminuir el estado inflamatorio que favorece la aparición de problemas cardiovasculares como la hipertensión o preeclampsia [106,107].

Además, en cuanto al desarrollo fetal, se ha observado que las gestantes que consumen AGPI n-3 presentan: 1) mayor prolongación de la gestación debido a que los AGPI n-3 incrementen la formación de prostaciclina (PGI_3) con acción relajante de la musculatura lisa (retrasando el inicio del parto) y disminuyen la síntesis de prostaglandinas PGE_2 y PGF_2 que potencian las contracciones uterinas [108]; 2) un crecimiento intrauterino fetal adecuado según las semanas de embarazo (longitud y peso normales en el feto) y un menor riesgo de tener un embarazo pretérmino o incluso una muerte perinatal [104,109]. Algunos autores, incluso, han concluido que una suplementación con AGPI n-3 desde la semana 30 de gestación se ha relacionado con una reducción del riesgo de prematuridad hasta del 40-50%, un aumento de la duración de la gestación en 5 días y un peso de los recién nacidos 100 g superior con respecto a aquellos nacidos de madres que no tomaron suplementos [108,110].

A nivel del sistema inmunitario, el DHA y sus metabolitos mejoran la inmunocompetencia materno-fetal al regular el estrés oxidativo, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el equilibrio pro-antiinflamatorio en la interfaz materno-fetal [37,97,111].

2.1.1.2. Etapa posparto

Relacionado con el periodo posparto, algunos estudios indican que la deficiencia de DHA durante el embarazo se asocia a síntomas depresivos. No obstante, existe una gran controversia sobre este efecto: un metaanálisis reciente que incluyó los resultados de dos ensayos controlados aleatorizados (RCT, del inglés, *Randomized Controlled Trial*) con 2431 mujeres mostró una evidencia baja en la relación inversa entre la suplementación con DHA y la depresión posparto [109]. Por el contrario, otros autores asocian el consumo de DHA con efectos beneficiosos sobre el bienestar psicológico de la gestante, concretamente, sobre la disminución del riesgo de depresión [112] y síntomas de ansiedad [113]. Algunos estudios y guías terapéutica en psicofarmacología, recomiendan incluso la utilización de AGPI n-3 para el tratamiento de las depresiones en el embarazo, cuando la sintomatología es moderada-grave, pero siempre como

coadyuvante de los fármacos antidepresivos indicados [114–117]. Los omega-3 son un tratamiento muy seguro y generalmente bien tolerado sin efectos adversos a dosis terapéuticas.

En cuanto a las dosis diarias recomendadas, Wojcicki, J.M. & Heyman, M.B. [118] indicaron que para obtener beneficios se debería iniciar una suplementación temprana en el embarazo y utilizar dosis de alrededor 2g/día de DHA + EPA. El metaanálisis de Sublette *et al.* [116], ha concluido que los suplementos que contienen al menos un 60% de EPA del total EPA+DHA, en un rango de dosis de 200 a 2.200 mg/día de EPA+DHA, presentan eficacia antidepresiva. Hallahan *et al.* [117] también concluyeron que los suplementos de AGPI n-3 con más de 50% de EPA, tenían efectos beneficiosos sobre los síntomas depresivos con respecto a los suplementos con más de un 5 % de DHA. El hecho de que el EPA tenga un mayor efecto antidepresivo se atribuye a que tiene un mayor poder antiinflamatorio en comparación al DHA y esto se debe a que, por un lado, el EPA es el ligando natural del receptor nuclear PPAR γ que inhibe las cascadas proinflamatorias neuronales implicadas en la fisiopatología de las respuestas desreguladas al estrés y la depresión; y, por otro lado, el EPA es capaz de incorporarse más rápidamente a los FL de la membrana de las células mononucleares (monocitos y linfocitos) circulantes, y disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias [117].

2.1.2. Ácidos grasos y descendencia

Como componentes estructurales de las neuronas, los AG están presentes en la membrana sináptica y un cambio en su composición puede afectar a las funciones neuronales a nivel de los receptores de membrana, canales iónicos, transmisión de señales intra e intercelulares mediadas por segundos mensajeros derivados de los propios AG, etc. Además, el tejido nervioso contiene la segunda mayor concentración de AG después del tejido adiposo, y los niveles de AGPI son especialmente altos en la retina y la corteza cerebral. Debemos resaltar que la mayoría de los AGPI, especialmente el DHA y AA, se acumulan en el proceso de la sinaptogénesis que tiene lugar durante el desarrollo cerebral en un período de intensa división celular [119] y, por tanto, tienen un papel fundamental en el desarrollo cognitivo tanto a nivel perinatal como posnatal [37,120,121]. Se sabe que esta acumulación comienza al principio del primer trimestre y continúa hasta los 2 años de edad [119,122]. Tanto el AA como el DHA tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la fluidez de la membrana de la sinapsis, la propagación del impulso, la transmisión sináptica y su función como factores de transcripción para la expresión de genes durante el desarrollo del cerebro [37,97]. Ambos AG presentan acciones neuroprotectoras y son necesarios para reparar las lesiones cerebrales, la regulación inflamatoria y vascular, y, el desarrollo y madurez del cerebro en los recién nacidos, especialmente aquellos bebés prematuros (**Figura 11**).

Además de ser un componente estructural en el tejido neuronal, el DHA se encuentra en gran cantidad en las células de la retina (representa hasta el 80% de todos los AGPI) y su incorporación en las membranas fotorreceptoras sigue aproximadamente la misma línea en el tiempo que a nivel cerebral [123]. Un correcto aporte de DHA durante el embarazo ayuda en el desarrollo visual y mejora significativamente la adquisición de la agudeza visual en los recién nacidos debido a su efecto sobre la activación de la rodopsina y el desarrollo de los conos y bastones [124].

A nivel inmunológico, se ha descrito que el aporte adecuado de AGPI n-3 durante el embarazo y la lactancia, disminuye la aparición de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico y respuesta inflamatoria en el recién nacido y en edad infantil. Concretamente, en la revisión sistemática de Miles et al., se concluye una menor sensibilización al huevo en los lactantes, una reducción del riesgo y la gravedad de dermatitis atópica en el primer año de vida, y una reducción de las sibilancias y el asma persistentes entre los 3 y los 5 años [125].

A nivel metabólico, existen evidencias de que la exposición excesiva de AGPI n-6 antes del nacimiento (o incluso en las primeras etapas de la infancia) puede promover la formación de células adiposas y predisponer a una acumulación de grasa corporal a edades tempranas. Estos cambios pueden conducir a adaptaciones duraderas y aumentar el riesgo de síndrome metabólico en el curso posterior de la vida del recién nacido. Este fenómeno se denomina programación metabólica [126]. Relacionado con este hecho, el déficit de AGPI n-3 con un elevado aporte de LA durante la gestación, juega un papel importante en el desarrollo de las rutas de señalización del apetito, causando hiperfagia y exceso de peso corporal [126,127].

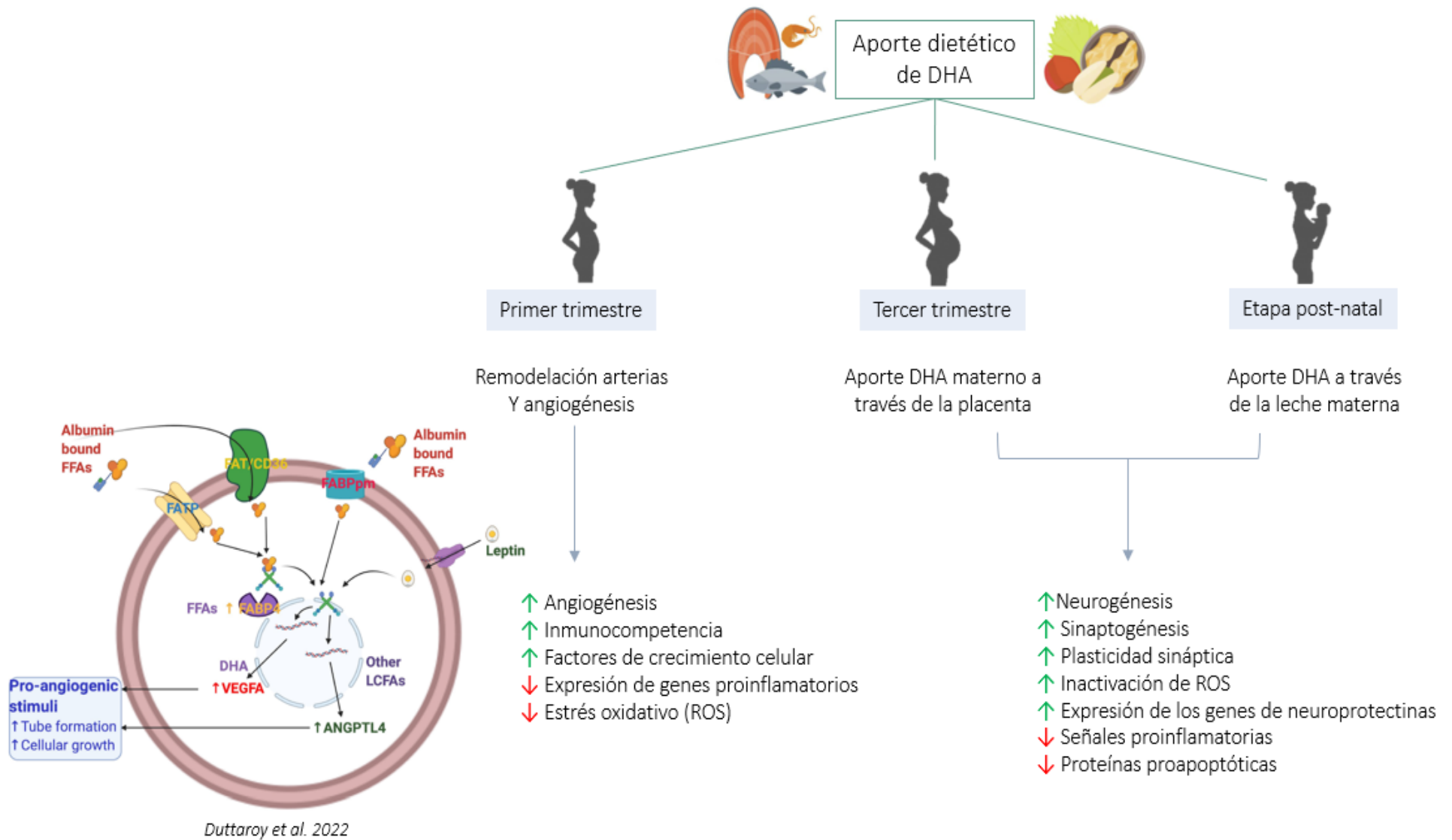


Figura 11. Efectos biológicos del DHA en el embarazo y periodo posnatal. Figura adaptada de Basak, S. & Mallick, R. [121].

Introducción

Existen numerosos estudios sobre la relación de la suplementación de AGPI n-3 durante el embarazo y los efectos a corto y largo plazo en la mujer gestante y en su descendencia. No obstante, sigue habiendo controversia al respecto y algunos estudios no comparten estos resultados [128–130] o no demuestran que hayan beneficios a largo plazo [131–133]. En la **Tabla 7** se recopilan algunos de estos trabajos con sus principales resultados.

Tabla 7. Suplementación de DHA durante el embarazo y en recién nacidos pretérmino y sus efectos posnatales a largo plazo.

Sujeto, tamaño muestral y ubicación	Dosis y duración tratamiento	Resultados principales	Referencias
<i>Ensayos controlados aleatorizados (RCT) en mujeres gestantes</i>			
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 19927 (internacional).	Recopila 70 RCTs donde compara la suplementación con AGPI n-3 y un grupo control placebo o sin ingesta de AGPI n-3.	↓ Riesgo parto pretérmino (E). ↓ Riesgo muerte perinatal (M). ↓ Riesgo RCIU (M). ↓ Bajo peso al nacer (E). ↑ Prolongación gestación (M). ↓ Riesgo de preeclampsia y depresión posnatal (B).	Middleton <i>et al.</i> , 2018 [109].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 350, EE.UU.	600 mg DHA/día; desde antes de la semana 20 hasta el parto.	↑ Duración del embarazo. ↑ Tamaño al nacer.	Carlson <i>et al.</i> , 2013 [134].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 301, EE.UU.	600 mg DHA/día; desde la semana 14 hasta el parto.	↑ Desarrollo cognitivo y atención visual desde los 10 meses hasta los 6 años.	Colombo <i>et al.</i> , 2019 [135].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 30, EE.UU.	214 mg DHA/día; desde la semana 24 hasta el parto.	↑ La agudeza visual en niños de 4 meses.	Judge <i>et al.</i> , 2007 [136].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 271, Canadá.	400 mg DHA/día; desde la semana 16 hasta el parto.	↑ El DHA materno en correlación con el lenguaje y la memoria a corto plazo en los niños de > 5 años.	Mulder <i>et al.</i> , 2018 [137].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 1094, México.	400 mg DHA/día; desde la semana 18–22 hasta el parto.	↑ Talla y perímetro cefálico al nacer. ↑ Mejora de la atención de los niños de 5 años en edad preescolar.	Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2010 [138].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 5272 (internacional).	Recopila 11 RCTs donde compara la suplementación con AGPI n-3 y un grupo sin ingesta de AGPI n-3.	Los resultados no apoyan ni refutan de forma concluyente que los suplementos con AGPI n-3 mejoren el desarrollo cognitivo o visual del RN.	Gould <i>et al.</i> , 2013 [129].

Abreviaturas: (E), evidencia elevada; (M), evidencia moderada; (B), evidencia baja; RCIU, retraso del crecimiento intrauterino; RN, recién nacido. Nota: “↑” implica aumento; “↓” implica disminución.

Tabla 7. Cont.

Sujeto, tamaño muestral y ubicación	Dosis y duración tratamiento	Resultados principales	Referencias
Ensayos controlados aleatorizados (RCT) en mujeres gestantes			
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 2399, Australia.	800 mg DHA/día; desde <21 semana hasta el parto.	No se observó efecto a nivel del desarrollo cognitivo/del lenguaje en niños (<i>n</i> = 726) de 1,5 años.	Makrides <i>et al.</i> , 2010 [130].
		No se observó efecto a nivel del desarrollo cognitivo/del lenguaje en los niños (<i>n</i> = 726) a los 4 y 7 años.	Gawlik <i>et al.</i> , 2020 [132].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 98, Australia.	2200 mg DHA/día, 1100 mg EPA/día; desde la semana 20 hasta el parto.	↑ La coordinación y la agudeza visual en niños de 2,5 años.	Dunstan <i>et al.</i> , 2008 [133].
		No se observó efecto en la cognición, lenguaje o motricidad en los niños de 12 años de edad (<i>n</i> = 25).	Meldrum <i>et al.</i> , 2015 [131].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 315, España.	~400 mg DHA/día y ~400 mg EPA/día; desde la semana 28 hasta el cuarto mes de lactancia.	↑ el perfil plasmático de AGPI n-3 en el RN/madres, pero no se observaron efectos en el desarrollo visual, cognitivo/psicomotor de los RN.	Hurtado <i>et al.</i> , 2015 [128].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 315, España.	500 mg DHA/día y 150 mg EPA/día; desde antes de la semana 20 hasta el parto.	↑ Desarrollo cognitivo a los 5,5 años en niños.	Escolano <i>et al.</i> , 2011 [139].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 300, Reino Unido (UK).	300 mg DHA/día, 42 mg EPA/día y 8,4 mg AA/día; desde la semana 12 hasta el tercer trimestre.	Se realizó una RMN en los niños (<i>n</i> = 86) al nacer y se observó una correlación con el DHA y el ↑ del volumen cerebral.	Ogundipe <i>et al.</i> , 2018 [140].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 143, Noruega.	10 ml de aceite de hígado de bacalao al día que contenían 1183 mg DHA y 803 mg EPA; desde la semana 18 hasta 3 meses posparto.	↑ La puntuación en los test de evaluación del desarrollo neurológico en los niños a los 4 y 7 años de edad cuyas madres tomaron AGPI n-3. No hay efectos sobre el IMC a los 7 años de edad.	Helland <i>et al.</i> , 2003 [141] y 2008 [142].
Mujeres embarazadas, <i>n</i> = 150, Irán.	120 mg DHA/día, 180 mg EPA/día; desde la semana 20 hasta 1 mes posparto.	↑ El neurodesarrollo primario en los 4-6 meses de vida del niño.	Ostadrahimi <i>et al.</i> , 2018 [143].

Abreviaturas: (E), evidencia elevada; (M), evidencia moderada; (B), evidencia baja; IMC, índice de masa corporal; RMN, resonancia magnética nuclear; RN, recién nacido. Nota: “↑” implica aumento; “↓” implica disminución.

Tabla 7. Cont.

Sujeto, tamaño muestral y ubicación	Dosis y duración tratamiento	Resultados principales	Referencias
Ensayos controlados aleatorizados (RCT) en recién nacidos pretérmino			
RNP, n = 107, UK	Formula suplementada con 0,5% DHA/día desde el nacimiento hasta los 9 meses de vida.	↑ El coeficiente verbal e intelectual en niños a los 9 años.	Isaacs <i>et al.</i> , 2011 [144].
RNP, n = 361, EE.UU.	Aceite de algas con DHA (17 mg/100 kcal), aceite de hongos con AA (34 mg/100 mL); desde el nacimiento hasta los 4 meses.	↑ Crecimiento y desarrollo del bebé prematuro hasta las 118 semanas.	Clandinin <i>et al.</i> , 2005 [145].
RNP entre 24-34 semanas de edad, n = 90, EE.UU.	214 mg DHA/día; desde la semana 24 de embarazo hasta el parto.	↑ Nivel de DHA en los bebés prematuros en comparación al grupo placebo. Mejoró el déficit en los bebés prematuros.	Baack <i>et al.</i> , 2016 [146].
RNP entre 30–37 semanas de edad, con un peso al nacer > 2 kg, n = 27, Taiwán	Formula suplementada con 0,5% DHA/día y 0,1% de AA/día desde el nacimiento hasta los 6 meses de vida.	↑ Índice desarrollo mental entre los 6-12 meses de vida.	Fang <i>et al.</i> , 2005 [147].

Abreviaturas: RNP, recién nacido pretérmino/prematuro. Nota: “↑” implica aumento; “↓” implica disminución.

2.1.3. Transporte de los ácidos grasos a través de la placenta

Durante el embarazo hay una alta demanda de AG, especialmente AGPI n-3 y n-6. El feto puede sintetizar *de novo* algunos AGS y AGMI utilizando la glucosa como sustrato. No obstante, las enzimas desaturasas, D5D y D6D, responsables de la síntesis de los AGPI a partir de sus AGE precursores, son indetectables [148] o están expresadas en muy baja concentración en el tejido placentario [149]. Debido a esta condición, la síntesis placentaria de AGPI no es suficiente para cubrir los requerimientos adecuados del feto. Por consiguiente, alcanzar las demandas fetales dependerá de la ingesta materna y sus reservas en AGE y derivados, las cuales deberán ser transferidas desde el torrente sanguíneo materno a la circulación fetal a través de la placenta [97,148,150].

Como se ha mencionado con anterioridad, las concentraciones de AGPI son cruciales para el correcto desarrollo de la propia placenta y el feto. En condiciones normales, la placenta es capaz de transportar los AGPI fisiológicamente relevantes para el feto de manera preferente (transporte unidireccional desde la madre al feto) y oportuna (se adecua a las semanas de gestación y requerimientos fetales) [151,152]. El hecho de aumentar selectivamente los AGPI en la circulación fetal se conoce como proceso de *biomagnificación* y refleja el rol de la placenta en la transferencia selectiva de esos compuestos al feto [153]. En particular, durante el tercer trimestre de gestación, se produce un aumento en el transporte de AGPI n-3 desde el plasma materno al feto para garantizar el correcto crecimiento y desarrollo neurológico fetal [154].

Fisiológicamente, las concentraciones de AG totales en la circulación materna van variando a lo largo de la gestación. El primer trimestre se caracteriza por un almacenamiento de lípidos cuyo peso puede llegar a alcanzar el mismo peso que el recién nacido [151], mientras que, el tercer trimestre se caracteriza por un catabolismo de los lípidos para aumentar así la biodisponibilidad de los AG en la circulación materna y cubrir las necesidades fetales [41]. En general, las diferentes fracciones lipídicas, como las lipoproteínas, los TAG, los FL y los AGL, aumentan en la circulación materna. Concretamente, las concentraciones plasmáticas de FL aumentan aproximadamente el 65% durante el tercer trimestre en comparación con el primer trimestre del embarazo [151,152]. Se ha descrito que este mecanismo está mediado, en parte, por la acción de los estrógenos [154].

Esta hiperlipidemia gestacional permite aumentar la presencia de los AG en la placenta y garantizar su paso al feto. Los AG atraviesan la placenta en forma de AGL que pueden ser obtenidos de forma directa a través del torrente sanguíneo materno o bien a través de la hidrólisis de los TAG (por acción de la LPL placentaria) o fosfolípidos (por acción de la lipasa endotelial/epitelial, LE) en las microvellosidades o membranas de las células trofoblásticas. Una vez que los AGL han sido liberados por las lipasas, estos pueden atravesar la placenta mediante difusión pasiva o bien a través de proteínas transportadoras ubicadas, en la primera barrera o membrana de las microvellosidades y, en una segunda barrera o membranas endoteliales de los capilares fetales [150,151]. Una vez dentro del sincitiotrofoblasto, los AGL se unen a proteínas FABPs citosólicas que facilitan su movimiento intracelular y, que hacen que los AGL interactúen con los orgánulos celulares para su esterificación, β -oxidación o transferencia al feto [41,148]. Además del transporte de AG a través de la placenta, también existen proteínas transportadoras que median la transferencia de aminoácidos y glucosa (mediante los transportadores de la familia GLUT, del inglés, *Glucose Transporter*) presentes en ambas membranas del sincitiotrofoblasto (**Figura 12**).

En cuanto a las proteínas transportadoras de los AGL, las más importantes son la translocasa de AG (FAT/CD36, del inglés, *Fatty Acid Translocase*), las proteínas transportadoras de AG con actividad Acyl-CoA-sintetasa (FATP1-6, del inglés, *Fatty Acid Transport Protein*) y la proteína FABP de la membrana plasmática de la placenta (p-FABPpm). Además, el tejido placentario expresa receptores de lipoproteínas tipo LDL y HDL que permiten que éstas atraviesen las microvellosidades y, posteriormente, por acción de lipasas intracelulares como la fosfolipasa A₂, se liberen AGL hacia el feto (**Figura 12**). Una vez en el feto, los AGL pueden esterificarse de nuevo en forma de TAG y depositarse en el tejido adiposo fetal como almacenamiento. No obstante, en el momento que el feto necesite utilizarlos, podrá liberar los TAG por acción de las LPL a la circulación sanguínea [148].

Estudios *in vivo* han demostrado que los mecanismos de acción de estas proteínas en cuanto a la captación, el metabolismo y la transferencia unidireccional de AGL a través de la placenta, se deben a las diferentes afinidades que poseen por dichos AGL. Por ejemplo, la p-FABPpm muestra una mayor afinidad y capacidad de unión para el DHA > AA en comparación con el ALA, OA y LA [154–156]. Además del papel de estas proteínas en la transferencia de AG al feto, existen evidencias de que la propia placenta es capaz de modular su aporte en función de las demandas fetales que se ven aumentadas con el avance de la gestación [151]. Estudios realizados en el momento del parto, sugieren que la concentración de DHA y AA es del orden de 3-4 veces mayor

en el espacio sincitiotrofoblástico que en la circulación materna. Esto sugiere, que las lipasas placentarias aumentan al final de la gestación y que hidrolizan selectivamente determinados AG de los TAG, como el DHA o AA, con respecto a otros como el palmítico o el OA [41,150] para forzar su paso hacia el feto. También se observó una mayor concentración de DHA en cordón umbilical que en plasma materno [155] momentos antes del parto.

Los AGPI presentes en la placenta parece que actúan sobre ésta de una manera autocrina: por un lado, regulan su propio transporte placentario y, por otro, participan en las funciones biológicas de la placenta a través de la activación de varios factores de transcripción. Concretamente, los AGPI n-3 aumentan la expresión de los factores FATP1 y FATP4 que mejoran la captación de los AGPI a través de la placenta. Además, los AG activan otros factores de transcripción como los receptores PPAR o RXR (ver mecanismo en la **Figura 6**) que, a nivel placentario, juegan un papel muy importante en los mecanismos de regulación del metabolismo, desarrollo y proceso inflamatorio implicados en el crecimiento y vascularización de la placenta [150,154].

El transporte materno-fetal de los AGPI puede verse afectado por una función anormal de la placenta cuando se producen ciertas complicaciones en el embarazo, como la DMG, la preeclampsia o RCIU [41,157]. Algunos estudios, han detectado que los recién nacidos de madres diabéticas presentaban cierto retraso madurativo en el SNC en comparación con los hijos nacidos de madres sanas [41,103,158]

Introducción

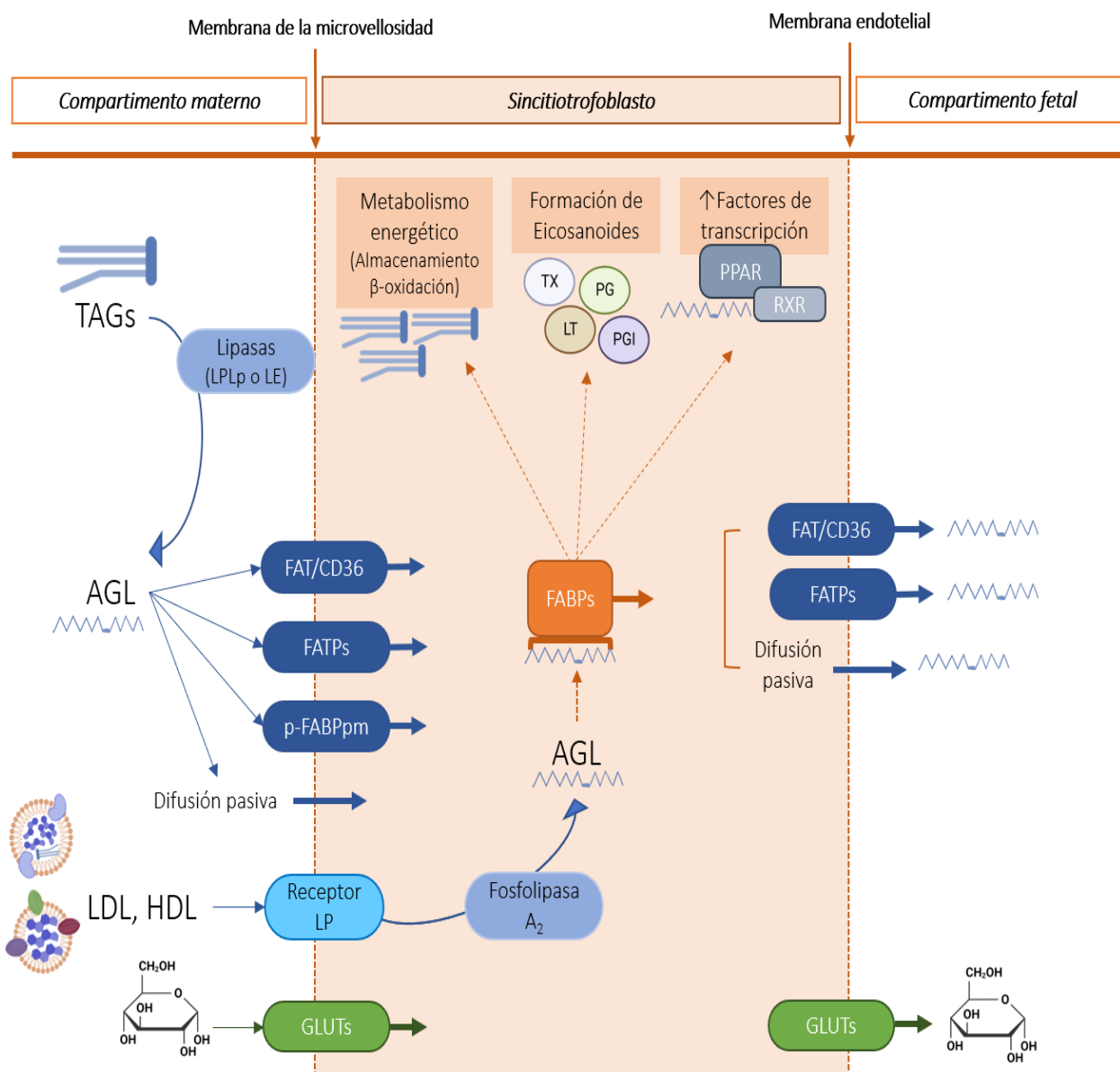


Figura 12. Estructura placentaria y transporte de ácidos grasos vía materno-fetal. El sincitiotrofoblasto es el responsable de la transferencia de nutrientes al feto. Está constituido por la membrana de la microvellosidad que está en contacto con la sangre materna y por la membrana endotelial de los capilares fetales orientada hacia la circulación fetal. Para la transferencia de lípidos, las lipasas extracelulares liberan los ácidos grasos de los TAG maternos y estos son transportados a través de las microvellosidades por las proteínas p-FABPpm, FAT/CD36 y FATPs. Estos dos últimos transportadores, al estar presentes en ambos lados de la membrana del sincitiotrofoblasto, facilitan el paso de los AGL al feto. En el interior del citosol del sincitiotrofoblasto, las proteínas transportadoras intracelulares (FABPs) guían a los ácidos grasos para que ejerzan sus funciones biológicas. Abreviaturas: GLUT, transportador de la glucosa; FAT, translocasa de ácidos grasos; FATPs, proteínas transportadoras de ácidos grasos; LE, Lipasa endotelial; LPLp, Lipoproteína lipasa placentaria; LT, leucotrienos; p-FABPpm, proteína de unión a ácidos grasos propia de la membrana plasmática de la placenta; PG, prostaglandinas; PGI, prostaciclina; PPAR, receptor activador de la proliferación peroxisomal; Receptor LP, receptor de lipoproteínas plasmáticas; RXR, receptor del ácido retinoico X; TX, tromboxanos. Figura adaptada de Jones et al. [150].

2.2. Recomendaciones nutricionales de ácidos grasos durante el embarazo

Se conoce que durante el embarazo existe una alta demanda de AG, especialmente AGPI n-6 y n-3, para cubrir las necesidades materno-fetales. En el caso del feto, la obtención de AGPI se produce preferentemente a través de la placenta y su transferencia está condicionada en gran medida por la ingesta materna de los mismos [97]. Se debe tener en cuenta que la calidad de la dieta materna incide sobre la calidad de los AG transferidos hacia la placenta y tejidos en desarrollo. De la misma manera, su acumulación en tejidos fetales y en niños (incluido el cerebro y tejido adiposo) está influenciado por el aporte pre- y posnatal de éstos.

La mayoría de las investigaciones sobre las necesidades de AG durante el embarazo se han centrado principalmente en la función de los AGPI, especialmente AA, DHA y EPA [6], por su importante implicación durante la gestación. En la literatura, existen numerosos estudios sobre el efecto de la suplementación con AGPI-3 y los resultados observados en el embarazo (ver **Tabla 7**). No obstante, a pesar de los beneficios demostrados en el desarrollo neurológico/visual del feto y neonato, la prolongación de la gestación, el correcto peso al nacimiento o la disminución del riesgo de embarazo pretérmino [37,97,99,104,109,154], la ingesta recomendada de los AGPI no ha sido establecida con unanimidad. A continuación, en la **Tabla 8**, se recogen las recomendaciones de organismos internacionales y nacionales sobre la dosis diaria recomendada (DDR) de AG.

Independientemente de las concentraciones recomendadas por las diferentes organizaciones, para aumentar los niveles óptimos de DHA durante el embarazo y cubrir las necesidades ligadas a esta etapa, es necesario el consumo de una gran variedad de fuentes ricas en AGPI n-3 y/o suplementación con DHA preformado. De ahí que se recalque la importancia de una intervención dietética adecuada que asegure una gestación con resultados beneficiosos para la madre e hijo.

Además del aporte de DHA y derivados de AGPI n-3, también se hace hincapié en el control de los AG *trans*. En lo referente a los AG *trans*, estos se transmiten de la madre al feto durante el embarazo, y de la madre al hijo a través de la leche materna [6]. Por lo general, se han relacionado estos AG con efectos negativos en la concepción (infertilidad masculina y femenina) y la duración de la gestación, lo que puede provocar defectos en el desarrollo del feto y/o pérdida fetal tanto en animales como humanos [159–162]. Así pues, se sugiere que la ingesta de AG *trans* derivados de productos industriales debe ser lo más baja posible para las mujeres embarazadas y no superar el 1% de la energía diaria [162].

Finalmente, no hay evidencias de que los requerimientos diarios de grasa total, grasa saturada, monoinsaturada o de AGPI n-6 sean diferentes en el embarazo. Por tanto, no se propone un cambio en la ingesta diaria recomendada de estos nutrientes [6].

Tabla 8. Recomendaciones dietéticas de ácidos grasos en la mujer gestante.

Organismo	Tipo de ácido graso	Dosis diaria recomendada (DDR)	Dosis máxima permitida
WHO/FAO [6]	DHA	200 mg/d	1,0 g/d
	DHA+EPA	300 mg/d	2,7 g/d
	AA	-	800 mg/d
	Ácidos grasos <i>trans</i>	-	Lo más bajo posible
Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (del inglés <i>European Food and Safe Authority</i>) *	DHA	100-200 mg/d	-
	LA	4 (%E)	-
	ALA	0,5 (%E)	-
	DHA+EPA	250 mg/d	-
	Ácidos grasos <i>trans</i>	-	Lo más bajo posible
Eurodiet (2000) *	DHA	200 mg/d	-
Australia, (Ministry of Health-Department of Health and Ageing – National Health and Medical Research Council, 2006) *	DHA	115 mg/d	-
Países Bajos (Health Council, 2001, 2006) *	DHA	450 mg/d	-
Francia (ANSES, 2010) *	DHA	250 mg/d	-
	EPA + DHA	500 mg/L	-
Alemania, Austria, Suiza (2012) *	DHA	200 mg/d	-
España (FESNAD [163], SEEN [164], Ministerio de Sanidad [165])	DHA	100-200 mg/d	-
	EPA + DHA	250 mg/L	-

Abreviaturas: ANSES, Agencia Nacional de Seguridad y Salud Alimentaria (del francés, Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire); FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; FESNAD, Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética; SEEN, Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición; %E, porcentaje de energía diaria recomendada; WHO, Organización Mundial de la Salud (del inglés, World Health Organization). Nota: el símbolo (-) implica que no se dispone de estos datos en la bibliografía; () valores de DDR obtenidas del informe de la EFSA [166,167].*

3. DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO

3.1. Técnicas analíticas

Los AG se pueden determinar en diferentes muestras biológicas o alimentos. Con respecto a las muestras biológicas, se puede emplear sangre total obtenida por venopunción, suero o plasma a partir de sangre total, células eritrocitarias a partir de sangre total (interés por los AG presentes en la membrana del glóbulo rojo), sangre capilar, células del epitelio bucal, heces, orina, líquido cefalorraquídeo o diversos tejidos (adiposo, hepático, etc.). Entre estos tipos de muestras, la más empleada es el suero que se usa comúnmente para la determinación

del perfil de AG en el individuo [168,169]. En suero, los AG pueden analizarse en las diferentes fracciones lipídicas (por ejemplo, en TAG, EC, FL o lípidos totales) pero se debe tener en cuenta que la composición de AG variará en cada fracción, dependiendo de la ingesta dietética y el propio metabolismo de los lípidos [63,170].

El análisis de AG procedentes de estas muestras biológicas implica generalmente la realización de tres pasos consecutivos: extracción de lípidos de la matriz de la muestra, conversión de los lípidos extraídos en sus correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, del inglés *Fatty Acids Methyl Esters*) y análisis de los FAME mediante, generalmente, técnicas cromatográficas [6].

Los métodos más ampliamente utilizados para la extracción de lípidos han sido los métodos clásicos de Bligh y Dyer [171] y el método de Folch [172] (empleando disolventes como el cloroformo/metanol). Actualmente, se han modificados estos métodos por alternativas que favorecen el uso de disolventes más seguros para la salud y el medio ambiente y, además, permiten una extracción más rápida en un solo paso [173]. En función del tipo de disolvente empleado en las muestras de suero, se favorecerá la extracción de un tipo de lípido u otro. Por ejemplo, la utilización de disolventes no polares (como el hexano) permiten extraer eficazmente los TAG mientras que los disolventes polares (como el etanol o metanol) proporcionan un alto rendimiento en la extracción de FL [173]. A continuación, para analizar los AG extraídos es necesario su conversión en derivados no polares, es decir, en sus correspondientes ésteres metílicos o FAME [174].

Posteriormente, se emplean técnicas cromatográficas, como técnicas *Gold standard*, para el análisis de los FAME [174]. La más utilizada es la cromatografía de gases (GC, del inglés *Gas Chromatography*) puesto que posee una alta sensibilidad y requiere poca cantidad de muestra para el análisis (del orden de μL). En líneas generales y como se muestra en la **Figura 13**, el cromatógrafo de gases consta principalmente de un inyector para introducir la muestra biológica, una columna que permite separar los distintos AG presentes en la muestra según su afinidad por la fase estacionaria, un horno para proporcionar calor a la columna y un detector que transmite la señal analítica.

Con esta técnica, es posible obtener un análisis cuantitativo completo de la composición de AG de una muestra en poco tiempo. Por lo general, los AG individuales pueden ser identificados por GC con una certeza razonable a partir de sus tiempos de retención relativos [175]. Sin embargo, existen otras técnicas alternativas para el análisis de los AG como son: la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, del inglés *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) [176,177], la resonancia magnética nuclear [178] o la electroforesis capilar [179].

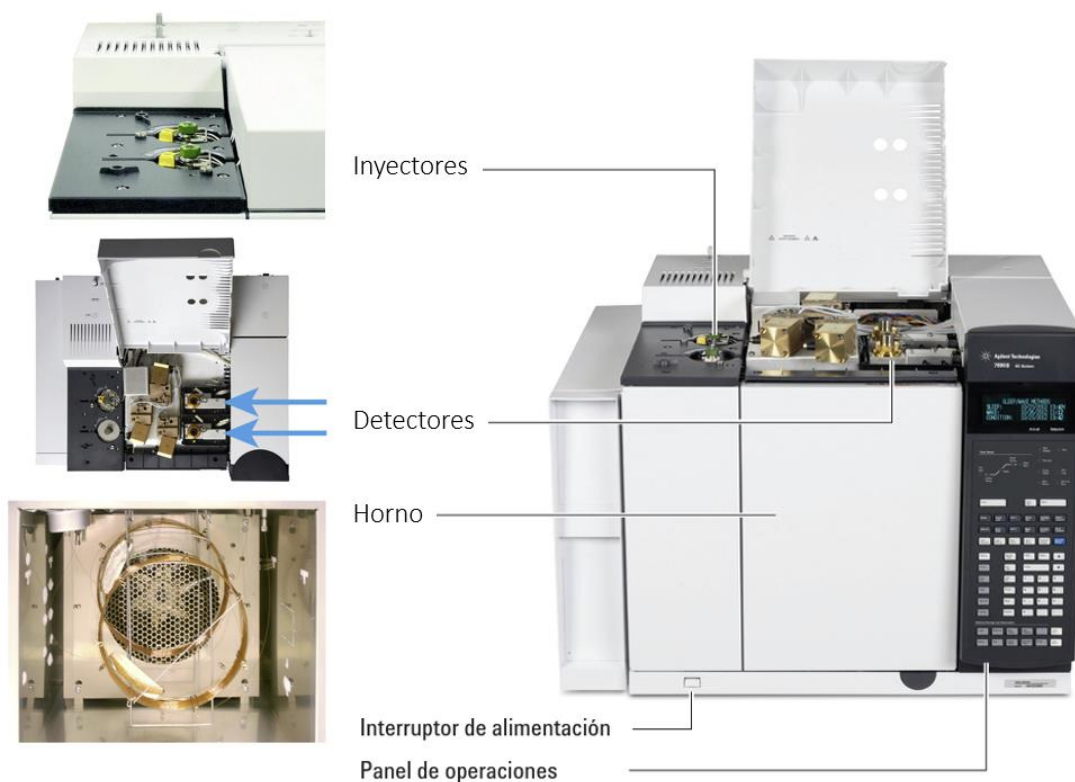


Figura 13. Descripción general del cromatógrafo de gases. Las imágenes corresponden al modelo de cromatógrafo de gases de la serie 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) utilizado en el presente proyecto. Imagen disponible en la página web oficial de Agilent Technologies (www.agilent.com).

3.2. Expresión de los valores

En la bibliografía consultada, los resultados obtenidos mediante cromatografía pueden expresarse bien en valores cuantitativos/absolutos, es decir, en unidades de concentración [180,181], o bien en valores cualitativos/relativos, es decir, porcentaje de un determinado AG con respecto al total de AG medidos [170,182].

Ambos tipos son ampliamente utilizados, pero se debe tener en cuenta que los valores relativos presentan ciertas limitaciones. Por un lado, el número de AG incluidos en el estudio afectará al cálculo de los porcentajes obtenidos para un AG determinado. Por ejemplo, el porcentaje de DHA calculado con respecto al total de AGPI n-3 será diferente cuando se establece que el total de AGPI n-3 es la suma de DHA y EPA en lugar de la suma de ALA, DHA y EPA (en este último supuesto, el porcentaje de DHA será menor al obtener la proporción entre 3 componentes). En consecuencia, habrá una mayor variabilidad en los resultados dificultando la comparación entre estudios [170,182–184]. Sin embargo, los valores de AG expresados en concentraciones absolutas son independientes del número total de AG medidos en el estudio [181]. Por otro lado, la obtención de los valores relativos implica que en la misma muestra se debe analizar un perfil completo de AG mientras que, en el caso de los valores absolutos, cada AG se mide de

forma individual reduciendo el número y costes de las determinaciones, y favoreciendo la realización de estudios dirigidos a unos pocos AG.

En cuanto a la presentación de los resultados, estos pueden calcularse como media \pm DS y/o percentiles que determinan los límites de referencia. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, los resultados se muestran como media \pm DS y no se establecen los intervalos de referencia. Este hecho también dificulta la comparación de los resultados propuestos por los diferentes estudios publicados (**Tablas 9 y 10**).

4. INTERVALOS DE REFERENCIA BIOLÓGICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

4.1. Concepto y definición de los intervalos de referencia en la población

El resultado de una prueba de laboratorio medida u observada en una persona (normalmente un paciente) se compara con un intervalo de referencia con el fin de realizar un diagnóstico médico, tomar una decisión clínica-terapéutica u otra evaluación fisiológica como determinar desequilibrios (déficit o exceso) nutricionales que puedan poner en riesgo la salud de la persona. La interpretación de los datos proporcionados por el laboratorio clínico es, por tanto, un proceso de toma de decisiones comparativo entre dos valores. Para que este proceso de toma de decisiones se produzca correctamente, surge la necesidad de disponer de intervalos de referencia para las pruebas disponibles en el laboratorio. Estos intervalos, pueden estar asociados tanto a estados de salud como a otros estados fisiológicos o patológicos. La elaboración de intervalos de referencia adecuados es por tanto una importante labor que atañe principalmente a los laboratorios clínicos y que resulta esencial para la asistencia del paciente [185].

La Organización Internacional de Normalización (ISO, del inglés, *International Organization for Standardization*) contempla esta labor de los laboratorios en la Norma UNE-EN ISO 15189:2012 (basada en las Normas ISO/IEC 17025 e ISO 9001) aprobada por el Comité Europeo de Normalización (CEN). Esta norma, recopila los requisitos relativos a la competencia y la calidad que son propios de los laboratorios clínicos. Entre los requisitos que recoge esta norma, en el apartado “5.5.2. Intervalos de referencia biológicos o valores de decisión clínica” se especifica que el propio laboratorio debe definir los intervalos de referencia biológicos, documentar el fundamento del procedimiento analítico para su elaboración y comunicar esta información en los informes emitidos a los usuarios [186].

Además de ser una competencia de los laboratorios, existen guías estandarizadas que contienen protocolos detallados para definir y establecer los intervalos de referencia biológicos correctamente. Actualmente, se utiliza la guía publicada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, del inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) denominada EP28-A3c: *Definición, establecimiento y verificación de intervalos de referencia en el laboratorio clínico*. Esta guía ha sido elaborada con la colaboración de la Federación Internacional de

Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC, del inglés, *the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*), el Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH, del inglés, *the International Council for Standardization in Haematology*) y el grupo de Expertos en Teoría de Valores de Referencia (EPTRV, del inglés, *Expert Panel on Theory of Reference Values*) [187]. En esta guía, se incluye un esquema con el protocolo del procedimiento general para establecer los intervalos de referencia, seguido de los detalles de cada uno de los procesos que lo componen: (i) proceso de selección de los individuos o población de referencia, (ii) definición del procedimiento de medida con sus consideraciones preanalíticas y analíticas correspondientes, (iii) recopilación de los valores medidos de la magnitud en cuestión, (iv) método de cálculo y análisis estadístico de los resultados obtenidos, (v) requisitos de calidad para estimar intervalos de referencia válidos, (vi) transferencia de los intervalos de referencia de un laboratorio a otro y, (vii) presentación de los valores de referencia en los informes del laboratorio clínico.

Según la definición propuesta por el CLSI, el intervalo de referencia es el intervalo que incluye dos límites de referencia obtenidos en una población de sujetos sanos. Generalmente, representa el 95% de la población (centrado en la mediana) y engloba un intervalo entre el 2,5% y 97,5%, el cual representa los límites inferior y superior, respectivamente [187,188].

El intervalo de referencia puede variar en función del tipo de muestra biológica, población de referencia seleccionada y método analítico. En algunos casos, sólo se puede utilizar un límite de referencia, normalmente un límite superior. La determinación del intervalo de referencia se basa en cálculos estadísticos y es descriptivo de una población específica con requisitos preestablecidos. En este sentido, establecer correctamente la población de referencia y su estado de salud es un paso crucial en la elaboración de los intervalos de referencia.

Cabe destacar que la elaboración de intervalos de referencia es un proceso que no está al alcance de la mayoría de laboratorios clínicos debido, principalmente, a la dificultad de obtener una muestra de individuos de referencia suficiente y el elevado coste de las mediciones. Además, en el caso de la determinación de los AG, se añade la dificultad en la adquisición y manejo de los analizadores o tecnología necesaria para llevar a cabo las mediciones. La técnica *Gold standard* es la cromatografía de gases o cromatografía líquida de ultra alta resolución acopladas a la espectrometría de masas, ambas son complejas, poseen un elevado coste y son pocos los laboratorios que disponen de ellas.

4.2. Estudios de validación de intervalos de referencia de ácidos grasos en población general y en embarazadas

4.2.1. Ácidos grasos de cadena media-larga

- **Determinación de intervalos de referencia en población general**

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios en población general reportando concentraciones de AG en el organismo. En la mayoría de ellos, los resultados se expresan como valores medios de AG y, en unos pocos, además, se establecen los intervalos de referencia. En

Introducción

general, estos estudios difieren entre sí en cuanto a la selección de la población de referencia (estado de salud, edad, sexo, etc.), tipo de muestra, metodología analítica utilizada para su medida y expresión de los resultados. Estas discrepancias se pueden observar recopiladas en el estudio de Abdelmagid *et al.* (2015), en el cual se publicó una tabla con 42 estudios donde se determinaban las concentraciones de AG [180], y en la base de datos del Metaboloma Humano (*Human Metabolome Database*, <http://www.hmdb.ca/>) donde se recogen los estudios que han medido las concentraciones de los diferentes AG en función del tipo de muestra biológica utilizada. En la **Tabla 9** se resumen algunos de los estudios publicados en población adulta empleando muestras de suero/plasma. En esta tabla se recogen aquellos estudios realizados en población sana adulta y con un tamaño muestral superior a 100 individuos.

Tabla 9. Estudios publicados que reportan concentraciones séricas de ácidos grasos en adultos.

Estado del sujeto y tamaño muestral	Edad (rango o m±DS*)	Número de AG medidos y expresión de los resultados	Referencias
Estudios con valores medios de AG			
Individuos sanos (n=2246), individuos con EC (n=1595).	Sanos: 60,0±8,0*; EC: 64,9±7,6*	22, Conc en m±DS	Khaw <i>et al.</i> , 2012 [189].
Hombres sanos (n=327), mujeres sanas (n=499).	20 – 29	13, Conc en m±DS	Abdelmagid <i>et al.</i> , 2015 [180].
Hombres sanos (n=100), mujeres sanas (n=100).	18 – 55	4, % en m±DS	Garneau <i>et al.</i> , 2012 [182].
Individuos sanos (n=2151).	30 – 85	7, % en m±DS	Tanaka <i>et al.</i> , 2009 [183].
Hombres sanos (n=926).	40 – 49	3, % en m±DS	Lee <i>et al.</i> , 2012 [190].
Estudio con valores medios y/o intervalos de referencia biológicos establecidos de AG			
Individuos sanos (n=826).	20 – 29	61, Conc en m±DS y percentiles	Abdelmagid <i>et al.</i> , 2015 [180].
Individuos sanos (n=826).	18 – 55	10, Conc en percentiles y % en m±DS	Sera <i>et al.</i> , 1994 [181].
Hombres sanos (n=186), mujeres sanas (n=290).	Hombres: 38,4±14,6*; Mujeres: 39,2±14,7*	67, Conc en m±DS y percentiles	Lust <i>et al.</i> , 2021 [191].
<i>No consta.</i>	<1 hasta >18	22, Conc en percentiles	Laboratorios Clínica Mayo [192].
Individuos sanos (n=2793).	15 hasta >65	13, % en m±DS y percentiles	Bradbury <i>et al.</i> , 2011 [170].

Abreviaturas: AG, ácidos grasos; EC, enfermedad coronaria m±DS (), media y desviación estándar; conc, unidad de concentración. Nota: Nos referimos a individuos cuando no se hace referencia al sexo de la persona.*

- **Determinación de intervalos de referencia en embarazadas**

Como se ha comentado con anterioridad, el periodo de embarazo implica cambios físicos y fisiológicos importantes y la adaptación a dichos cambios pueden influir en la salud tanto de la madre como la del feto [94,193–195]. Por esta razón, para establecer correctamente los intervalos de referencia en mujeres embarazadas, éstas se tienen que considerar como un grupo poblacional diferente, con respecto a los individuos sanos (conjunto de hombres y mujeres) y mujeres adultas sanas, debido a los cambios fisiológicos de su organismo y a los requerimientos nutricionales que necesitan durante la gestación. Sin embargo, los estudios poblacionales que incluyen a este grupo son muy escasos debido, en parte, a la dificultad de obtener un tamaño muestral suficiente de participantes. En la **Tabla 10** se recogen los estudios publicados que se conocen hasta la fecha en poblaciones de mujeres embarazadas.

Tabla 10. Estudios publicados que reportan concentraciones séricas de ácidos grasos en mujeres embarazadas.

Estado del sujeto, tamaño muestral y	Semanas de gestación y número de determinaciones	Edad (rango o $\pm m \pm DS^*$)	Número de AG medidos y expresión de los resultados	Referencias
Estudios con valores medios de AG				
Mujer embarazada sana (n=116) y mujer embarazada con DMG (n=24), suero.	Semana 24-28 y semana 32-35. 2 determinaciones	Sanas: 31,1 \pm 0,5; DMG: 32,3 \pm 0,7*	14, Conc en $m \pm DS$	Zhao <i>et al.</i> , 2015 [196].
Mujer embarazada sana (n=170), suero materno y sangre de cordón umbilical.	Semana 12 y en el parto. 2 determinaciones	31,6 \pm 4,3*	14, % en $m \pm DS$	Montes <i>et al.</i> , 2013 [197].
Mujer embarazada sana (n=122), suero y membrana eritrocitaria.	Pre-embarazo, semana 4, 6, 8 y 10. 5 determinaciones	30,7 \pm 0,6*	11, % en $m \pm DS$	Otto <i>et al.</i> , 2001 [198].
Mujer embarazada sana (n=122), suero materno, membrana eritrocitaria materna y sangre de cordón umbilical.	En el momento del parto (semana 39,5 \pm 1,1*). Una única determinación	29,2 \pm 5,3*	26, % en $m \pm DS$	Enke <i>et al.</i> , 2011 [184].
Mujer embarazada sana (n=251), suero materno, membrana eritrocitaria materna y sangre de cordón umbilical.	Semana 16, 22 y 32, y en el parto. 4 determinaciones. Seguimiento a lo largo del embarazo.	17,2 – 43,4	12, % en $m \pm DS$	Vlaardingerbroek, H. & Hornstra, G., 2004 [31].

Abreviaturas: AG, ácidos grasos; $m \pm DS$ (*), media y desviación estándar; conc, unidad de concentración; DMG, diabetes mellitus gestacional.

Tabla 10. Cont.

Estado del sujeto, tamaño muestral y	Semanas de gestación y número de determinaciones	Edad (rango o \pm $m \pm DS^*$)	Número de AG medidos y expresión de los resultados	Referencias
Estudios con valores medios de AG				
Mujer embarazada sana (n=77), membrana eritrocitaria.	Semana 11 – 15. Una única determinación	27,4 \pm 4,7*	9, % en $m \pm DS$ comparando suplementación con AGPI y mujeres fumadoras.	Magnusardottir <i>et al.</i> , 2009 [199]
Mujer embarazada adolescente sana (n=283), suero.	Semana 29-31. Una única determinación	14 – 18	16, Conc en $m \pm DS$ y % en $m \pm DS$	Wheeler <i>et al.</i> , 2010 [200].
Mujer embarazada sana (n=74), membrana eritrocitaria materna y sangre de cordón umbilical.	Semanas 27, 30 y 36, 2 días y 1 mes posparto. 5 determinaciones	25,9 – 33,9	14, % en $m \pm DS$	Kawabata <i>et al.</i> , 2017 [201].
Mujer embarazada sana (n=1623), membrana eritrocitaria materna y sangre de cordón umbilical.	Semana 24 – 30 y en el parto. 2 determinaciones	30,7 \pm 5,1	18, % en $m \pm DS$ y percentiles	Saito <i>et al.</i> , 2017 [202].
Mujer embarazada sana (n=122), membrana eritrocitaria.	Semana 10,9 \pm 2,6*. Una única determinación	28,3 \pm 5,6*	15, % en $m \pm DS$	Hoge <i>et al.</i> , 2018 [30].
Estudio con valores medios y/o intervalos de referencia biológicos establecidos de AG				
Mujer embarazada sana (n=225), suero.	Semana 5-13, 20-26 y 30-36. 3 determinaciones. Seguimiento a lo largo del embarazo.	20 – 40	22, Conc en $m \pm DS$. Curvas de percentiles en AGS totales, AGMI totales, AGPI totales.	Pinto <i>et al.</i> , 2015 [203].
Mujer embarazada sana (n=247), membrana eritrocitaria.	Entre semana 16-32. Una única determinación	30,1 \pm 4,6*	15, Conc en percentiles y en $m \pm DS$; % en percentiles y en $m \pm DS$	Araujo <i>et al.</i> , 2020 [204].

Abreviaturas: AG, ácidos grasos; $m \pm DS$ (*), media y desviación estándar; conc, unidad de concentración.

Como consta en la **Tabla 10**, únicamente se han descrito los intervalos de referencia de AG en una cohorte brasileña de 225 mujeres embarazadas a lo largo de los 3 trimestres de embarazo [203] y en una cohorte noruega de 247 mujeres embarazadas únicamente durante el primer trimestre de embarazo [204]. En estos dos artículos, se emplean dos poblaciones que presentan patrones dietéticos y estilos de vida diferentes a los de nuestras participantes. En el presente

trabajo de Tesis, la población de mujeres embarazadas sanas seleccionadas pertenece a una región mediterránea donde la composición de la dieta local puede promover un bajo contenido en AGS y un alto contenido en AGMI y AGPI n-3, principalmente derivados del aceite de oliva y del consumo de pescado, respectivamente [62,197]. Esta variación en el tipo de dieta puede contribuir a una modificación de los intervalos de referencia con respecto a los publicados por Pinto *et al.* [203] y Araujo *et al.* [204].

4.2.2. Ácidos grasos de cadena corta

Dentro de la escasa bibliografía publicada, los estudios relacionados con las concentraciones de AGCC se miden en muestras fecales [73,90,205]. Debido a que la producción mayoritaria de AGCC se debe a la fermentación bacteriana, sus concentraciones se suelen correlacionar con el perfil bacteriano que compone la microbiota intestinal [71,72,82]. No obstante, los AGCC atraviesan la barrera intestinal y pasan a la circulación sanguínea vía porta donde ejercerán su función a nivel sistémico [72]. Por consiguiente, es importante conocer la concentración plasmática de los AGCC y su implicación en el organismo.

Las concentraciones de AGCC en adultos sanos, se pueden consultar en la base de datos del Metaboloma Humano (<http://www.hmdb.ca/>) donde se recogen algunos estudios realizados en suero. Además, Psychogios *et al.* [206] reclutaron a 21 adultos controles Vs. 9 pacientes con trasplante cardíaco donde establecieron valores medios de acetato en suero; Bloemen *et al.* [207], seleccionaron 22 adultos (9 sanos con un colón normal y 13 tras haberse sometido a una cirugía por cáncer de colon) y establecieron valores medios de acetato, propionato y butirato en suero; y, Tian *et al.* [208] seleccionaron 35 adultos (21 con síndrome del colon irritable y 14 sanos) para establecer las concentraciones séricas de ácido propiónico y butírico.

En cuanto a la población de mujeres embarazadas sanas, se conocen los siguientes estudios que hayan aportado valores medios de AGCC en suero: (i) Priyadarshini *et al.* [209] reclutaron a 20 mujeres embarazadas entre la semana 36-38 de gestación (10 controles con peso normal Vs. 10 con sobrepeso) y determinaron la concentración media del acetato, propionato y butirato en suero; y (ii) Bahado-Singh *et al.* [210], seleccionaron 144 mujeres durante el primer trimestre de gestación (114 controles Vs. 30 embarazadas con fetos portadores de trisomía 18) y midieron la concentración media del acetato e isobutirato. En cuanto a la producción de AGCC, algunos estudios han confirmado que entre el primer y el tercer trimestre del embarazo se producen cambios en la microbiota intestinal productora de AGCC [89,193,211,212] y, con lo cual, puede haber una fluctuación de la concentración durante el embarazo que requiere ser estudiada.

En la búsqueda exhaustiva que se ha realizado en diferentes buscadores bibliográficos (*Pubmed*, *Cochrane*, *BASE* y *Google Scholar*) no se han encontrado publicaciones donde se especifiquen los intervalos de referencia en AGCC, tanto en adultos sanos como en mujeres embarazadas sanas, siguiendo unas directrices tales como las del CLSI.

4.3. Factores que influyen en las concentraciones de los ácidos grasos

4.3.1. Factores relacionados con el grupo poblacional seleccionado

Teniendo en cuenta los estudios presentados en las **Tablas 9 y 10**, se observa que la selección de la población de referencia se suele basar en individuos adultos sanos cuyo rango de edad varía en función del estudio [170,181]. Sin embargo, en otros trabajos [180,191], se han determinado las concentraciones de AG en adultos sanos en función del sexo. Concretamente, se calcularon para hombres y mujeres (no embarazadas) y constataron que algunos AG presentaban concentraciones significativamente diferentes en función del sexo, siendo mayores para las mujeres [180]. Este aumento de algunos AG en las mujeres, puede estar relacionado con un efecto regulador de los estrógenos [25,28].

Igualmente, existen otras características o factores poblacionales que se deben tener en cuenta a la hora de elaborar correctamente los intervalos de referencia ya que se ha visto que pueden influir en las concentraciones de AG como, por ejemplo:

- El origen geográfico o étnico [200,213]. Los países asiáticos, como China o Japón, o los países del norte de Europa, como Noruega o Países Bajos, consumen mayor cantidad de pescado y presentan concentraciones elevadas de AGPI n-3, a diferencia de otros países como India, Turquía o Marruecos. En el caso de India, se reportó que las mujeres presentaban concentraciones elevadas de AGPI n-6 (LA y AA) [213].
- El estado de salud del individuo [189,196]. Existen determinadas situaciones fisiológicas (ayunos prolongados, ejercicio físico intenso) y patológicas (obesidad, DM2, hipertiroidismo, hepatopatías, etc.) que aumenta la lipólisis y elevan las concentraciones de AG en sangre [9,10].
- Factores relacionados con las enzimas implicadas en la síntesis de AG.
 - Factores genéticos: en relación a las enzimas elongasas (genes de la familia ELOVL), $\Delta 5$ -desaturasa (gen FADS1) y $\Delta 6$ -desaturasa (gen FADS2), algunos autores han descrito que la presencia de determinadas variantes genéticas en los genes ELOVL y FADS modifican los perfiles de los AGPI. Aquellas personas que sean portadoras homocigotas para dichas variantes tendrán una síntesis de AGPI (AA, EPA y DHA) disminuida y, en consecuencia, una acumulación de los AGE precursores (LA y ALA) [213,214]. La identificación de las personas portadoras homocigotas es importante, puesto que, en el caso de las mujeres embarazadas, el aporte de DHA al feto se verá muy comprometido [214].
 - Factores ambientales: en cuanto a la actividad enzimática de las desaturasas y elongasas que participan en la síntesis de los AGS y AGMI, se ha visto incrementada en personas que presentan obesidad o síndrome metabólico, tanto en suero como en tejido adiposo. Al parecer, la expresión de estas enzimas está modulada por el propio exceso de lípidos precursores (ácido palmítico y esteárico) que actúan como factores de transcripción y que se asocian al riesgo de desarrollar dicho síndrome metabólico [215,216].

- El estilo de vida [203,204] y el tipo de alimentación: las dietas ricas en hidratos de carbono favorecen la síntesis endógena de los AG [4]. En cuanto al aporte exógeno, el perfil de AG en sangre puede variar considerablemente en función de los alimentos ingeridos. Por ejemplo, un consumo elevado de pescado, marisco y otros alimentos de origen marino, favorecerá un aumento de los AGPI n-3 en nuestro organismo. No obstante, un consumo elevado de productos procesados aportará mayor cantidad de AGS, AG *trans* y AGPI n-6 [6]. Los individuos que se rigen por dietas vegetarianas o veganas, presentan concentraciones séricas de AGPI n-3 disminuidas [217].
- El consumo de sustancias nocivas, como el tabaco o el alcohol, pueden modificar las concentraciones de AG [218]. Referente al tabaco, algunos autores han observado que las concentraciones de los AGPI n-3 disminuyen en las personas fumadoras [219–221], mientras que, en personas con un consumo moderado-elevado de alcohol, las concentraciones de AGPI n-6 y n-3 son más bajas [203,218,222].
- El nivel educativo y socioeconómico también puede incidir en el consumo de alimentos. Algunos autores describen que las personas con mayor nivel educativo presentaban mayores concentraciones de AGPI n-3 [213].

4.3.2. Factores relacionados con la metodología analítica

En cuanto a la metodología, los intervalos de referencia se pueden establecer bajo condiciones preanalíticas, analíticas y posanalíticas diferentes dependiendo del estudio:

- En primer lugar, a nivel preanalítico, hay que establecer el tipo de muestra. Se puede utilizar sangre (suero o plasma), membrana eritrocitaria o tejido adiposo para la determinación de los AG de cadena media-larga. En este sentido, cada tipo de muestra se correlaciona con la ingesta de AG en un determinado periodo de tiempo. De esta manera, se sabe que la muestra de suero refleja el perfil de AG correspondiente a una ingesta reciente mientras que la membrana eritrocitaria o el tejido adiposo refleja el perfil de AG tras uno o varios meses de ingesta de AG, respectivamente [169]. En un mismo tipo de muestra, se pueden medir los AG en la totalidad de dicha muestra o bien medir los AG en función de las diferentes fracciones lipídicas que estén presentes en dicha muestra. Es decir, medir un determinado AG en la fracción de colesterol, fosfolípidos o TAG y determinar los AG mayoritarios en dichas fracciones [170]. En consecuencia, los valores de las concentraciones medidas de AG variaran en función del tipo de muestra y la fracción lipídica utilizada para su cuantificación.
- En un segundo lugar, a nivel analítico, hay que determinar el tipo de técnica empleada (ver apartado anterior: **3. Determinación bioquímica de los ácidos grasos en el organismo**). Los valores obtenidos de AG dependerán principalmente del método aplicado para la extracción de lípidos en muestras biológicas y de la técnica de análisis para la determinación del perfil de AG. Actualmente, la cromatografía de gases es la técnica más ampliamente utilizada y aceptada para la determinación de AG. Los estudios recogidos en las **Tablas 9 y 10** están realizados mediante dicha técnica.

- En tercer lugar, a nivel posanalítico, la interpretación y expresión de los valores de AG también difiere entre los diferentes estudios. Como se ha comentado con anterioridad, pueden expresarse en valores cuantitativos/absolutos o cualitativos/relativos. Hay que tener en cuenta que el número de AG incluidos en el estudio afectará al valor de los resultados relativos y, con lo cual, puede haber mayor variabilidad entre los estudios cuando los resultados se expresen de esa manera. Sin embargo, los valores de AG expresados en concentraciones absolutas son independientes del número total de AG medidos en el estudio [181]. Además, los valores de AG pueden calcularse como media \pm DS y/o percentiles dificultando, todavía más, la comparación entre los diferentes estudios.

Con todo lo expuesto, se observa una falta de estandarización en la elaboración de intervalos de referencia biológicos que dificulta la interpretación y comparación entre los diferentes estudios. Si a este hecho, añadimos que existen numerosos factores propios de cada grupo de población que pueden modificar las concentraciones séricas de AG, es lógico pensar que los intervalos de referencia de los AG deben establecerse para cada tipo de población, con características determinadas y requisitos claramente preestablecidos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar el estado nutricional en una amplia gama de ácidos grasos de cadena corta, media y larga en las mujeres embarazadas de una región Mediterránea del sur de Cataluña durante el transcurso de la gestación.

Objetivos específicos

Respecto a los ácidos grasos de cadena media y larga:

1. Analizar la influencia de los factores maternos (socioeconómicos y de estilo de vida) sobre las concentraciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en mujeres embarazadas.
2. Describir el estado sérico y la evolución de las concentraciones de ácidos grasos de cadena media y larga desde el inicio hasta el final de la gestación.
3. Establecer los intervalos de referencia para las concentraciones séricas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en mujeres embarazadas durante el transcurso de la gestación.

Respecto a los ácidos grasos de cadena corta:

4. Examinar la influencia de los factores maternos sobre las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta en el suero de las mujeres embarazadas, y describir su evolución durante la gestación.
5. Establecer los intervalos de referencia para el ácido acético, propiónico, butírico e isobutírico desde el primer al tercer trimestre de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO: PROYECTO ECLIPSES-AG

El proyecto ECLIPSES-AG presentado en esta tesis es un estudio observacional longitudinal multicéntrico que valora el estado prenatal de los AG en el transcurso de la gestación de mujeres embarazadas sanas teniendo en cuenta determinados factores (**Figura 14**).

El proyecto ECLIPSES-AG forma parte de un proyecto de mayor envergadura, denominado ECLIPSES. Se trata de un ensayo controlado aleatorizado triple ciego inscrito en el registro de ensayos clínicos de la Unión Europea (del inglés, EU Clinical Trials Register) con número identificador EU CTR-2012-005480-28 [223] y en ClinicalTrials.gov con número identificador NCT03196882 [224]. De este proyecto inicial se ha desarrollado una nueva cohorte valorando el estado de salud de los hijos desde el nacimiento hasta los 4 años de edad (ECLIPSES-NEN). El proyecto ECLIPSES ha sido financiado en varias ocasiones por el Instituto de Salud Carlos III con el Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo (ECLIPSES, PI12/02777 y ECLIPSES-NEN, PI17/01754).

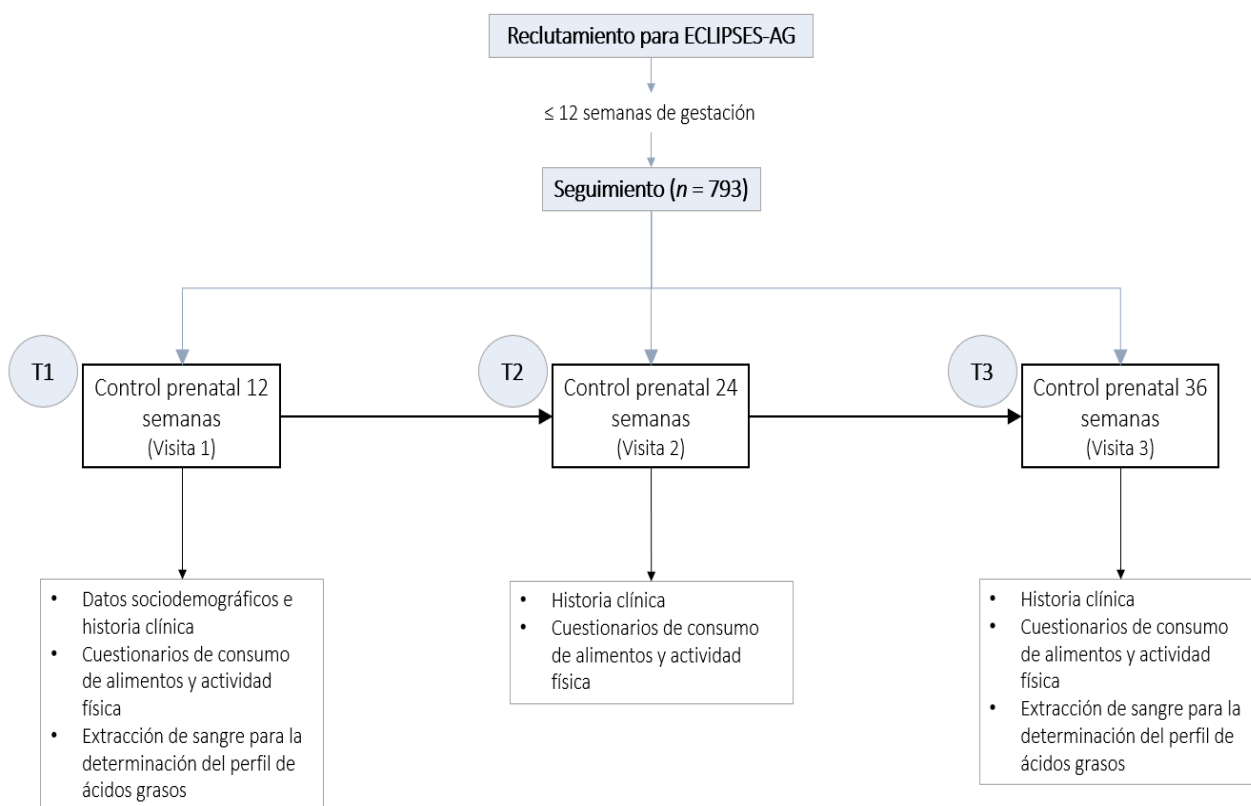


Figura 14. Diseño del estudio ECLIPSES-AG.

1.1. Aspectos éticos

El estudio ECLIPSES-AG se realizó de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki referentes a estudios realizados en humanos y fue aprobado el 3 de abril de 2017 por los Comités de Ética del Institut d'Investigació en Atenció Primària (IDIAP) con código identificador IJG-FER-2012, AC13/04 y, el 28 de septiembre de 2017 por el del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) con código identificador 118/2017.

2. POBLACIÓN A ESTUDIO. PROCEDIMIENTO Y RECOGIDA DE DATOS

2.1. Ámbito de estudio

Participaron un total de 12 centros de atención primaria (CAP) especializados en Asistencia a la Salud Sexual y Reproductiva (ASSIR) de las diferentes áreas sanitarias de la provincia de Tarragona pertenecientes al Institut Català de la Salut (ICS): CAP Jaume I, CAP Sant Pere 1-2, CAP Llibertad, CAP Torreforta, CAP Sant Pere i Sant Pau, CAP Salou, CAP Mont-Roig del Camp, CAP Miami, CAP Borges del Camp, CAP Bonavista y CAP de Valls. Se estima que el total de estos centros atienden un total de 3500 mujeres embarazadas con partos a término por año.

Para la realización de este proyecto se contó con la participación de profesionales de la salud pertenecientes a los diferentes CAP ASSIR (ginecólogos, matronas y enfermeras) y servicios centrales del Hospital Universitario Joan XXIII de referencia del ICS en Tarragona (servicio de Análisis Clínicos (facultativas especialistas del laboratorio) y espacio de Biobanco para la gestión y almacenamiento de las muestras). También se contó con la participación del Centro de Ciencias Ómicas (Centre Tecnològic de Catalunya, EURECAT) de Reus (Tarragona).

Este trabajo estuvo dirigido por el grupo de investigación en Nutrición y Salud Mental (NUTRISAM) (epidemiólogas, nutricionistas y psicólogas) de la Universitat Rovira i Virgili, Reus (Tarragona) y por la unidad de apoyo a la investigación en Atención Primaria de Tarragona-Reus (Institut d'Investigació en Atenció Primària (IDIAP) Jordi Gol) del ICS.

Antes de realizar el reclutamiento de las mujeres embarazadas, el grupo investigador realizó la formación pertinente a las matronas de cada centro referente al procedimiento, a la metodología del proyecto y la forma de aplicar cada uno de los diferentes cuestionarios.

2.2. Población estudiada

En las visitas rutinarias de control prenatal, las matronas de cada centro invitaron a participar a las mujeres embarazadas, y tras su aceptación se comprobaron los criterios de inclusión y exclusión del estudio. Después de cumplir con dichos criterios y firmar el consentimiento informado (CI), las mujeres se incorporaron en el estudio.

- **Criterios de inclusión-exclusión**

Inicialmente, se incluyeron un total de 793 mujeres adultas mayores de 18 años con ≤ 12 semanas de gestación (**Figura 14**), capaces de entender el idioma local (castellano o catalán) por sí mismas o a través de un acompañante, así como las características del estudio. Todas ellas firmaron el CI previamente a su participación.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: embarazos múltiples, haber tomado suplementos de hierro (con dosis superiores a los 10 mg/día) los meses anteriores a la semana 12 de gestación, estar anémica al inicio del embarazo, hipersensibilidad a la proteína del huevo, enfermedad grave previa que implicará un estado de inmunosupresión o enfermedad crónica que pudiera afectar el desarrollo nutricional (cáncer, diabetes mellitus pregestacional, síndrome de malabsorción o enfermedad hepática como hepatitis crónica o cirrosis). Además, 4 mujeres fueron eliminadas de esta muestra por haber tomado suplementos multivitamínicos con AG durante la gestación.

Todos estos criterios se aplicaron al inicio del estudio para la selección de las participantes y durante el seguimiento de la gestación en el segundo y tercer trimestre. Tal como se indica en la **figura 15**, a lo largo del estudio se contempló una pérdida progresiva de mujeres debido al incumplimiento de los criterios de inclusión-exclusión, abandono voluntario o pérdida en el seguimiento de las gestantes y pérdida fetal.

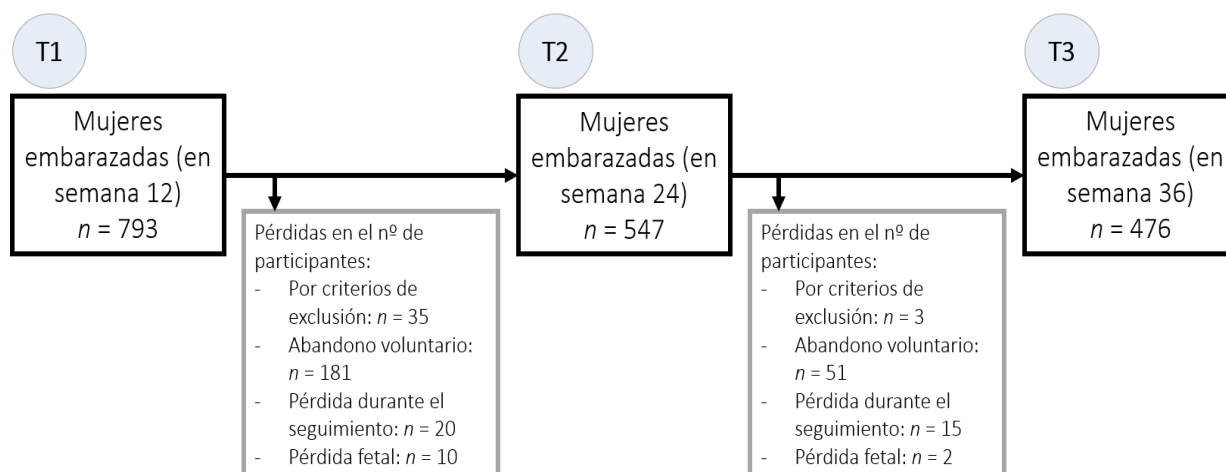


Figura 15. Seguimiento de las mujeres embarazadas durante el estudio.

2.3. Recogida de datos y variables a estudio

En las visitas rutinarias de control prenatal (semana 12, 24 y 36), las matronas, mediante entrevistas personales, recolectaron el conjunto de datos del estudio y realizaron las peticiones de extracción de las muestras biológicas en el primer (semana 12) y tercer (semana 36) trimestre de gestación (**Figura 14**).

2.3.1. Datos sociodemográficos

- Fecha de nacimiento.
- Origen étnico: las mujeres se clasificaron en origen caucásico/europeo, asiático, africano, árabe (se incluye Norte de África y Oriente Medio), sudamericano, gitano u otros orígenes étnicos.
- Nivel de estudios: se clasificaron en un total de 3 niveles (bajo, medio y alto). El nivel bajo eran aquellas mujeres que no sabían leer ni escribir (sin estudios) o con estudios primarios incompletos o completos (primaria, EGB, ESO). El nivel medio eran aquellas mujeres con estudios secundarios (BUP, COU, FP, Bachillerato). El nivel alto eran aquellas mujeres con estudios universitarios y/o postgrados.
- Nivel socioeconómico: fue valorado usando la clasificación catalana de ocupación (CCO-2011) y dividido en 3 niveles (estudiante, empleada y desempleada) [225].

2.3.2. Historia clínica

- Antecedentes y estado de salud: principalmente se preguntó por los antecedentes en enfermedades crónicas (hipertensión arterial, DM tipo I y tipo 2, hipotiroidismo, etc.) y se valoró la presión arterial.
- Historia obstétrica: se preguntó por la paridad (no, sí), número de hijos, tipo de parto (vaginal o cesárea), el uso de multivitamínicos y suplementos de hierro previos a la semana 12 de gestación.
- Mediciones antropométricas:
 - Se valoró el peso y talla de las participantes. El peso se midió con la participante de pie y con ropa liviana, sin calzado y parada en el centro de la báscula calibrada (con precisión de 0,1 kg) de la marca SECA (Hamburgo, Alemania). La talla se midió con la participante de pie, descalza, con el cuerpo erguido a su máxima extensión y la cabeza erecta mirando al frente. Se le ubicó de espaldas al estadiómetro calibrado (con precisión de 0,1 cm) de la marca SECA (Hamburgo, Alemania) con los talones tocando al plano posterior, con los pies y las rodillas juntas.
 - El índice de masa corporal (IMC) se estimó a través de la siguiente fórmula $IMC = \text{kg}/\text{m}^2$, y una vez obtenido el valor del IMC, se clasificó según los criterios de la WHO

- [226]: peso insuficiente (IMC: $<18,5 \text{ kg/m}^2$), normopeso ($18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($25,0\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$) y obesidad ($30\text{-}\geq 50 \text{ kg/m}^2$).
- La ganancia de peso gestacional (GPG) total se calculó en base al IMC inicial a la semana 12 de gestación, y se clasificó en GPG insuficiente, adecuada o excesiva según las recomendaciones del Instituto de Medicina de EE.UU en 2009 [227]. Una GPG adecuada corresponde entre 11,5-16 kg para una mujer con peso normal inicial, entre 7–11,5 kg para una mujer con sobrepeso inicial, y ≤ 6 kg para una mujer con obesidad inicial. Los valores inferiores o superiores a la GPG adecuada se consideraron insuficientes o excesivos, respectivamente.
 - El consumo alimentario de las participantes se valoró a través de un cuestionario de frecuencia de consumo (CFC), autoadministrado y validado en nuestra población [228] que incluía 45 tipos de alimentos (ver **Anexo 1**). Una vez cumplimentado por las participantes, las nutricionistas del equipo investigador se encargaron de revisar y resolver las dudas con respecto a la realización del cuestionario. En este cuestionario se preguntaba por la frecuencia habitual de consumo a lo largo del día, semanal o mensual para cada uno de los 45 grupos de alimento (45 ítems). Los datos obtenidos de consumo se calcularon en g/día multiplicando las frecuencias de consumo diarias de cada grupo de alimentos por los gramos de alimento presentes en una ración media, obtenido a partir del peso estandarizado por ración y el grupo de edad para nuestra población [229]. A partir de este CFC, se obtuvo:
 - El índice de calidad de la dieta (SQDI, del inglés, *Spanish Diet Quality Index*) [30]: se estimó a partir del consumo de nueve grupos de alimentos (frutas, verduras, legumbres, cereales, pescado fresco, carne, productos lácteos, aceite de oliva y alcohol). La puntuación resultante varió entre 0 y 18 puntos: los valores más altos indicaron una mayor adherencia al índice SDQI y, por tanto, una mayor calidad de la dieta. Dado que no hay puntos de corte preestablecidos para la población embarazada, las puntuaciones se clasificaron como calidad de la dieta baja (0-6 puntos), moderada (7-10 puntos) y alta (11-18 puntos).
 - Sobre el estilo de vida de las participantes se recolectaron los siguientes datos:
 - Consumo de tabaco: no/sí y si era fumadora/exfumadora/no fumadora en base al cuestionario de Fagerström [230].
 - Consumo de alcohol: clasificado en no bebedoras o bebedoras de alcohol, a partir del CFC.
 - Actividad física (AF): se midió mediante la versión corta del cuestionario propuesto por el International Physical Activity Questionnaire (IPAQ-S) [231] (ver **Anexo 2**). Se obtuvo el tipo de AF (clasificada como AF de intensidad baja/AF de intensidad moderada/AF de intensidad vigorosa), la frecuencia (número de veces a la semana que se realizó una AF) y la duración (min/día). Para obtener los equivalentes metabólicos o MET en minutos a la semana de cada tipo de AF, se calculó el promedio de la frecuencia y duración habitual (min/sem) y se multiplicó por una constante según su gasto energético (intensidad baja: 3,3 MET; intensidad moderada: 4,0 MET; intensidad vigorosa: 8,0 MET), obteniendo así, los MET/min/sem. El total de AF se obtuvo mediante la suma de los MET/min/sem de

cada tipo de AF clasificándolas como: AF sedentaria/baja (<600 MET/min/sem), AF moderada (600-2999 MET/min/sem) y AF vigorosa/alta (>3000 MET/min/sem). Además, se utilizó el algoritmo de Craig modificado [232] para establecer el nivel de AF de las participantes como sedentarias, irregularmente activas, activas y muy activas. Finalmente, estos 4 niveles se reagruparon en 2 categorías: senderarías (con los dos primeros niveles) y activas (con los 2 últimos).

2.3.3. Parámetros bioquímicos

2.3.3.1. Obtención de la muestra de sangre

Se realizó la extracción de las muestras de sangre periférica por venopunción después de un ayuno nocturno de ≥ 8 horas. Para la obtención del suero, se emplearon tubos de 7,5 ml (BD Vacutainer® SST™, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) sin anticoagulante que contenían un gel de polímero para facilitar la separación entre el suero y el coágulo formado, ayudando así a tener una muestra primaria libre de contaminación por células e hilos de fibrina. Estos tubos se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la coagulación. El suero se separó por centrifugación y se distribuyó en alícuotas de 500 μ l.

Las enfermeras de los centros CAP ASSIR fueron las responsables de la extracción y transporte de las muestras de sangre al Biobanco del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona. En el Biobanco, las alícuotas de las muestras primarias se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

2.3.3.2. Determinación de los ácidos grasos

La determinación de AG de cadena media-larga (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) y AG de cadena corta se realizó en las muestras de suero de las mujeres embarazadas que permanecieron en el estudio hasta el tercer trimestre (**Figura 15**) y tenían muestra de sangre extraída tanto en el primer como tercer trimestre de embarazo. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Centro de Ciencias Ómicas (Centre Tecnològic de Catalunya, EURECAT) de Reus (Tarragona). Para ello, las muestras se descongelaron al final del estudio y se analizaron simultáneamente para minimizar la variabilidad de los individuos (intra- e interindividual) y de los lotes de reactivos (*inter-batch*). Para controlar otros posibles sesgos, los procesos analíticos se validaron previamente mediante la determinación de los coeficientes de variación intra e inter-ensayo para todos los AG medidos. Se aceptaron como valores correctos aquellos recomendados por los fabricantes de los kits utilizados. Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron por la misma persona para minimizar las variaciones inter-ensayo [233]. Además, se registró la fecha de la extracción de las muestras y posibles incidencias que se pudieron dar durante el transcurso del proceso preanalítico, analítico y posanalítico.

Se analizaron un total de 41 AG: 4 AG de cadena corta y 37 AG de cadena media-larga en suero (**Tabla 1**). No obstante, aquellos AG cuyos valores obtenidos estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica analítica utilizada no se mostraron en los resultados de los trabajos presentados en el apartado **Resultados**. La metodología empleada para la determinación de los AG se describe a continuación en el siguiente apartado.

3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la determinación de AG de cadena media-larga (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) y AG de cadena corta se emplearon técnicas cromatográficas diferentes.

3.1. Determinación de ácidos grasos de cadena media-larga en suero por cromatografía de gases

Para la determinación de los 37 AG de cadena media-larga se puso a punto el protocolo de David *et al.* [234]. En general, la fracción lipídica de las muestras de suero fue hidrolizada y metilada en sus correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Una vez formados los ésteres, estos se extrajeron con hexano y se analizaron por cromatografía de gases (GC) acoplada en tándem a espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*). El empleo de diferentes columnas permitió la separación de los AG en función del número de carbonos, número de dobles enlaces y tipo de isomería (*cis* o *trans*).

3.1.1. Reactivos y patrones

- Agua Milli-Q (Millipore, Burlington, MA, EE.UU).
- Metanol UHPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cloroformo para GC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hexano UHPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido clorhídrico (HCl) al 37 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Ácido Mirístico d-27 como patrón interno (IsoTec, Merck, Darmstadt, Alemania).
- Mezcla patrón de FAME (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EE.UU) formada por 37 FAME diferentes: butirato de metilo (C4:0), caproato de metilo (C6:0), caprilato de metilo (C8:0), decanoato de metilo (C10:0), undecanoato de metilo (C11:0), dodecanoato de metilo (C12:0), tridecanoato de metilo (C13:0), miristato de metilo (C14:0), miristoleato de metilo (C14:1[cis-9]), pentadecanoato de metilo (C15:0), pentadecenoato de metilo (C15:1[cis-10]), palmitato de metilo (C16:0), palmitoleato de metilo (C16:1 [cis-9]), heptadecanoato de metilo (C17:0), heptadecenoato de metilo (C17:1 [cis-10]), estearato de metilo (C18:0), octadecenoato de metilo (C18:1 [trans-9]), oleato de metilo (C18:1 [cis-9]), linolelaidato de metilo (C18:2 [trans-9,12]), linoleato de metilo (C18:2 [cis-9,12]), araquidato de metilo (C20:0), linolenato de metilo (C18:3 [cis-6,9,12]), eicosenoato de metilo (C20:1 [cis-11]), linolenato de metilo (C18:3 [cis-9,12,15]), heneicosanoato de metilo (C21:0), eicosadienoato de metilo (C20:2 [cis-11,14]), behenato de metilo (C22:0), eicosatrienoato de metilo (C20:3 [cis-8,11,14]), erucato de metilo (C22:1 [cis-13]), eicosatrienoato de metilo (C20:3 [cis-11,14,17]), araquidonato de metilo (C20:4 [cis-5,8,11,14]), tricosanoato de metilo (C23:0), docosadienoato de metilo (C22:2 [cis-13,16]), lignocerato de metilo (C24:0),

eicosapentaenoato de metilo (20:5 [cis-5,8,11,14,17]), nervonato de metilo (C24:1 [cis-15]) y docosahexaenoato de metilo (22:6 [cis-4,7,10,13,16,19]).

Las soluciones estándar fueron preparadas disolviendo los patrones FAME en hexano a una concentración de 25 µg/mL. Las soluciones fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

3.1.2. Instrumentación

Se empleó la siguiente instrumentación:

- Equipo: cromatógrafo de gases 7890A acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de la serie 7000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU).
- Columna analítica: HP-88, 100 mm x 250 µm x 0.25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU)
- Centrífuga tipo Mikro 200 Benchtop (Hettich Lab, Tuttlingen, Alemania).
- Agitador tipo IKA Vórtex Stirrer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU).
- Visidry (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

3.1.3. Procedimiento experimental

La preparación de las muestras se basó en el protocolo de David, *et al.* [234] para obtener derivados volátiles de FAME. Para ello, se mezclaron 50 µl de muestra de suero y una solución formada con 25 µl de patrón interno (ácido mirístico d-27), 200 µl de metanol y 200 µl de HCl 1,25 M de metanol, y se incubó a 80°C durante 2 horas para realizar la metilación. Se dejó enfriar y se traspasó a tubos *ependorfs* de 2,0 mL. Posteriormente, se añadieron 600 µL de hexano como disolvente de extracción y se agitó en vórtex durante 5 min. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 15000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante en un nuevo *ependorf* de 1,5 mL. Se añadió de nuevo 450 µL de hexano y se agitó durante 5 min, se centrifugó 5 min y se separó el sobrenadante. El tubo de 2 mL se secó añadiendo nitrógeno y el pellet se resuspendió con 200 µL de hexano. Finalmente, se trasvasaron 100 µl de la fase hexánica a un vial de inyección con inserto y se encapsuló para su introducción en el cromatógrafo de gases. Los otros 100 µl se conservaron en un vial en el interior de un congelador a -20°C.

El análisis cromatográfico se basó en el protocolo de David, *et al.* [234] para determinar los 37 FAME. Los FAME se separaron en una columna HP-88 (100 mm x 250 µm x 0,25 µm) utilizando un programa de temperatura entre 140 y 240°C con un caudal de 1mL/min usando helio como gas portador. La ionización se llevó a cabo mediante impacto electrónico (70 eV) y el analizador de masas funcionó en modo de monitorización de iones seleccionados.

3.1.4. Cuantificación y validación del método analítico

La identificación de los FAME de los AG se realizó comparando sus tiempos de retención con aquellos de la mezcla patrón. La cuantificación se realizó por normalización, expresando los valores cuantitativamente (en µmol/L) y en cantidades relativas, es decir, en porcentajes (% de un AG con respecto al % del total de ácidos grasos detectados). Se empleó el programa Agilent

MassHunter® B.06 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) para el análisis de los resultados.

Para la validación del método se determinaron los parámetros de calidad tales como la linealidad, la sensibilidad (límites de detección y cuantificación) y la precisión (repetitividad y reproducibilidad). Todos estos parámetros se recogen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Validación del método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la cuantificación de ácidos grasos de cadena media-larga en muestras de suero.

Ácidos grasos	Rango analítico (µmol/L)	Sensibilidad		Precisión (CV%)		Linealidad (Curva de Calibración)	
		LOQ (µmol/L)	LOD (µmol/L)	Intra-day	Inter-day	Ecuación	r ²
AGS							
Ácido Láurico (C12:0)	5,6 – 1109	5,6	1,4	≤8	≤12	y = 15,34x -0,326	0,987
Ácido Mirístico (C14:0)	2,5 – 1960	2,5	0,6	≤5	≤8	y = 25,44x -0,844	0,993
Ácido Palmítico (C16:0)	6,6 – 10542	6,6	1,7	≤11	≤13	y = 31,45x -2,509	0,999
Ácido Esteárico (C18:0)	4,0 – 3184	4,0	1,0	≤7	≤13	y = 20,76x -0,276	0,994
AGMI							
Ácido Palmítoleico (C16:1n-7)	5,5 – 3541	5,5	1,4	≤3	≤8	y = 10,14x -0,945	0,984
Ácido Oleico (C18:1n-9)	8,0 – 12822	8,0	2,0	≤9	≤14	y = 13,93x -4,816	0,980
AGPI n-6							
Ácido Linoleico (LA) (C18:2n-6)	10,0 – 32270	10,0	2,0	≤5	≤11	y = 15,46x -1,362	0,981
Ácido Dihomo-γ-linolénico (DHGLA) (C20:3n-6)	9,0 – 741	9,0	2,3	≤12	≤19	y = 7,99x -0,005	0,999
Ácido Araquidónico (AA) (C20:4n-6)	9,0 – 2984	9,0	2,3	≤8	≤14	y = 12,59x -0,372	0,980
AGPI n-3							
Ácido Eicosapentaenoico (EPA) (C20:5n-3)	2,3 – 751	2,3	0,6	≤10	≤15	y = 11,31x -0,018	0,999
Ácido Docosahexaenoico (DHA) (C22:6n-3)	9,0 – 2775	9,0	2,3	≤11	≤20	y = 17,84x -0,697	0,994

Abreviaturas: LOD, del inglés limit of detection; LOQ, del inglés limit of quantification; CV, coeficiente de variación. Nota: en la tabla se recogen únicamente los ácidos grasos detectados.

- La linealidad del método analítico consiste en la preparación e inyección de soluciones patrón de concentración creciente dentro de un intervalo amplio que cubra el rango analítico esperado del ensayo. La respuesta debe ser lineal en relación a las concentraciones de patrones y, por tanto, en las curvas de calibración obtenidas, el coeficiente de correlación (r²) debe ser próximo a 1.

- En cuanto a la sensibilidad del método, se especificó el límite de detección (LOD, del inglés, *Limit Of Detection*) que determina la menor concentración de analito que puede ser detectada en una muestra sin que pueda ser cuantificada y, el límite de cuantificación (LOQ, del inglés, *Limit Of Quantification*) que indica la concentración mínima de analito que se puede determinar y cuantificar con un nivel de precisión aceptable. Para calcular el LOD, se analizaron 10 blancos y se calculó la desviación estándar de la respuesta de fondo, la cual fue multiplicada por 3 para proporcionar una estimación del LOD y, el LOQ corresponde al punto más bajo de la recta de calibración que mantiene la linealidad.
- La precisión del método expresa la concordancia que existe entre un conjunto de resultados obtenidos mediante la determinación de un analito y aplicando varias veces un mismo método analítico de medida. La precisión suele expresarse en términos de coeficiente de variación. Para su cálculo, se realizaron 5 determinaciones de 20 muestras con concentraciones diferentes: 10 muestras se inyectaron consecutivamente en el cromatógrafo el primer día (muestras analizadas bajo idénticas condiciones determinan la repetitividad o precisión *intra-day* del método) y 10 muestras durante el siguiente día (muestras analizadas bajo diferentes condiciones determinan la reproducibilidad o precisión *inter-day* del método empleado).

3.2. Determinación de ácidos grasos de cadena corta en suero por cromatografía líquida

Para la determinación de los 4 AG de cadena corta se puso a punto el protocolo de Zeng *et al.* [235]. En general, las muestras de suero se añadieron a la mezcla de patrón interno en metanol para precipitar las proteínas. A continuación, los sobrenadantes se mezclaron con agua, bencilhidroxilamina y N-(3-Dimetilaminopropilo)-N'-etilcarbodiimida para obtener los derivados de los AGCC. Los derivados de AGCC se purificaron mediante una extracción líquido-líquido utilizando éter dietílico y se analizaron por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, del inglés *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) acoplada en tándem a espectrometría de masas (MS).

3.2.1. Reactivos y patrones

- Agua Milli-Q (Millipore, Burlington, MA, EE.UU).
- Metanol UHPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 2-Propanol UHPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido fórmico UHPLC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Formiato de amonio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Éter dietílico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- O-Bencilhidroxilamina (BHA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

- Acetato de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Propionato de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Butirato de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Isobutirato (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).
- Mezcla patrón interno: acetato de sodio $^{13}\text{C}_2$ (CortecNet, Voisins-le-Bretonneux, Francia), propionato d_6 y butirato de sodio $^{13}\text{C}_2$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

3.2.2. Instrumentación

Se empleó la siguiente instrumentación:

- Equipo: cromatógrafo líquido de ultra alta resolución de la serie 1290 Infinity II acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de la serie 6470 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU).
- Columna analítica: Kinetex Polar C18, 2.6 μm 2.1 x 100 mm (Phenomenex LTD., Torrance, CA, EE. UU.)
- Plataforma automatizada de manejo de líquidos serie Bravo (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU).
- Centrífuga tipo Mikro 200 Benchtop (Hettich Lab, Tuttlingen, Alemania).
- Agitador tipo IKA Vórtex Stirrer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU).
- Sistema centrífugo de concentración con vacío SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU).

3.2.3. Procedimiento experimental

La preparación de las muestras se basó en el protocolo de Zeng, et al. [235] para obtener derivados volátiles de AGCC. La separación cromatográfica se realizó con una elución en gradiente utilizando una fase móvil ternaria que contenía agua, metanol e isopropanol con formiato de amonio en una columna Kinetex Polar C18 (2,6 μm 2,1 x 100 mm). El caudal fue de 0,40 mL/min con la temperatura de la columna a 45°C. El espectrómetro de masas funcionó con ionización por electrospray positivo (ESI). Por tanto, los analitos o AGCC fueron ionizados por ESI y su detección se realizó en modo monitorización de reacción múltiple.

3.2.4. Cuantificación y validación del método analítico

La identificación de los derivados de los AGCC se realizó comparando sus tiempos de retención con aquellos de la mezcla patrón. La cuantificación se realizó por normalización, expresando los valores cuantitativamente (en $\mu\text{mol/L}$) y en cantidades relativas, es decir, en porcentajes (% de un AG con respecto al % del total de ácidos grasos detectados). Se empleó el programa Agilent MassHunter® B.06 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) para el análisis de los resultados.

Como se ha comentado anteriormente, para la validación del método HUPLC-MS/MS también se determinaron la linealidad, la sensibilidad (límites de detección y cuantificación) y la precisión (repetitividad y reproducibilidad) de la misma forma que para el método GC-MS (**Tabla 12**).

Tabla 12. Validación del método de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en muestras de suero.

Ácidos grasos	Rango analítico (μmol/L)	Sensibilidad		Precisión (CV%)		Linealidad (Curva de Calibración)	
		LOQ (μmol/L)	LOD (μmol/L)	Intra-day	Inter-day	Ecuación	r ²
AGCC							
Ácido Acético (C2:0)	0,011 – 1828	0,011	0,003	4,9	11,1	y = 0,32x + 1,067	0,998
Ácido Propiónico (C3:0)	0,004 – 101	0,004	0,001	8,8	15,2	y = 0,27x + 0,051	0,999
Ácido Isobutírico (C4:0)	0,005 – 85	0,005	0,002	4,3	9,8	y = 0,33x + 0,006	0,997
Ácido Butírico (C4:0)	0,005 – 68	0,005	0,002	4,3	10,5	y = 0,37x + 0,007	0,999

Abreviaturas: LOD, del inglés limit of detection; LOQ, del inglés limit of quantification; CV, coeficiente de variación.

3.3. Determinación de valores de referencia biológicos y estimación de los intervalos correspondientes en nuestra cohorte de mujeres embarazadas

Según las directrices internacionales [186], la producción de valores de referencia asociados a la salud y la posterior estimación del intervalo de referencia para un determinado analito se deben llevar a cabo de acuerdo con un protocolo bien definido. En este estudio, para la evaluación del estado nutricional general de los AG, se determinaron los intervalos de referencia para un nuevo analito según las directrices *EP28-A3c: Definición, establecimiento y verificación de intervalos de referencia en el laboratorio clínico* del CLSI [187]. Este protocolo consistió en:

1. Enumerar los factores causantes de variaciones biológicas y analíticas (datos obtenidos generalmente a partir de la literatura). En este estudio, al tratarse de un analito que no se ha descrito en una población concreta como es la de mujeres embarazadas, la bibliografía no resultó útil y, por tanto, se requirió de nuevas investigaciones para establecer dichos factores. Este punto en cuestión es uno de los objetivos de este proyecto de tesis.
2. Determinar los criterios de selección (inclusión y exclusión) y elaborar un cuestionario adecuado diseñado para revelar estos criterios en los potenciales individuos de referencia (por ejemplo, **Anexo 1 y 2**).
3. Elaborar un documento de CI por escrito y hacerlo firmar por las participantes seleccionadas.
4. Clasificar a los individuos de referencia basándonos en los datos obtenidos del cuestionario y evaluación del estado de salud.
5. Excluir a los individuos de la muestra de referencia basándonos en los criterios predeterminados de selección y un estado de salud inadecuado.

6. Establecer el número apropiado de individuos de referencia teniendo en cuenta el tipo de distribución de los valores (normal o no) e intervalo de confianza (90% o 95%) que se espera establecer.
 - a. En caso de tratarse de valores que siguen una distribución Gaussiana, se usa un método estadístico paramétrico que requiere un mínimo de 40 individuos de referencia por grupo homogéneo (mismo sexo, rango de edad u otra subclase que se quiera determinar).
 - b. Si se usa un método no paramétrico, no es necesario asumir ninguna distribución subyacente en los valores obtenidos y se recomienda un tamaño muestral de 120 individuos de referencia por grupo homogéneo. En general se recomienda este supuesto como el mejor método para establecer valores de referencia [185] y es el que se utilizó en el presente proyecto.
7. Preparar a los individuos seleccionados para la recogida de muestra. En este estudio, siendo una extracción de sangre periférica, se informó a las participantes de tener la precaución de estar en ayuno.
8. Recoger y procesar las muestras de sangre según los protocolos normalmente utilizados por el laboratorio clínico. En este estudio, se basaron en los procedimientos de David, *et al.* [234] y Zeng, *et al.* [235].
9. Recopilar y comprobar los valores de referencia. Identificar posibles errores y/o valores atípicos.
10. Analizar los valores de referencia: seleccionar un método estadístico dependiendo de la distribución de los valores y calcular los límites de referencia. Para la mayoría de los analitos, los límites de referencia biológicos son los valores extremos del intervalo de referencia que engloban normalmente el 95% central de los valores. Por tanto, los límites inferior y superior se estiman como los percentiles 2,5 y 97,5, respectivamente.
11. Documentar todos los pasos y procedimientos seguidos.

4. ANALISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas fueron expresadas como media y desviación estándar (DS) y las variables cualitativas como porcentajes (%). En lo referente a los AG, tanto los AG de cadena corta como los de cadena media-larga (AGS, AGMI y AGPI), se expresaron en unidades de concentración absolutas ($\mu\text{mol/L}$) o relativas (porcentaje de un AG con respecto al total de AG analizados). También se determinó el rango, la media \pm DS y los percentiles (del P_5 al P_{95}) de la concentración sérica del conjunto de AG durante el primer y tercer trimestre de embarazo.

Además de analizar los valores individuales de los AG, se calculó el conjunto de AGS como la suma total de los AGS individuales (total AGS = C:12 + C:14 + C:16 + C18:0), el conjunto de AGMI totales (total AGMI= C16:1n-7 + C18:1n-9), el conjunto de AGPI n-6 totales (total n-6 = C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6) y el conjunto de AGPI n-3 totales (total n-3 = C20:5n-3 + C22:6n-3). También se calcularon algunos índices como la relación entre los AGPI n-6 y n-3 (n-6 total/n-3 total) y el índice de ácidos grasos esenciales (AGE) (suma de los AGE (AGPI n-3 y n-6)/ suma de los AG no esenciales (AG n-7 y n-9)) que refleja el estado general de los AGE.

Con respecto a los valores obtenidos de AG, se utilizó el análisis de puntuación o *score-z* para detectar la presencia de valores atípicos [236]. Según la bibliografía consultada, un valor absoluto de *score-z* superior o inferior a 3,29 se considera un valor atípico cuando el tamaño de la muestra es >100 [237].

Se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas: la *t* de *Student* y ANOVA para comparar las variables analizadas entre los diferentes trimestres de embarazo, según las características de las variables; la correlación de Pearson para correlacionar las concentraciones absolutas y relativas de AG en suero materno; y, se realizaron modelos multivariantes de regresión lineal múltiple para analizar el efecto de los factores maternos sobre las concentraciones de AG en suero mediante el método ENTER. En estas regresiones se incluyeron las siguientes variables de ajuste: edad materna (<25, 25-29, 30 años), paridad (primípara, multípara), IMC inicial (peso normal, sobrepeso u obesidad según los kg/m²), aumento de peso gestacional o ganancia gestacional (insuficiente, adecuado, excesivo según los kg/m²), clase social (baja, media o alta), fumar durante el embarazo (no, sí), consumo de alcohol (no, sí), actividad física (baja, moderada o alta medida en METs/min/semana), puntuación del índice de calidad de la dieta (baja, moderada o alta) y el consumo de alimentos (pescado y marisco, frutos secos, carne roja y procesada, carne magra, huevos, bollería y aceite). Este estudio procede de un ensayo clínico con suplementación de hierro durante la gestación, por lo cual, los modelos fueron ajustados por esta variable.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SPSS 25.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) y Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.). Un *p valor* < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. PUBLICACIÓN 1. Maternal factors associated with levels of fatty acids, specifically n-3 PUFA during pregnancy: ECLIPSES study.

Estefania Aparicio*, Carla Martín-Grau*, Cristina Bedmar, Núria Serrat Orus, Josep Basora, Victoria Arija and The ECLIPSES Study Group. Maternal factors associated with levels of fatty acids, specifically n-3 PUFA during pregnancy: ECLIPSES study. *Nutrients*, 2021, 13 (2), 317 (doi: 10.3390/nu13020317) [238].

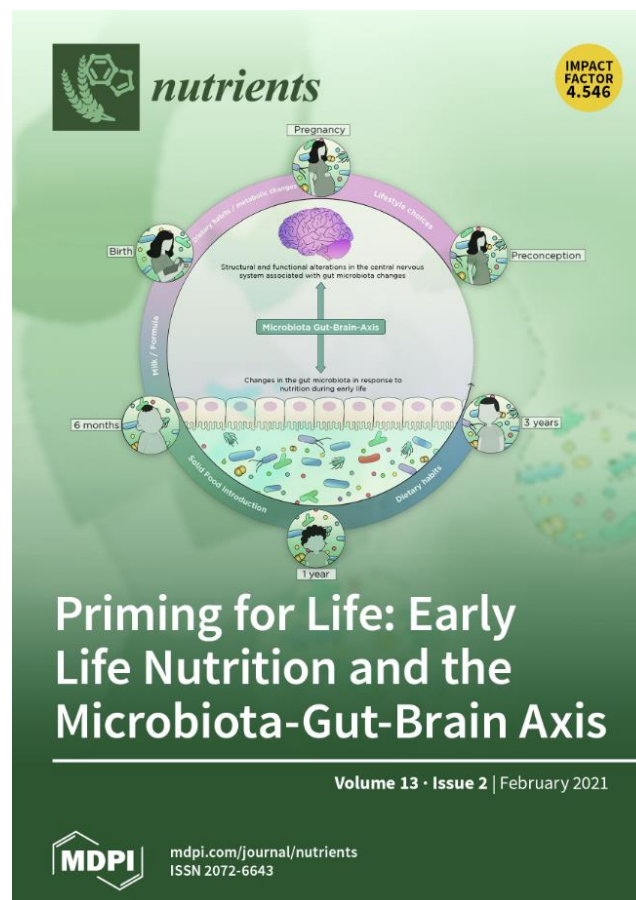
*Coautores.

Tipo de publicación: artículo científico.

Estado: publicado en enero de 2021.

Métricas de la revista *Nutrients*:

- Factor de impacto: 6,706 (según JCR, del inglés *Journal Citation Report*).
- Categoría: en el primer cuartil (Q1) en *Nutrition & Dietetics y Food Science*.





Article

Maternal Factors Associated with Levels of Fatty Acids, Specifically n-3 PUFA during Pregnancy: ECLIPSES Study

Estefania Aparicio ^{1,2,†}, Carla Martín-Grau ^{1,3,†}, Cristina Bedmar ^{1,2}, Núria Serrat Orus ³, Josep Basora ^{4,5}, Victoria Arija ^{1,2,4,*} and The ECLIPSES Study Group [‡]

¹ Nutrition and Public Health Unit, Research Group on Nutrition and Mental Health (NUTRISAM), Faculty of Medicine and Health Science, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Spain; estefania.aparicio@urv.cat (E.A.); cgmartin.hj23.ics@gencat.cat (C.M.-G.); cristina.bedmar@urv.cat (C.B.)

² Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, 43003 Tarragona, Spain

³ Clinical Chemistry Laboratory, Catalan Institute of Health (ICS)-Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre, Joan XXIII University Hospital in Tarragona, 43005 Tarragona, Spain; nserrat.tarte.ics@gencat.cat

⁴ Tarragona-Reus Research Support Unit, Jordi Gol Primary Care Research Institute, 43003 Tarragona, Spain; jbasora.tarte.ics@gencat.cat

⁵ CIBERobn (Center for Biomedical Research in Physiopathology of Obesity and Nutrition), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: victoria.arija@urv.cat; Tel.: +34-977759334

† These authors contributed equally to this work.

‡ The ECLIPSES Study Group is provided in the Acknowledgments.

Citation: Aparicio, E.; Martín-Grau, C.; Bedmar, C.; Serrat, N.; Basora, J.; Arija, V.; Group, T.E.S. Maternal Factors Associated to the Levels of Fatty Acids and Specifically n-3 PUFA during Pregnancy. ECLIPSES Study. *Nutrients* **2021**, *13*, 317. <https://doi.org/10.3390/nu13020317>

Received: 15 December 2020

Accepted: 20 January 2021

Published: 22 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: An optimal fatty acid (FA) profile during pregnancy, especially docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), is essential for the health of the mother and child. Our aim was to identify the socioeconomic and maternal lifestyle factors associated with serum FA concentration in pregnant women. A longitudinal study was conducted on 479 pregnant women, who were assessed during the first (T1) and third (T3) trimesters of pregnancy. Data on maternal characteristics, food consumption, and lifestyle were collected. Serum FA concentrations were analysed by a gas chromatography–mass spectrometry combination. The multiple linear regression showed that high educational level and older age were significantly associated with higher EPA and DHA concentrations and lower values of n-6/n-3 and arachidonic acid (AA)/EPA in T1 and/or T3. Regarding diet—fish and seafood consumption increased EPA concentration and reduced n-6/n-3 and AA/EPA values in both trimesters, whereas its consumption increased DHA concentration only in T1. Smoking was associated with lower DHA concentration in T1 and higher values of n-6/n-3 ratio in both trimester. Overweight and obesity were associated with higher values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio in T1. A statistically non-significant association was observed with saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA). In conclusion, high educational levels, older age, fish, seafood consumption, and/or non-smoking, are factors that influence better omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) profile in both trimesters of pregnancy. Further research is needed to go in-depth into these findings and their health consequences.

Keywords: maternal fatty acid status; polyunsaturated fatty acids; omega-3; pregnancy; lifestyle

1. Introduction

Maternal nutritional status has a crucial role in the outcome of mother and child [1–3]. An optimal long-chain n-3 fatty acid status during pregnancy is of particular benefit for cognitive and visual development of the foetus [4–6], and is linked to a reduction in the numbers of preterm births and low birth weights, and a reduced risk of preeclampsia and postpartum depression for the mother [1,7,8]. Furthermore, although linoleic acid

(LA), omega-6 polyunsaturated fatty acid (n-6 PUFA), is an essential fatty acid, it is suggested that an adequate balance with n-3 is necessary since high levels of n-6 before or during pregnancy may have negative effects on foetal development and may influence the overall health of offspring in later stages of life [9,10].

Nevertheless, the maternal concentration of polyunsaturated fatty acid (PUFA) varies according to different factors. It is known that the maternal diet is one contribution to fatty acid storage [8,11,12] although it could be affected by other factors that have been less studied. Some studies suggest that several factors, such as age, socioeconomic status, education, smoking, and levels of physical activity can all affect fatty acid levels in pregnant women [8,12–17], although findings differ. For instance, Hoge et al. [13], in a cohort of 112 pregnant women in Belgium, found nationally that, age, educational level, smoking status, physical activity, and docosahexaenoic acid (DHA) supplement intake, all impacted omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) levels in erythrocytes in the first trimester. Similarly, Gellert et al. [14], in a cohort of 213 pregnant women in Germany, found that smoking impacted negatively on omega-3 index in late pregnancy, although this was not found to be linked with age or region. Markus et al. [8] did not find any association with age in a sample of 118 pregnant women in Norway, but found a link between DHA erythrocytes and fish consumption and educational level. Moreover, Pinto et al. [12] reported from Brazil that age, low income, and weekly fish consumption was a predictor of better n-3 serum concentrations in plasma phospholipids. In addition, a recent systematic review assessed the influence of maternal characteristics on DHA and other polyunsaturated fatty acids during pregnancy [18]. That study identified educational level, maternal age, fish consumption, smoking, alcohol intake, and fatty acid desaturase genotype to be associated with omega-3 maternal status. However, not all studies consider all factors together, and have also been carried out at different moments of the pregnancy. Inconsistent results have been reported with n-6 PUFA and maternal factors [8,12,13,18], and to our knowledge, no study has assessed the link between saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) in a larger sample size than the present study. Consequently, evidence is scarce about the effect of maternal factors on the serum profile of FA as a whole.

Considering the above factors, a better understanding of the factors associated with an inadequate level of fatty acids throughout the pregnancy period would allow population groups at risk to be targeted in order to recommend improvements to their lifestyle and dietary needs. Thus, the aim of this study was to assess the association between the socioeconomic and maternal lifestyle factors early in pregnancy and the maternal fatty acid profile (saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids) from a sample of healthy pregnant women in a European Mediterranean country.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Population

A prospective study of a cohort of pregnant women who were followed from the first trimester (T1) (around the 12th gestational week) to the third trimester (T3) (the 36th gestational week). The women were recruited from the ECLIPSES study [19,20], which is a randomized triple-blind clinical trial of different doses of iron supplementation (20 mg/day, 40 mg/day 80 mg/day), registered in ClinicalTrials.gov identification number NCT03196882, and in the European Union (EU) Clinical Trial Register, EUCTR-2012-005480-28. This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Institute for Primary Care Research (IDIAP) and the Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV). All participants signed an informed consent. Healthy, pregnant women were recruited during their first prenatal visits at 12 sexual and reproductive health care services (ASSIR) of the Catalan Institute of Health (ICS) in Tarragona, Spain.

Inclusion criteria: healthy woman older than 18 years at ≤ 12 weeks of gestation, able to understand the local languages (Spanish or Catalan) and the characteristics of the study, and signed the informed consent forms.

Exclusion criteria: multiple pregnancies, taking iron supplements before week 12 of pregnancy, hypersensitivity to egg protein, previous severe disease (immunosuppression), or any chronic disease that could affect nutritional status (cancer, diabetes, malabsorption, or liver disease). Fatty acid biochemical status was analysed in a total population study of 479 pregnant women.

2.2. Data Collection

Data were collected during T1 and T3 by midwives and nutritionists. The medical history and socioeconomic data obtained were maternal age, ethnicity, education level (primary, secondary, and university studies), estimated date of delivery, planned pregnancy, clinical and obstetric history, and taking multivitamins and micronutrient supplements. Socioeconomic level was classified as low, middle, or high, according to the Catalan classification of occupations [21]. Lifestyle habits were recorded, including smoking habit and alcohol intake, and physical activity levels were assessed by means of the short version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ-S) [22]. Women were classified as sedentary (including sedentary and irregularly active women) or active (including active and very active women), according to the modified Craig algorithm [22]. In addition, anthropometric measurements obtained were height (cm) and weight (kg), and body mass index (BMI) was calculated at week 12. Thus, women were classified as normal weight ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) and overweight ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$), according to the World Health Organization (WHO) criteria [23].

Diet was assessed using a self-administered food frequency questionnaire (FFQ) validated for our population [24]. The questionnaire contains 45 food items and reports on the usual food consumption per week or per month. The food items were classified as fish and seafood, red and processed meat, lean meat, fruit (fresh fruit, preserved fruit), vegetables (salads and vegetables), dairy products, legumes, cereals (breakfast cereals, bread, pasta, and rice), bakery (biscuits, pastries), nuts, sweets (sugar and chocolates), sweetened beverages, alcoholic drinks. Fat consumption, especially oil olive, took into account the amount of oil used for cooking or salad dressings. Food consumption was calculated per gram per day. The consumption of those foods relevant due to their fatty acid content (such as fish and seafood, nuts, red and processed meat, lean meat, eggs, bakery and oil) were included in the analysis. Diet quality was assessed using the Relative Mediterranean Diet Score [25,26], ranging from 0 points (low quality diet) to 18 points (high quality diet). Further information can be found in our previous paper [27]. Women were then classified into two categories: low-medium diet quality (score from 0 to 10) and high diet quality (score from 11 to 18).

2.3. Sample Collection and Processing of Biochemical Samples of Fatty Acids, and Extraction, Transfer and Storage of Biological Samples

Venous blood samples were collected at weeks 12 and 36 of pregnancy, after fasting, into 7.5 mL tubes without an anticoagulant, and remained without mixing for 30 min at room temperature so as to allow coagulation. The serum was separated by centrifugation, distributed into aliquots of 500 μL and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until assays. Samples were stored in the BioBank and thawed at the end of the clinical study and processed simultaneously to minimize inter-batch variation [19].

Medium- and long-chain fatty acids (saturated-, mono- and polyunsaturated) were measured by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) combination using the 7890A GC coupled to QqQ 7000 Series[®] (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) after their derivation to methyl ester (FAMES) due to their higher volatility [28]. Briefly, a 50 μL plasma sample was mixed with internal standard (IS) solution (Myristic d-27 acid, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), chloroform and methanolic hydrochloric acid and

incubated at 80 °C for 2 h. Obtained FAMES were extracted by a liquid–liquid extraction using hexane and were then injected into the GC-MS system. Chromatographic analysis was based on David et al. [28] to determine the 36 FAMES included in the Food Industry FAME Mix (Restek Corporation, Pennsylvania, USA). FAMES were separated into a high-polarity column (100 m × 250 µm × 0.25 µm) (HP-88 column, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) using a temperature program of between 140 °C and 240 °C at 1 mL/min using helium as the carrier gas. Ionisation was carried out by electronic impact (70 eV) and mass analyser was operated in Selected Ion Monitoring mode (SIM). The CG-MS system was controlled by the Agilent MassHunter Workstation.

A total of 36 fatty acids were analysed, but only a selection of them is presented, such as the sum of the total saturated (total SFA = C:12 + C:14 + C:16 + C18:0), total monounsaturated (total MUFA = C16:1n-7 + C18:1n-9), total n-6 polyunsaturated (total n-6 PUFA = C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6) and total n-3 polyunsaturated (total n-3 PUFA = C20:5n-3 + C22:6n-3) fatty acids; further, the ratio of the n-6 to n-3 fatty acids (total n-6 PUFA/total n-3 PUFA) are also presented.

2.4. Statistical Analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation (SD) or percentage according to the variable. In this study, z-score analysis was used to detect outlier value in this population data [29]. An absolute value of ±3.29 is the standard value used to identify outliers when sample size is >100. In other words, any z-score above or below ±3.29 is considered as an outlier case [30]. Means between groups were compared using Student’s t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) adjusted by Bonferroni. Multiple linear regressions were performed in order to identify the association of maternal factors, assessed in T1 and T3, with fatty acid concentration in T1 and T3, respectively. All multiple linear regressions models were performed using the ENTER method and were adjusted for maternal factors, such as educational level, maternal age, BMI, smoking status, alcohol consumption, physical activity, diet quality, food consumption (fish and seafood, nuts, red and processed meat, lean meat, eggs, bakery, and oil). In addition, the models were adjusted for intervention group (iron supplementation of 40, 20, or 80 mg/day). Data were processed using the statistical software package SPSS version 25.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Participants’ Characteristics

General characteristics of the pregnant women are given in Table 1. Most women had a medium educational level (38.3%) and were employed (87.1%). The mean maternal age was 30.6 ± 5.01 years. The participants reported that 15.3% smoked at the beginning of their pregnancy and 92% were rated as sedentary by the IPAQ-S questionnaire. The mean score of diet quality was 9.7 (±2.6) points. In addition, 67.9% of women reported taking multivitamin and mineral supplementation, of which only one contained DHA or fish oil, and was only consumed by one woman.

Table 1. Sociodemographic and lifestyle of pregnant women at baseline and fatty acid biochemical profile at first trimester.

General Characteristics	Mean (SD)
Maternal age (years) ^a (n = 461)	30.6 ± 5.01
Age group (%)	
<25 years old	15.8
25–30 years old	31.2
>30 years old	52.9
BMI (kg/m ²) (%) (n = 455)	

<25	62.2
25–30	25.3
≥30	12.5
Maternal educational level (%) (<i>n</i> = 478)	
Low (primary or less)	30.1
Medium (secondary)	38.3
High (university or more)	31.6
Occupation (%) (<i>n</i> = 459)	
Student	2.4
Employed	87.1
Unemployed	10.5
Smoking status (%) (<i>n</i> = 478)	
Smoker	15.3
Non-Smoker or Ex-Smoker	84.7
Maternal alcohol consumption (%) (<i>n</i> = 445)	14
Physical Activity (%) (<i>n</i> = 450)	
Active	8
Sedentary	92
Diet Quality (score)	9.7 (2.6)
Food groups	
Fish and seafood consumption (g/day)	45.2 (30.5)
Lean meat (g/day)	39.4 (24.7)
Red and processed meat (g/day)	57.5 (32.3)
Eggs (g/day)	17.4 (11.3)
Bakery (g/day)	33.7 (28.2)
Nuts (g/day)	3.1 (3.8)
Oil (g/day)	63.8 (15.1)

^a Values are expressed as mean and standard deviation (SD) or %. Abbreviation: BMI, body mass index.

3.2. Influence of Maternal Factors on Fatty Acid Serum Profiles

Regarding maternal factors shown in Table 2, some of them were related to SFA, n-6 PUFA and MUFA. Overweight or obese women showed a significantly higher concentration of total FAs, specifically SFA and arachidonic acid (AA), total n-6 PUFA and n-6/n-3 ratio in T1, and only SFA in T3. Women with a higher educational level had a significantly greater concentration of total n-3 PUFA (eicosapentaenoic acid (EPA) + DHA) in serum and significantly lower values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio compared to women with low and medium educational level in both trimesters of pregnancy. Moreover, older women (34.4 ± 2.7 years old) had a significantly higher concentration of total n-3 PUFA in serum and lower values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio in both trimesters. However, only during T3, older women had a significantly greater concentration of total MUFA compared to younger women. Depending on smoking status, the following differences were observed: women who smoked had a significantly lower concentration of total n-3 PUFA, EPA, and DHA in T1; smokers had a significantly higher concentration of total SFA, total n-6 LA, AA, and total FAs in T3 compared to non-smokers. Moreover, smokers had a higher value of n-6/n-3 ratio in both trimesters. However, there was no observed association with maternal alcohol consumption.

Table 2. Fatty acids serum profile during the first (T1) and third (T3) trimester of pregnancy according to maternal factors.

Fatty Acids (µmol/L)		Physical Activity				BMI		p-Value ^{c,d}
		All Woman (n = 479)	Active ^a (n = 35)	Sedentary ^b (n = 404)	p-Value ^{a,b}	Normal Weight (<25 kg/m ²) ^c (n = 283)	Overweight and Obesity (>25kg/m ²) ^d (n = 172)	
		Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)		Mean (SD)	Mean (SD)	
Total SFA	1 T	3765.31 (1614.17)	3793.8 (1829.6)	3740.1 (1530.1)	0.849	3647.5 (1480.4)	4131.3 (1897.4)	0.006
	3 T	9625.65 (4574.33)	9590.3 (4656.8)	9641.2 (4512.4)	0.950	9299.9 (4527.0)	10,380.9 (4637.3)	0.017
Total MUFA	1 T	1634.54 (500.21)	1652.7 (678.1)	1631.3 (467.3)	0.806	1607.8 (485.5)	1734.6(549.3)	0.013
	3 T	3116.39 (1330.86)	3114.7 (1550.3)	3140.5 (1312.9)	0.913	3038.8 (1228.4)	3275.3 (1462.9)	0.084
n-6 PUFA								
LA (C18:2n-6)	1 T	3355.67 (1230.19)	3467.6 (1327.0)	3337.1 (1199.4)	0.546	3309.9 (1210.9)	3537.9 (1280.5)	0.064
	3 T	6321.14 (2786.02)	6717.1 (3482.0)	6239.9 (2629.7)	0.428	6271.3 (2869.6)	6475.0 (2532.5)	0.451
AA (C20:4n-6)	1 T	830.82 ± 276.15	780.4 (262.4)	838.1 (281.7)	0.250	817.3 (262.1)	889.8 (296.7)	0.008
	3 T	722.63 ± 220.05	734.6 (272.8)	723.6 (216.3)	0.815	709.1 (206.1)	750.6 (235.2)	0.062
Total n-6 PUFA	1 T	4433.77 ± 1469.64	4495.1 (1648.1)	4410.8 (1424.7)	0.744	4358.2 (1445.1)	46.70.3 (1485.9)	0.032
	3 T	7278.06 ± 2919.04	7431.4 (3411.6)	7220.8 (2784.3)	0.725	7187.0 (2960.1)	7513.1 (2711.3)	0.248
n-3 PUFA								
EPA (C20:5n-3)	1 T	35.03 (23.95)	28.7 (16.0)	36.8 (25.9)	0.010	36.1 (25.5)	35.7 (24.2)	0.879
	3 T	23.88 (16.93)	20.5 (16.5)	24.2 (16.9)	0.211	23.1 (16.1)	24.1 (17.2)	0.513
DHA (C22:6n-3)	1 T	240.28 (73.47)	221.3 (72.3)	241.6 (73.5)	0.128	239.7 (72.8)	248.1 (78.9)	0.253
	3 T	236.60 (71.77)	229.6 (80.6)	237.6 (71.0)	0.525	233.9 (69.0)	237.2 (72.2)	0.631
Total n-3 PUFA	1 T	276.98 (94.07)	258.0 (97.5)	279.1 (94.2)	0.212	277.0 (93.7)	287.4 (102.8)	0.277
	3 T	260.52 (84.33)	253.0 (91.6)	261.9 (84.5)	0.549	257.2 (80.6)	261.8 (86.0)	0.574
Total FAs	1 T	10,073.15 (3349.07)	10,462.6 (4446.0)	10,038.2 (3175.5)	0.589	9781.9 (3045.6)	10,888.1 (3848.4)	0.002
	3 T	20,480.82 (8335.23)	20,792.6 (9549.0)	20,406.6 (8054.6)	0.792	19,856.2 (8006.0)	21,814.7 (8638.8)	0.017
n-6/n-3 ratio	1 T	16.80 (5.19)	17.9 (4.6)	16.7 (5.2)	0.182	16.5 (5.0)	17.7 (5.5)	0.016
	3 T	29.29 (11.52)	30.9 (11.9)	29.2 (11.4)	0.408	26.3 (11.6)	30.4 (11.6)	0.360
AA/EPA ratio	1 T	31.77 (19.08)	35.6 (21.1)	31.2 (18.7)	0.184	31.0 (19.3)	33.4 (18.8)	0.197
	3 T	44.09 (30.61)	52.1 (33.4)	44.3 (31.6)	0.158	45.2 (32.4)	46.9 (31.8)	0.581

Fatty Acids		Maternal Smoking Status			p-Value ^{ef}	Maternal Alcohol Consumption		
		Smoker ^e (n = 70) Mean (SD)	Non-Smoker or Ex-Smoker ^f (n = 390) Mean (SD)	No ^g (n = 380) Mean (SD)		Yes ^h (n = 65) Mean (SD)	p-Value ^{gh}	
Total SFA	1 T	3896.7 (1840.4)	3795.3 (1616.2)	0.635	3846.7 (1721.4)	3552.7 (1248.4)	0.192	
	3 T	10,992.9 (5035.4)	9421.6(4438.9)	0.008	9756.5 (4684.2)	9735.7 (4291.2)		
Total MUFA	1 T	1592.1 (483.6)	4737.4 (1514.7)	0.309	1661.0 (526.9)	1596.0 (455.2)	0.355	
	3 T	3369.1 (1239.0)	3086.8(1349.4)	0.102	3142.1 (1345.6)	3139.6 (1251.1)		
n-6 PUFA								
LA (C18:2n-6)	1 T	3378.5 (1289.9)	3374.4 (1226.1)	0.980	3407.8 (1251.6)	3282.8 (1191.9)	0.459	
	3 T	7108.4 (2856.9)	6185.8 (2709.2)	0.010	6368.9 (2777.7)	6540.3 (2689.0)		
AA (C20:4n-6)	1 T	812.5 (278.5)	842.0(278.3)	0.411	848.6 (278.0)	811.8 (240.3)	0.321	
	3 T	781.7 (251.8)	713.9(212.3)	0.017	721.4 (218.1)	758.4 (223.9)		
Total n-6 PUFA	1 T	4430.2 (1518.5)	4450.7(1461.5)	0.915	4495.4 (1489.0)	4320.3 (1374.0)	0.356	
	3 T	8026.8 (2904.0)	7155.0 (2856.1)	0.020	7320.8 (2904.8)	7552.7 (2827.1)		
n-3 PUFA								
EPA (C20:5n-3)	1 T	29.9 (20.5)	37.1(25.6)	0.010	35.9 (24.8)	38.3 (27.4)	0.477	
	3 T	21.8 (16.3)	24.1(16.8)	0.278	23.5 (16.3)	23.9 (18.2)		
DHA (C22:6n-3)	1 T	212.0 (67.3)	247.4 (74.2)	<0.001	244.0 (74.5)	235.7 (73.9)	0.415	
	3 T	225.3 (69.3)	237.7(72.1)	0.181	233.5 (68.9)	243.8 (82.8)		
Total n-3 PUFA	1 T	241.9 (80.5)	287.0(97.1)	<0.001	282.1 (96.6)	274.1 (94.2)	0.538	
	3 T	247.1 (81.1)	262.3(85.4)	0.163	257.0 (81.0)	268.8 (98.0)		
Total FAs	1 T	9957.3 (3289.8)	10,183.4(3417.6)	0.611	10,235.9 (3489.2)	99,743.1 (2884.8)	0.287	
	3 T	22,811.9 (8668.9)	20,111.4(8147.6)	0.012	20,663.8 (8442.9)	20,952.8 (7776.3)		
n-6/n-3 ratio	1 T	19.5 (5.1)	16.4(5.1)	<0.001	16.9 (5.1)	16.6 (5.6)	0.650	
	3 T	34.9 (11.7)	28.6 (11.2)	<0.001	29.9 (11.6)	29.4 (11.2)		
LA/EPA ratio	1 T	36.1 (17.6)	31.0(19.3)	0.039	31.9 (19.1)	30.4 (19.3)	0.565	
	3 T	50.0 (31.2)	44.6(32.2)	0.195	45.9 (31.9)	45.2 (33.1)		
Fatty Acids		Educational Level			p-Value ^{i-k}	Age Group (Years)		
		Low ⁱ (n = 137)	Medium ^j (n = 175)	High ^k (n = 147)		<25 ^l (n = 55)	25-30 ^m (n = 153)	>30 ⁿ (n = 233)

		Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)		Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Total SFA	1 T	3874.1 (1749.7)	3855.9 (1732.5)	3698.3 (1450.3)	0.605	3563.0 (1597.9)	3784.0 (1741.0)	3920.5 (1625.2)	0.342
	3 T	10,292.9 (5143.4)	9364.9 (4260.0)	9400.1 (4277.2)	0.142	8759.2 (4260.8)	9446.6 (4490.7)	10,091.9 (4704.0)	0.104
Total MUFA	1 T	1620.1 (504.1)	1667.6 (539.5)	1655.8 (479.1)	0.707	1542.2 (484.3)	1620.8 (523.8)	1703.5 (508.4)	0.070
	3 T	2971.5 (1196.4)	3115.0 (1369.9)	3308.5 (1410.3)	0.102	2612.1 (1049.3)	3020.6 (1259.4)	3323.5 (1386.8)	0.001
n-6 PUFA									
LA (C18:2n-6)	1 T	3508.0 (1285.4)	3363.6 (1200.5)	3263.9 (1222.1)	0.249	3138.3 (1013.0)	3339.3 (1182.5)	3496.1 (1319.6)	0.132
	3 T	6637.6 (2698.6)	6439.7 (2871.8)	5886.9 (2604.5)	0.055	6334.4 (2834.4)	6372.2 (2730.3)	6338.7 (2740.4)	0.992
AA (C20:4n-6)	1 T	832.3 (252.5)	841.2 (306.5)	837.7 (266.4)	0.961	782.9 (271.7)	844.0 (261.7)	858.8 (287.9)	0.198
	3 T	748.9 (221.8)	714.4 (217.9)	712.9 (220.1)	0.287	683.1 (185.1)	730.8 (212.5)	733.1 (231.4)	0.287
Total n-6 PUFA	1 T	4603.5 (1501.6)	4418.9 (1453.0)	4336.4 (1453.6)	0.397	4122.7 (1251.0)	4439.0 (1428.2)	4589.3 (1539.3)	0.108
	3 T	7526.6 (2662.0)	7405.5 (3021.7)	6913.7 (2876.7)	0.156	7246.7 (2923.9)	7380.0 (2894.9)	7285.0 (2845.2)	0.935
n-3 PUFA									
EPA (C20:5n-3)	1 T	29.0 (19.4)	36.1 (25.3)	42.5 (27.8)	<0.0001	25.7 (22.7)	32.6 (24.2)	40.6 (25.1)	<0.0001
	3 T	19.6 (15.6)	23.4 (15.5)	28.1 (18.2)	<0.0001	14.8 (10.8)	23.0 (16.2)	25.9 (17.3)	<0.0001
DHA (C22:6n-3)	1 T	228.0 (70.0)	238.9 (71.8)	258.6 (78.2)	0.002	207.7 (57.7)	240.8 (79.5)	252.3 (73.4)	<0.0001
	3 T	221.4 (66.6)	238.6 (70.8)	246.5 (75.9)	0.009	199.7 (60.4)	232.1 (66.2)	245.6 (72.2)	<0.0001

Total n-3 PUFA	1 T	259.0 (87.2)	276.2 (90.8)	304.3 (105.1)	<0.0001	233.4 (73.2)	273.4 (98.3)	296.7 (97.5)	<0.0001
	3 T	241.0 (78.6)	262.5 (83.4)	275.5 (89.4)	0.002	215.1 (68.3)	256.7 (80.6)	271.0 (83.8)	<0.0001
Total FAs	1 T	10,307.0 (3389.4)	10,208.3 (3635.0)	9930.1 (3106.4)	0.623	9424.7 (3016.7)	9959.2 (3312.9)	10,538.9 (3524.7)	0.057
	3 T	20,891.2 (7860.5)	20,493.4 (8708.0)	20,207.8 (8177.2)	0.783	18,711.7 (6936.9)	20,099.0 (7990.0)	21,362.9 (8701.4)	0.066
n-6/n-3 ratio	1 T	18.7 (5.3)	17.2 (5.3)	14.7 (4.3)	<0.0001	18.4 (5.1)	17.6 (5.5)	16.2 (5.0)	0.005
	3 T	33.1 (11.4)	29.9 (12.4)	25.7 (9.2)	<0.0001	35.6 (12.7)	30.1 (11.6)	28.1 (10.9)	<0.0001
AA/EPA ratio	1 T	38.0 (20.0)	31.9 (18.8)	26.1 (16.9)	<0.0001	42.4 (24.1)	35.1 (19.6)	27.7 (16.4)	<0.0001
	3 T	58.8 (38.5)	43.5 (30.3)	35.2 (21.7)	<0.0001	64.5 (38.2)	47.7 (34.4)	40.7 (27.7)	<0.0001

Values are expressed as mean and standard deviation (SD). Abbreviation: BMI, body mass index; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acid; LA, Linoleic acid; AA, Arachidonic acid; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid; Total FAs, fatty acids = total SFA + total MUFA + total n-6 PUFA + total n-3 PUFA; n-6/n-3 ratio = total n-6 PUFA/ total n-3 PUFA. ^aActive; ^bSedentary; *p*-value ^{ab}, *p*-value between active and sedentary women. ^cNormal weight; ^dOverweight and obesity; *p*-value ^{cd}, *p*-value between normal weight (<25 kg/m²) and overweight and obesity (>25 kg/m²). ^eSmoker; ^fNon-smoker; *p*-value ^{ef}, *p*-value between smoker or non-smoker women. ^gNo-alcohol consumption; ^hYes-alcohol consumption; *p*-value ^{gh}, *p*-value between No-alcohol consumption and alcohol consumption. ⁱLow; ^jMedium; ^kHigh; *p*-value ^{ijk}, *p*-value between low, medium and high educational level. ^lAge less than 25 years-old; ^mAge between 25 and 30 years-old; ⁿAge more than 30 years-old; *p*-value ^{lmn}, *p*-value between age groups. Student's *t*-test was used for Physical activity, BMI, maternal smoking status and maternal alcohol consumption. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for educational level and age group.

Multiple linear regression models of the influence of maternal determinants on EPA, and DHA values and total n-3 FA are shown in Table 3 and n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio are described in Table 4. It can be observed that women of a high educational level and an age above 30 years had significantly higher levels of EPA in both trimesters of pregnancy. Likewise, EPA values were higher by fish and seafood consumption in both trimesters ($p < 0.05$). Moreover, high educational level, older age, and fish and seafood consumption is significantly associated with higher values of DHA in T1. Alternatively, smoking reduced the concentration of DHA to around 40 $\mu\text{mol/L}$ in T1 ($p < 0.05$). In T3, ages above 25 or 30 predicted higher values of DHA, although the model is not significant. In the same way, total n-3 is significantly higher in T1 at higher levels of education, age above 30 years and fish and seafood consumption, whereas it is lower for smokers (Table 3). In T3, only age between 25 and 30 years and older than 30 years is associated with higher values of total n-3 (Table 3). In addition, iron supplementation of 80 mg/day is associated with higher values of EPA, DHA, total n-3 in T1.

Regarding n-6/n-3 ratio and AA/EPA, high educational level in T1 and T3 reduces the n-6/n-3 ratio. On the other hand, medium and high educational level and age older than 25 or 30 decreased AA/EPA ratio in both trimesters (except for age group between 25 and 30 in T3). Moreover, fish and seafood consumption is associated with significantly lower values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA in both trimesters. As expected, smoking increased the n-6/n-3 ratio by around 2 and 4 points in T1 and T3, respectively. Moreover, overweight or obesity increased the n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio, while iron supplementation of 80 mg/day reduced AA/EPA ratio in T1 (Table 4). In addition, there was no statistically significant association between maternal factors and AA concentration (data not shown).

Table 3. Multiple linear regression of potential factors related to maternal serum polyunsaturated fatty acid composition in the first (T1) and third (3T) trimesters of pregnancy.

	Fatty Acids Serum Profile First Tri-			Fatty Acids Serum Profile Third Tri-		
	B	SE	p	B	SE	p
Eicosapentaenoic acid (EPA)						
Constant	25.13	7.86	0.002	16.46	6.84	0.017
Educational level						
Low	Ref	-	-	Ref	-	-
Medium	7.65	3.32	0.022	0.49	2.62	0.851
High	9.69	3.53	0.006	6.87	2.83	0.016
Age group						
<25 years	Ref	-	-	Ref	-	-
25–30 years	3.75	4.38	0.392	6.79	3.24	0.038
≥30 years	9.93	4.22	0.019	8.80	3.11	0.005
BMI (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥ 25 kg/m ²)	-1.21	2.80	0.665	0.82	2.60	0.751
Physical activity (0: sedentary, 1: active)	-9.58	4.51	0.035	-2.02	2.51	0.421
Smoking (0: non-smoke, 1: smoker)	-6.61	3.72	0.076	2.85	2.70	0.292
Maternal alcohol consumption (0: no, 1: yes)	-0.86	4.67	0.854	0.61	3.79	0.871
Fish and seafood consumption (g/day)	0.15	0.04	0.001	0.14	0.40	<0.001
Bakery consumption (g/day)	-0.1	0.04	0.037	-0.05	0.041	0.204
Intervention Group (iron supplementation dosage)						
40 mg/day	Ref	-	-	Ref	-	-

20 mg/day	1.70	3.72	0.648	-2.10	2.67	0.432
80 mg/day	7.97	3.07	0.010	-1.78	2.47	0.473
	$R^2_{CX100} = 10.3$	$F_{18,328} = 3.21$	$p < 0.001$	$R^2_{CX100} = 8.8$	$F_{18,234} = 2.25$	$p = 0.002$
Docosahexaenoic acid (DHA)						
Constant	212.64	22.29	<0.001	241.16	30.48	<0.001
Educational level						
Low	Ref	-	-	Ref	-	-
Medium	10.29	9.50	0.280	-2.09	11.06	0.850
High	22.45	10.01	0.026	11.54	12.04	0.339
Age group						
<25 years	Ref	-	-	Ref	-	-
25–30 years	19.46	12.53	0.121	29.46	13.73	0.033
>30 years	28.01	12.07	0.021	41.26	13.23	0.002
BMI (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥ 25 kg/m ²)	11.37	7.97	0.154	-4.65	10.77	0.666
Physical activity (0: sedentary, 1: active)	-20.06	13.10	0.127	-10.98	11.78	0.352
Smoking (0: non-smoke, 1: smoker)	-39.93	10.65	<0.001	-2.06	11.43	0.857
Maternal alcohol consumption (0: no, 1: yes)	-18.39	13.34	0.169	-5.11	16.08	0.751
Fish and seafood consumption (g/day)	0.34	0.13	0.011	0.223	0.172	0.195
Intervention Group (iron supplementation dosage)						
40 mg/day	Ref	-	-	Ref	-	-
20 mg/day	-3.57	10.65	0.738	-11.75	11.37	0.302
80 mg/day	22.46	8.66	0.010	-7.05	10.51	0.503
	$R^2_{CX100} = 10.20$	$F_{18,334} = 3.22$	$p < 0.001$	$R^2_{CX100} = 3.6$	$F_{18,236} = 1.52$	$p = 0.084$
Total n-3 PUFA						
Constant	240.59	28.99	<0.001	256.72	34.42	<0.001
Educational level						
Low	Ref	-	-	Ref	-	-
Medium	17.10	12.24	0.163	1.78	13.13	0.892
High	30.08	12.96	0.021	16.47	14.31	0.251
Age group						
<25 years	Ref	-	-	Ref	-	-
25–30 years	24.10	16.19	0.132	39.82	16.31	0.015
>30 years	41.49	15.58	0.008	51.88	15.71	0.001
BMI (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥ 25 kg/m ²)	10.66	10.28	0.301	-10.43	12.83	0.417
Physical activity (0: sedentary, 1: active)	-22.93	16.69	0.170	-18.41	12.53	0.143
Smoking (0: non-smoke, 1: smoker)	-48.75	13.75	<0.001	0.763	13.63	0.955
Maternal alcohol consumption (0: no, 1: yes)	-20.63	17.24	0.232	-4.01	19.15	0.834
Fish and seafood consumption (g/day)	0.489	0.175	0.006	0.35	0.20	0.086
Intervention Group (iron supplementation dosage)						
40 mg/day	Ref	-	-	Ref	-	-
20 mg/day	-3.17	13.75	0.817	-18.91	13.50	0.163
80 mg/day	30.37	11.21	0.007	-11.35	12.44	0.363
	$R^2_{CX100} = 11.00$	$F_{18,333} = 3.41$	$p < 0.001$	$R^2_{CX100} = 5.0$	$F_{18,236} = 1.74$	$p = 0.033$

B, unstandardised coefficient; SE, standard error. Ref, reference category. Level of statistical significance $p > 0.05$. Variables included in multiple linear regression: educational level, group of age, BMI, smoking status, maternal alcohol consumption, physical activity, diet quality, consumption of fish and seafood, nuts, red and processed meat, lean meat, eggs, bakery and oil (including variables in the first or third trimester according to the timing of fatty acids assessment) and intervention group (iron supplementation of 40 mg/day, 20 mg/day or 80 mg/day). The variables not shown in the table were not significant.

Table 4. Multiple linear regression of potential factors related to maternal serum n-6/n-3 and AA/EPA ratios.

	Fatty Acids Serum Profile First Tri- mester			Fatty Acids Serum Profile Third Tri- mester		
	B	SE	p	B	SE	p
n-6/n-3 ratio						
Constant	17.13	1.50	<0.001	33.93	4.95	<0.001
Educational level						
Low	Ref	-	-	Ref	-	-
Medium	-1.19	0.64	0.063	-1.43	1.87	0.444
High	-3.30	0.67	<0.001	-5.26	2.03	0.010
Age group						
<25 years	Ref	-	-	Ref	-	-
25–30 years	0.68	0.85	0.421	0.06	2.32	0.977
>30 years	-0.17	0.82	0.828	-2.57	2.24	0.251
BMI (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥ 25 kg/m ²)	1.15	0.53	0.033	1.98	1.83	0.282
Physical activity (0: sedentary, 1: active)	1.54	0.87	0.078	1.28	1.78	0.471
Smoking (0: non-smoke, 1: smoker)	2.70	0.72	<0.001	4.58	1.93	0.019
Maternal alcohol consumption (0: no, 1: yes)	0.57	0.90	0.526	-1.54	2.78	0.579
Fish and seafood consumption (g/day)	-0.03	0.01	<0.001	-0.07	0.02	0.008
Intervention group (iron supplementation dosage)						
40 mg/day	Ref	-	-	Ref	-	-
20 mg/day	0.68	0.72	0.344	-1.26	1.90	0.507
80 mg/day	-1.06	0.58	0.70	-0.04	1.76	0.979
	R ² _{CX100} = 16.6 F _{18,334} = 4.89 p < 0.001			R ² _{CX100} = 7.70 F _{18,237} = 2.18 p = 0.004		
AA/EPA ratio						
Constant	37.45	5.59	<0.001	63.08	12.31	<0.001
Educational level						
Low	Ref	-	-	Ref	-	-
Medium	-5.46	2.38	0.023	-9.24	4.69	0.050
High	-7.42	2.51	0.003	-19.21	5.07	<0.001
Age group						
<25 years	Ref	-	-	Ref	-	-
25–30 years	-6.39	3.16	0.044	-11.05	5.84	0.060
>30 years	-10.34	3.01	0.001	-12.70	5.61	0.024
BMI (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥ 25 kg/m ²)	4.08	1.99	0.042	0.318	4.56	0.945
Physical activity (0: sedentary, 1: active)	5.73	3.20	0.074	0.31	4.56	0.945
Smoking (0: non-smoke, 1: smoker)	3.82	2.64	0.148	-2.16	4.85	0.656
Maternal alcohol consumption (0: no, 1: yes)	0.54	3.35	0.871	0.25	6.87	0.970

Fish and seafood consumption (g/day)	−0.16	0.03	<0.001	−0.26	0.70	<0.001
Bakery consumption (g/day)	0.05	0.03	0.132	0.19	0.073	0.008
Intervention Group (iron supplementation dosage)						
40 mg/day	Ref	-	-	Ref	-	-
20 mg/day	−0.13	2.65	0.959	−1.07	4.86	0.825
80 mg/day	−4.35	2.16	0.045	−0.198	4.38	0.964
	$R^2_{CX100} = 16.9$ $F_{18,329} = 7.23$ $p < 0.001$			$R^2_{CX100} = 13.5$ $F_{18,233} = 3.17$ $p < 0.001$		

B, unstandardised coefficient; SE, standard error. Ref, reference category. Level of statistical significance $p > 0.05$. Variables included in multiple linear regression: educational level, group of age, BMI, smoking status, maternal alcohol consumption, physical activity, diet quality, consumption of fish and seafood, nuts, red and processed meat, lean meat, eggs, bakery and oil (including variables in the first or third trimester according to the timing of fatty acids assessment) and intervention group (iron supplementation of 40 mg/day, 20 mg/day or 80 mg/day). The variables not shown in the table were not significant.

4. Discussion

In this prospective study of Mediterranean pregnant women, we identified the main maternal factors that affect the n-3 PUFA and their balance with n-6 PUFA. Specifically, women of 25 or 30 years old and/or with medium or high educational level showed better levels of fatty acids, with a greater n-3 fatty acids serum concentration and lower values of n-6/n-3 and AA/EPA ratio in both the first (T1) and third (T3) trimesters. Moreover, higher fish and seafood consumption is favourably linked with higher EPA and DHA concentrations and with a lower n-6/n-3 ratio and AA/EPA in both trimesters, except for DHA, which was not linked in T3. However, smoking reduced DHA concentration and increased n-6/n-3 ratio T1, but only n-6/n-3 in T3. Practically none of the maternal factors assessed were related to SFA, apart from overweight and obesity status, or MUFA, apart from the older age of the mother in T3.

To our knowledge, there are few studies that have assessed maternal and lifestyle factors associated with serum fatty acid concentrations in a pregnant population, DHA and EPA being of great importance for mother and child health [31]. Moreover, an adequate balance between n-3 and n-6 is a critical factor for health because the n-6 PUFA compete with the n-3 PUFA by the metabolism of desaturation enzymes and, consequently, influences the kind of eicosanoid generated [32]. It is relevant to evaluate the association of FA serum concentrations and the maternal factors related throughout the whole pregnancy period. Specifically, diet is one of the most studied factors related to FA status. Nowadays, the occidental diet tends not to sufficiently provide n-3 PUFA, and the n-6 PUFA intake tends to be higher than recommendations [33,34]. The main source of n-3 PUFA are fish and seafood, which could be crucial contributors to an adequate level of n-3 PUFA and the n-6/n-3 and AA/EPA ratios during pregnancy, as has been reported previously [8,11,12,18]. As expected, our results showed that fish and seafood consumption positively predicted greater serum concentrations of EPA and DHA and low values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio in T1. Within estimations based on our model, it was pointed out that for each fish serving (150 g of weight approximately), the concentration of EPA and DHA increases by 22.5 and 51 $\mu\text{mol/L}$ respectively, improving their concentrations considerably. However, these associations were only maintained for EPA and n-6/n-3 and AA/EPA ratios during T3, but not for DHA concentrations in agreement with Bonham et al. [35]. This might be due to the fact that DHA could be regulated by different biosynthesis or mobilisation mechanism [34]. For instance, hormonal changes that occur during pregnancy, such as the increase in oestrogen that supports conversion of alpha-linolenic acid (ALA) to DHA [36–38]. Another reason might be that in T3 there is a high mobilisation of DHA from the maternal fat store to the foetus in order to stimulate high brain maturation. In addition, bakery food, which is usually manufactured with vegetable oils rich in n-6, can predict high AA/EPA ratios. In view of these findings, an optimal n-3

PUFA concentration and n-6/n-3 and AA/EPA ratios at the beginning of the pregnancy are needed to assure an adequate concentration and store throughout the pregnancy and even the lactation period [8]. Therefore, to acquire healthy eating habits, including fish and seafood consumption, it is essential to achieve an optimal EPA and DHA concentration at the beginning and during pregnancy, which could contribute to improving child neurodevelopment and protection from autism-spectrum traits [39–41]. In particular, higher maternal n-6/n-3 ratios and higher maternal concentrations of total n-6 PUFA are among potential environmental risk factors that are associated to autism spectrum disorder [39,42] and immune system disease [43]. The placental fat transport is driven by a concentration gradient as the foetus has substantially lower fat concentrations, indicating a preferential transfer of n-6 PUFA [42]. The consequence is an imbalance between n-3 and n-6 PUFA levels that may contribute to offspring diseases. We found that age and educational level are also the common contributors to fatty acid concentrations in maternal serum throughout pregnancy. Our results show that those women over 25 years of age, or with medium or high educational level in particular, showed high values of EPA and DHA and low values of n-6/n-3 and AA/EPA ratio. Some authors have not reported a significant association between age or educational level and DHA or total n-3 PUFA [8,14], although similar findings to ours regarding age have been reported in different countries [12,13,15,17]. Likewise, Pinto et al. [12] found that low income correlated negatively with the n-6/n-3 ratio, and other studies have reported a positive correlation between educational level and levels of DHA, total n-3 PUFA and a negative correlation with AA/EPA ratio [13,16]. Although some research has shown that older women with a higher educational level tend to consume more n-3 or fish and seafood during pregnancy [44,45], and/or showed high adherence to diet quality [27,46,47], in our study only observed significant differences on fish and seafood consumption by age group (age group: <25 years old: 36.3 ± 21.6 ; 25–30 years old: 46.1 ± 31.6 ; >30 years old: 47.2 ± 30.5 ; $p = 0.049$). In addition, women with medium or high educational levels might have greater nutritional knowledge [48,49]. Lower educational levels and younger ages might be linked to lower incomes and may have less access to food sources of n-3 PUFA (fish and seafood), which tend to be expensive [12,50,51]. In agreement with our results, Nordgren et al. [51] indicates that socioeconomically disadvantaged populations (low educational level and low income) are particularly at risk for even lower levels of omega-3 intake. Regarding n-6 PUFA, two studies also report no link with age [8] or educational level [13] in agreement with our results. In contrast, two studies observed a positive link with age [12,16], but others showed a negative correlation with age [13,16] and/or education level [8].

Nutritional status could be a potential factor, although the literature shows controversial results [11–15]. Lesch et al. [11] found overweight women showed higher concentrations of AA and n-3 PUFA. However, our results show that overweight or obesity status is associated to higher concentrations of SFA, AA and n-3/n-6 and AA/EPA ratio. It can be hypothesized that, in our sample, the higher FA level might be due to greater food consumption, especially of those foods rich in n-6 FA, which could interfere in the conversion of EPA. Moreover, excessive maternal adiposity could alter the placental transfer of FA [52].

Another of our principal relevant findings is that pregnant women who smoke showed low levels of DHA, total n-3 and high n-6/n-3 ratio only in T1. In particular, smoking predicted a reduction of around $40 \mu\text{mol/L}$ of DHA. These results confirm recent findings in the omega-3 index in erythrocyte or in total n-3 in serum fatty acid [12–15,17,53]. This influence is possibly caused by the adverse effect of smoking on the conversion process of ALA to DHA [54,55]. This link with DHA and n-3 was not observed in T3, probably by the mechanism of transferring DHA maternal stores to foetus. However, it was shown that smoking increased the n-6/n-3 ratio, which suggests that smoking could affect the fatty acid profile some another way since it might alter the conversion rate of n-6 to eicosanoids, such as prostaglandin E2 [55,56]. This shows an anti-inflammatory effect and has a crucial role in the regulation of delivery [57]. In fact, smoking during pregnancy has

been shown as a risk factor for premature delivery [58]; therefore, advising a mother to quit smoking in pregnancy could improve the FA profile throughout gestation and prevent negative outcomes for mother and child.

Regarding another unhealthy lifestyle habit, some studies have found that maternal alcohol consumption has been associated with worse n-6 and n-3 FA concentrations [12,15,16,18,53] since it could impair lipid metabolism [59]. However, our results did not find any significant association, probably due to the fact that the amount of alcohol consumption in our sample is low ($3.01 \text{ g/day} \pm 15.2$) in comparison to women who consume alcohol frequently [16] or moderately-heavily [53].

It should be noted that iron supplementation of 80 mg was associated to higher concentration of EPA, DHA total n-3 and a lower AA/EPA ratio. There appears to be a physiological relationship between the metabolism and utilization of iron and that of fatty acids, although it is not yet clear [60].

Our findings provide crucial information for knowing and identifying maternal factors related to serum concentrations of FA and developing an intervention program focused on modifiable factors, such as dietary and smoking habits, and targeting high-risk groups. Our study has several strengths. It is longitudinal, which enabled us to study the concentrations of fatty acid and the maternal factors throughout the pregnancy period. Secondly, all procedures in data collection and sample analyses were intensively monitored. Moreover, we included in our analysis different types of FA. Indeed, this is the first study that has analysed SFA and MUFA with several maternal factors. Another strength is the greater sample size in comparison with other studies [12–14].

However, our study also has several limitations. Firstly, due to the lack of references or range values, we were not able to apply a cut-off value to describe the intensity of how maternal factors affect the fatty acid profile and which potential consequences of lower n-3 status can appear in the mother and child. Further studies regarding the whole FA profile are encouraged. On the other hand, although we had data on fatty acid concentrations in plasma rather than red blood cells, we consider that our results are not affected because it has been shown that fatty acid concentrations in plasma and red blood cells are highly correlated [61–63] and studies that use both biochemical parameters obtained similar results [15]. Finally, we were unable to evaluate other environmental and genetic factors that might impact on serum fatty acid concentrations during pregnancy. For instance, gene coding for proteins involved in uptake, metabolism, transport and restructuring, especially, the fatty acid desaturase (FADS) gene cluster, which is related to desaturation steps in the n-3 and n-6 fatty acids might also contribute [64].

5. Conclusions

In conclusion, educational level or age are common factors that affected EPA, DHA, and the n-6/n-3 and AA/EPA in both trimesters. Overweight and obesity predicted higher values of n-6/n-3 ratio and AA/EPA ratio in the first trimester. Lifestyle habits, such as fish and seafood consumption, increased EPA and AA/EPA ratio in both trimesters, whereas DHA was modified by fish and seafood consumption in the first trimester. Smoking showed an impairment in the fatty acid profile: a decrease in DHA in the first trimester and an increase of n-6/n-3 in both trimesters. However, no relevant association was found with SFA and MUFA. Therefore, nutritional intervention and advice to stop smoking geared to pregnant women, especially those who are younger than 25 years-old, with low educational levels, or are overweight or obese, could improve the FA serum profiles, especially n-3 PUFA, as it may benefit their health and the health of their newborns. Further research is needed to go in-depth into these findings and their health consequences.

Author Contributions: Conceptualization, V.A., J.B.; formal analysis, C.M.-G., E.A.; data curation, E.A., C.M.-G., V.A., C.B., N.S.O.; investigation, V.A.; writing—original draft preparation, E.A., C.M.-G., V.A.; writing—review and editing, E.A., C.M.-G., V.A., J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study ECLIPSES was financially supported by a grant (PI12/02777) from the Health Research Fund of the Ministry of Health and Consumption (Madrid, Spain) (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo) and co-funded by European Union (ERDF/ESF, “A way to make Europe”/“Investing in your future”). The funding bodies played no part in the design of the study, collection and interpretation of data, or decision to publish.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Research Institute in Primary Care [Instituto de Investigación en Atención Primaria; IDIAP] and the Spanish Agency for Medicines and Health Products [Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios; AEMPS] (AEMPS IJG-FER-2012 on 9 July 2018)."

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: We thank the Jordi Gol Research Institute in Primary Care (Institut d' Investigació en Atenció Primària; IDIAP) for their guidance regarding ethical matters. We thanks to entities and participants in ECLIPSES study: Research Group in Nutrition and Mental Health (NUTRISAM), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain (Victoria Arija, Josepa Canals, Estefanía Aparicio, Núria Aranda, Cristina Bedmar, Carmen Hernández, Lucía Iglesias, Cristina Jardí, Núria Voltas). Sexual and Reproductive Health Care Services (ASSIR) of Tarragona, Spain (Francesc Fargas, Francisca Ruiz, Gemma March, Susana Abajo) and team of midwives recruiting for the study (Irene Aguilar, Sònia Aguilés, Rosa Alzúria, Judit Bertrán, Carmen Burgos, Elisabet Bru, Montserrat Carreras, Beatriz Fernández, Carme Fonollosa, María Leiva, Demetria Patricio, Teresa Pinto, María Ramírez, Eusebia Romano, Inés Sombreo). Research support Unit-Tarragona (Josep Basora, Meritxell Pallejà) and Central Unit-Barcelona (Rosa Morros) of the Institut d'Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Institut Català de la Salut. Laboratory of Institut Català de la Salut (ICS), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain (Núria Serrat, Carla Martín). Finally, we thank the Centre for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the Universitat Rovira i Virgili-Eurecat for their contribution to chromatographic and mass spectrometry analysis (Núria Canela, Elisabet Foguet, Marc Riu, Pol Herrero, and Antoni del Pino).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mousa, A.; Naqash, A.; Lim, S. Macronutrient and Micronutrient Intake during Pregnancy: An Overview of Recent Evidence. *Nutrients* **2019**, *11*, 1–20.
2. Koletzko, B.; Brands, B.; Grote, V.; Kirchberg, F.F.; Prell, C.; Rzehak, P.; Uhl, O.; Weber, M. Long-Term Health Impact of Early Nutrition: The Power of Programming. *Ann. Nutr. Metab.* **2017**, *70*, 161–169.
3. Koletzko, B.; Godfrey, K.M.; Poston, L.; Szajewska, H.; Van Goudoever, J.B.; De Waard, M.; Brands, B.; Grivell, R.M.; Deussen, A.R.; Dodd, J.M.; et al. Nutrition during pregnancy, lactation and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: The early nutrition project recommendations. *Ann. Nutr. Metab.* **2019**, *74*, 93–106.
4. Birch, E.E.; Carlson, S.E.; Hoffman, D.R.; Fitzgerald-Gustafson, K.M.; Fu, V.L.; Drover, J.R.; Castañeda, Y.S.; Minns, L.; Wheaton, D.K.H.; Mundy, D.; et al. The DIAMOND (DHA intake and measurement of neural development) study: A double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 848–859.
5. Campoy, C.; Escolano-Margarit, M.; Anjos, T.; Szajewska, H.; Uauy, R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, S85–S106.
6. Koletzko, B.; Lien, E.; Agostoni, C.; Böhles, C.; Campoy, C.; Cetin, I.; Decsi, T.; Dudenhausen, J.W.; Dupont, C.; Forsyth, S.; et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: Review of current knowledge and consensus recommendations. *J. Perinat. Med.* **2008**, *36*, 5–14.
7. Hoge, A.; Tabar, V.; Donneau, A.F.; Dardenne, N.; Degée, S.; Timmermans, M.; Nisolle, M.; Guillaume, M.; Castronovo, V. Imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy is predictive of postpartum depression in a Belgian cohort. *Nutrients* **2019**, *11*, 1–14.
8. Markhus, M.W.; Rasinger, J.D.; Malde, M.K.; Frøyland, L.; Skotheim, S.; Braarud, H.C.; Stormark, K.M.; Graff, I.E. Docosahexaenoic Acid Status in Pregnancy Determines the Maternal Docosahexaenoic Acid Status 3-, 6- and 12 Months Postpartum. Results from a Longitudinal Observational Study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136409.
9. Shrestha, N.; Sleep, S.L.; Cuffe, J.S.M.; Holland, O.J.; Perkins, A.V.; Yau, S.Y.; McAinch, A.J.; Hryciw, D.H. Role of omega-6 and omega-3 fatty acids in fetal programming. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2020**, *47*, 907–915.
10. Shrestha, N.; Holland, O.J.; Kent, N.L.; Perkins, A.V.; McAinch, A.J.; Cuffe, J.S.M.; Hryciw, D.H. Maternal High Linoleic Acid Alters Placental Fatty Acid Composition. *Nutrients* **2020**, *12*, 2183, doi:10.3390/nu12082183.

11. Lepsch, J.; Vaz, J.S.; Moreira, J.D.; Pinto, T.J.; Soares-Mota, M.; Kac, G. Food frequency questionnaire as an indicator of the serum composition of essential n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy, according to body mass index. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2015**, *28*, 85–94, doi:10.1111/jhn.12225. Epub 2014 Mar 13.
12. Pinto, T.J.; Farias, D.R.; Rebelo, F.; Lepsch, J.; Vaz, J.S.; Moreira, J.D.; Cunha, G.M.; Kac, G. Lower inter-partum interval and unhealthy life-style factors are inversely associated with n-3 essential fatty acids changes during pregnancy: A prospective cohort with Brazilian women. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121151, doi:10.1371/journal.pone.0121151.
13. Hoge, A.; Bernardy, F.; Donneau, A.F.; Dardenne, N.; Degée, S.; Timmermans, M.; Nisolle, M.; Guillaume, M.; Castronovo, V. Low omega-3 index values and monounsaturated fatty acid levels in early pregnancy: An analysis of maternal erythrocytes fatty acids. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 1–11.
14. Gellert, S.; Schuchardt, J.P.; Hahn, A. Higher omega-3 index and DHA status in pregnant women compared to lactating women—Results from a German nation-wide cross-sectional study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2016**, *109*, 22–28, doi:10.1016/j.plcfa.2016.04.002.
15. Li, Y.; Li, H.T.; Trasande, L.; Ge, H.; Yu, L.X.; Xu, G.S.; Bai, M.X.; Liu, J.M. DHA in Pregnant and Lactating Women from Coastland, Lakeland, and Inland Areas of China: Results of a DHA Evaluation in Women (DEW) Study. *Nutrients* **2015**, *7*, 8723–8732, doi:10.3390/nu7105428.
16. Stark, K.D.; Beblo, S.; Murthy, M.; Whitty, J.E.; Buda-Abela, M.; Janisse, J.; Rockett, H.; Martier, S.S.; Sokol, R.J.; Hannigan, J.H.; et al. Alcohol consumption in pregnant, black women is associated with decreased plasma and erythrocyte docosahexaenoic acid. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2005**, *29*, 130–140, doi:10.1097/01.alc.0000150013.65416.06.
17. Lim, W.Y.; Chong, M.; Calder, P.C.; Kwek, K.; Chong, Y.S.; Gluckman, P.D.; Godfrey, K.M.; Saw, S.M.; Pan, A.; GUSTO Study Group. Relations of plasma polyunsaturated Fatty acids with blood pressures during the 26th and 28th week of gestation in women of Chinese, Malay, and Indian ethnicity. *Medicine* **2015**, *94*, e571, doi:10.1097/MD.0000000000000571.
18. Wilson, N.A.; Mantzioris, E.; Middleton, P.F.; Muhlhauser, B.S. Influence of sociodemographic, lifestyle and genetic characteristics on maternal DHA and other polyunsaturated fatty acid status in pregnancy: A systematic review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2020**, *152*, 102037, doi:10.1016/j.plcfa.2019.102037.
19. Arijia, V.; Fargas, F.; March, G.; Abajo, S.; Basora, J.; Canals, J.; Ribot, B.; Aparicio, E.; Serrat, N.; Hernández-Martínez, C.; et al. Adapting iron dose supplementation in pregnancy for greater effectiveness on mother and child health: Protocol of the ECLIPSES randomized clinical trial. *BMC Pregnancy Childb.* **2014**, *14*, 33.
20. Iglesias, I.; Arijia, V.; Aranda, N.; Aparicio, E.; Serrat, N.; Fargas, F.; Ruiz, F.; Pallejà, M.; Coronel, P.; Gimeno, M.; et al. The Effectiveness of Different Doses of Iron Supplementation and the Prenatal Determinants of Maternal Iron Status in Pregnant Spanish Women: ECLIPSES Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2418, doi:10.3390/nu11102418.
21. Institut d'Estadística de Catalunya. *Classificació Catalana d'Ocupacions 2011 (CCO-2011)*; Institut d'Estadística de Catalunya: Catalunya, Spain, 2011.
22. Craig, C.L.; Marshall, A.L.; Sjöström, M.; Bauman, A.E.; Booth, M.L.; Ainsworth, B.E.; Pratt, M.; Ekelund, U.; Yngve, A.; Sallis, J.F.; et al. International physical activity questionnaire: 12-Country reliability and validity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2003**, *35*, 1381–1395.
23. World Health Organization (WHO). Global Database on Body Mass Index. 2006. Available online: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (accessed on 18 January 2019).
24. Trinidad, I.; Fernández, J.; Cucó, G.; Biarnés, E.; Arijia, V. Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: Reproducibilidad y validez. *Nutr. Hosp.* **2008**, *23*, 242–252.
25. Trichopoulou, A.; Kouris-Blazos, A.; Wahlqvist, M.L.; Gnardellis, C.; Lagiou, P.; Polychronopoulos, E.; Vassilakou, T.; Lipworth, L.; Trichopoulos, D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* **1995**, *311*, 1457–1460.
26. Trichopoulou, A.; Costacou, T.; Bamia, C.; Trichopoulos, D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2599–2608.
27. Jardí, C.; Aparicio, E.; Bedmar, C.; Aranda, N.; Abajo, S.; March, G.; Basora, J.; Arijia, V. Food consumption during pregnancy and post-partum. ECLIPSES Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2447.
28. David, F.; Tienpont, B.; Klee, M.S.; Tripp, P. Automated Sample Preparation for Profiling Fatty Acids in Blood and Plasma Using the Agilent 7693. Agil Appl Note [Internet]. 5990-4822E. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4822EN.pdf> (accessed on 20 January 2021).
29. Mowbray, F.I.; Fox-wasylyshyn, S.M.; El-masri, M.M. Univariate Outliers: A Conceptual Overview for the Nurse Researcher. *Can. J. Nurs. Res.* **2019**, *51*, 31–37.
30. Cousineau, D.; Chartier, S. Outliers detection and treatment: A review. *Int. J. Psychol. Res.* **2011**, *3*, 58–67.
31. Lauritzen, L.; Carlson, S.E. Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Matern. Child Nutr.* **2011**, *7* (Suppl. 2), 41–58, doi:10.1111/j.1740-8709.2011.00303.x.
32. Simopoulos, A.P. The importance of the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 674–688.
33. Ortega, R.M.; González, L.G.; Villalobos, T.K.; Perea, J.M.; Aparicio, A.; López, A.M. Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles [Food sources and adequacy of intake of omega 3 and omega-6 fatty acids in a representative sample of Spanish adults]. *Nutr. Hosp.* **2013**, *28*, 2236–2245. Spanish.

34. Gómez, C.; Bermejo, L.M.; Loria, V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: Nutritional recommendations. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 323–329, doi:10.1590/S0212-16112011000200013.
35. Bonham, M.P.; Duffy, E.M.; Wallace, J.M.; Robson, P.J.; Myers, G.J.; Davidson, P.W.; Clarkson, T.W.; Shamlaye, C.F.; Strain, J.J. Habitual fish consumption does not prevent a decrease in LCPUFA status in pregnant women (the Seychelles Child Development Nutrition Study). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2008**, *78*, 343–350, doi:10.1016/j.plefa.2008.04.005.
36. Otto, S.J.; van Houwelingen, A.C.; Badart-Smook, A.; Hornstra, G. Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 302–307, doi:10.1093/ajcn/73.2.302.
37. Burdge, G.C. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: Nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2004**, *7*, 137–144.
38. Postle, A.D.; Al, M.D.; Burdge, G.C.; Hornstra, G. The composition of individual molecular species of plasma phosphatidylcholine in human pregnancy. *Early Hum. Dev.* **1995**, *43*, 47–58.
39. Steenweg-de Graaff, J.; Tiemeier, H.; Ghassabian, A.; Rijlaarsdam, J.; Jaddoe, V.W.; Verhulst, F.C.; Roza, S.J. Maternal Fatty Acid Status During Pregnancy and Child Autistic Traits: The Generation R Study. *Am. J. Epidemiol.* **2016**, *183*, 792–799, doi:10.1093/aje/kwv263.
40. Hibbeln, J.R.; Spiller, P.; Brenna, J.T.; Golding, J.; Holub, B.J.; Harris, W.S.; Kris-Etherton, P.; Lands, B.; Connor, S.L.; Myers, G.; et al. Relationships between seafood consumption during pregnancy and childhood and neurocognitive development: Two systematic reviews. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2019**, *151*, 14–36, doi:10.1016/j.plefa.2019.10.002.
41. Julvez, J.; Méndez, M.; Fernandez-Barres, S.; Romaguera, D.; Vioque, J.; Llop, S.; Ibarluzea, J.; Guxens, M.; Avella-Garcia, C.; Tardón, A.; et al. Maternal Consumption of Seafood in Pregnancy and Child Neuropsychological Development: A Longitudinal Study Based on a Population With High Consumption Levels. *Am. J. Epidemiol.* **2016**, *183*, 169–182, doi:10.1093/aje/kwv195.
42. Lauritzen, L.; Brambilla, P.; Mazzocchi, A.; Harsløf, L.B.S.; Ciappolino, V.; Agostoni, C. DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients* **2016**, *8*, 6, doi:10.3390/nu8010006.
43. Montes, R.; Chisaguano, A.M.; Castellote, A.M.; Morales, E.; Sunyer, J.; López-Sabater, M.C. Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2013**, *67*, 658–663, doi:10.1038/ejcn.2013.68.
44. Rodríguez-Bernal, C.; Ramón, R.; Quiles, J.; Murcia, M.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Vioque, J.; Ballester, F.; Regalito, M. Dietary intake in pregnant women in a Spanish Mediterranean area: As good as it is supposed to be? *Public Health Nutr.* **2012**, *16*, 1379–1389.
45. Stråvik, M.; Jonsson, K.; Hartvigsson, O.; Sandin, A.; Wold, A.E.; Sandberg, A.-S.; Barman, M. Food and Nutrient Intake during Pregnancy in Relation to Maternal Characteristics: Results from the NICE Birth Cohort in Northern Sweden. *Nutrients* **2019**, *11*, 1680.
46. Doyle, I.M.; Borrmann, B.; Grosser, A.; Razum, O.; Spallek, J. Determinants of dietary patterns and diet quality during pregnancy: A systematic review with narrative synthesis. *Public Health Nutr.* **2017**, *20*, 1009–1028.
47. Savard, C.; Lemieux, S.; Carbonneau, É.; Provencher, V.; Gagnon, C.; Robitaille, J.; Morisset, A.S. Trimester-Specific Assessment of Diet Quality in a Sample of Canadian Pregnant Women. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 311.
48. McKinnon, L.; Giskes, K.; Turrell, G. The contribution of three components of nutrition knowledge to socio-economic differences in food purchasing choices. *Public Health Nutr.* **2014**, *17*, 1814–1824, doi:10.1017/S1368980013002036.
49. Hakli, G.; Asil, E.; Uçar, A.; Ozdogan, Y.; Yilmaz, M.Y.; Özçelik, A.O.; Surucuo, M.S.; Çakiro, F.P.; Akan, L.S. Nutritional Knowledge and Behavior of Adults: Their Relations with Sociodemographic Factors. *Pak. J. Nutr.* **2016**, *15*, 532–539, doi:10.3923/pjn.2016.532.539.
50. Jahns, L.; Raatz, S.K.; Johnson, L.K.; Kranz, S.; Silverstein, J.T.; Picklo, M.J. Intake of Seafood in the US Varies by Age, Income, and Education Level but Not by Race-Ethnicity. *Nutrients* **2014**, *6*, 6060–6075, doi:10.3390/nu6126060.
51. Nordgren, T.M.; Lyden, E.; Anderson-Berry, A.; Hanson, C. Omega-3 Fatty Acid Intake of Pregnant Women and Women of Childbearing Age in the United States: Potential for Deficiency?. *Nutrients* **2017**, *9*, 197, doi:10.3390/nu9030197.
52. Dubé, E.; Gravel, A.; Martin, C.; Desparois, G.; Moussa, I.; Ethier-Chiasson, M.; Forest, J.C.; Giguère, Y.; Masse, A.; Lafond, J. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biol. Reprod.* **2012**, *87*, 14, 1–11, doi:10.1095/biolreprod.111.098095.
53. Sowell, K.D.; Holt, R.R.; Uriu-Adams, J.Y.; Chambers, C.D.; Coles, C.D.; Kable, J.A.; Yevtushok, L.; Zymak-Zakutnya, N.; Werneteleki, W.; Keen, C.L.; CIFASD. Altered Maternal Plasma Fatty Acid Composition by Alcohol Consumption and Smoking during Pregnancy and Associations with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *J. Am. Coll. Nutr.* **2020**, *39*, 249–260, doi:10.1080/07315724.2020.1737984.
54. Agostoni, C.; Riva, E.; Giovannini, M.; Pinto, F.; Colombo, C.; Risé, P.; Galli, C.; Marangoni, F. Maternal smoking habits are associated with differences in infants' long-chain polyunsaturated fatty acids in whole blood: A case-control study. *Arch. Dis. Child.* **2008**, *93*, 414–418, doi:10.1136/adc.2007.129817.
55. Baldassarre, D.; Amato, M.; Frigerio, B.; Ghezzi, S.; Colombo, C.; Castelnovo, S.; Ravani, A.; Sansaro, D.; Tremoli, E.; Sirtori, C.R.; et al. Impact of cigarette smoking on the plasma fatty acid profile and their interaction in determining the burden of subclinical atherosclerosis. *Nutrients* **2014**, *13*, 159–167.
56. Sinzinger, H.; Kaliman, J.; Oguogho, A. Eicosanoid production and lymphatic responsiveness in human cigarette smokers compared with non-smokers. *Lymphology* **2000**, *33*, 24–31.

57. Gouveia-Figueira, S.; Martens, D.S.; Nawrot, T.S.; Nording, M.L. Cord blood eicosanoid signatures and newborn gestational age. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2017**, *133*, 123–127, doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.07.003.
58. Ribot, B.; Isern, R.; Hernández-Martínez, C.; Canals, J.; Aranda, N.; Arijia, V. Impacto del tabaquismo, la exposición pasiva al tabaco y el dejar de fumar sobre la salud del recién nacido [Effects of tobacco habit, second-hand smoking and smoking cessation during pregnancy on newborn's health]. *Med. Clin.* **2014**, *143*, 57–63.
59. Pawlosky, R.J.; Salem, J.N. Perspectives on alcohol consumption: Liver polyunsaturated fatty acids and essential fatty acid metabolism. *Alcohol* **2004**, *34*, 27–33, doi:10.1016/j.alcohol.2004.07.009.
60. Navas-Carretero, S.; Pérez-Granados, A.M.; Sarriá, B.; Carbajal, A.; Pedrosa, M.M.; Roc, M.A.; Fairweather-Tait, S.J.; Vaquero, M.P. Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *J. Am. Coll. Nutr.* **2008**, *27*, 96–101.
61. Zanzoni, S.; Pagano, K.; D'Onofrio, M.; Assfalg, M.; Ciambellotti, S.; Bernacchioni, C.; Turano, P.; Aime, S.; Ragona, L.; Molinari, H. Unsaturated Long-Chain Fatty Acids Are Preferred Ferritin Ligands That Enhance Iron Biom mineralization. *Chemistry* **2017**, *23*, 9879–9887, doi:10.1002/chem.201701164.
62. Sun, Q.; Ma, J.; Campos, H.; Hankinson, S.E.; Hu, F.B. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 74–81, doi:10.1093/ajcn/86.1.74.
63. 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**, *71*, 363–374, doi:10.1016/j.plefa.2004.07.002.
64. Conway, M.C.; McSorley, E.M.; Mulhern, M.S.; Strain, J.J.; van Wijngaarden, E.; Yeates, A.J. Influence of fatty acid desaturase (FADS) genotype on maternal and child polyunsaturated fatty acids (PUFA) status and child health outcomes: A systematic review. *Nutr. Rev.* **2020**, *78*, 627–646, doi:10.1093/nutrit/nuz086.

2. PUBLICACIÓN 2. Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy.

Estefania Aparicio*, Carla Martín-Grau*, Carmen Hernández-Martínez, Nuria Voltas, Josefa Canals and Victoria Arija. Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2021, 21:778 (doi: 10.1186/s12884-021-04251-0) [239].

*Coautores.

Tipo de publicación: artículo científico.

Estado: publicado en noviembre de 2021.

Métricas de la revista *BMC Pregnancy and Childbirth*:

- Factor de impacto: 3,105 (según JCR, del inglés *Journal Citation Report*).
- Categoría: en el segundo cuartil (Q2) en *Obstetrics & Gynecology*.



RESEARCH

Open Access



Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy

Estefania Aparicio^{1,2†}, Carla Martín-Grau^{1,3†}, Carmen Hernández-Martínez^{1,2,4}, Nuria Voltas^{1,2,4}, Josefa Canals^{1,2,4} and Victoria Arija^{1,2*}

Abstract

Background: During pregnancy a high amount of fatty acids (FA) is necessary to meet foetus demands, which vary during gestation. The present study describes the changes in maternal fatty acid concentrations during pregnancy in a sample of pregnant women.

Methods: This is a longitudinal study of 479 pregnant women who were monitored from the first trimester to third trimester of pregnancy. Data on maternal characteristics were recorded and a serum sample was collected in each trimester. The fatty acid profile (saturated (SFA: total, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid), monounsaturated (MUFA: total, palmitoleic acid, oleic acid) and polyunsaturated fatty acids (PUFA: total omega-6 (n-6), linoleic acid, dihomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid (AA), total omega-3 (n-3), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA)) was analysed with a gas chromatography-mass spectrometry combination.

Results: From the first trimester to third trimester of pregnancy, a significant increase in total SFA, total MUFA and total n-6 PUFA was found. ($p < 0.001$). Nevertheless, the serum concentration of arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) and total n-3 PUFA decreased during gestation ($p < 0.001$). A statistically non-significant result was observed for the docosahexaenoic acid (DHA) serum concentration between the first and third trimesters of pregnancy. Significant correlations were observed between each total fatty acid concentrations of the first and third trimesters.

Conclusion: The circulating serum concentration of SFA, MUFA and n-6 PUFA increases during pregnancy, whereas essential fatty acids such as AA and EPA decrease, and DHA remains unchanged. Further research is necessary to understand the role played by FA throughout gestation.

Keywords: Pregnancy, Fatty acid status, DHA, EPA, Omega-3, Omega-6

Introduction

A good nutritional status of fatty acids (FA) during pregnancy is important for the mother's health in order to meet the needs of foetal growth and development.

Studies evaluating the effects of FA deficiency states during pregnancy have mainly focused on polyunsaturated fatty acids (PUFA). In particular, a maternal deficiency of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) may affect placental angiogenesis and vasculogenesis, thereby affecting foetal development (brain, muscle, eye, motor nerve and adiposity) [1]. It is known that eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are two of the most important FA for the cognitive and visual

*Correspondence: victoria.arija@urv.cat

†Estefania Aparicio and Carla Martín-Grau contributed equally to this work.

² Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43003 Tarragona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

development of the foetus [2–5]. Maternal fatty acid status is also crucial in late pregnancy because this is when the human foetal brain grows rapidly and high amounts of DHA accumulates in it [1, 5]. Thus, the foetus during the third trimester is especially vulnerable to developmental deficits due to a poor status of n-3 PUFA, and this could cause problems in neurological development [6, 7]. However, few studies have assessed the changes in FA during pregnancy [8–10]. An appropriate balance with n-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) is necessary [11, 12] because a high concentration of maternal arachidonic acid (AA) has been associated with deleterious outcomes, such as major depression in the mother [13, 14], or preterm delivery [15]. However, a higher maternal AA/DHA ratio at delivery and heterozygosity for the FADS1 genetic variant have shown positive long-term effects on processing speed in children at 9 years of age [7].

Therefore, an adequate fatty acid profile in early and late pregnancy is crucial for the health of both the mother and the child. To our knowledge there is a dearth of literature on the changes in plasma FA concentrations throughout pregnancy. A recent systematic review analysed how the n-3 and n-6 PUFA profile is modified during pregnancy [16]. It included only three studies [17–19] and showed that DHA and n-6 PUFA concentrations increase throughout pregnancy, while EPA remains unchanged. Similar findings were obtained in research conducted with a Canadian pregnant population with and without gestational diabetes [20]. Saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) have been studied less [17, 19, 21]. The survey by Pinto et al. [17] of 225 pregnant Brazilian women found an increase in SFA and MUFA concentrations throughout pregnancy. Taking into account the importance of FA status for maternal and foetal health, a better understanding and knowledge of this subject would help obstetrics and health professionals to identify possible abnormal values and decide whether treatment is necessary and which treatment to recommend. The aim of the current study is therefore to analyse the changes in maternal fatty acid concentrations (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy in a cohort of pregnant women from a Mediterranean country in Europe.

Material and methods

Study design and population

This study researched a longitudinal cohort of pregnant women from the ECLIPSES study [22]. The participants were contacted during the first prenatal visit to one of twelve sexual and reproductive health care services (ASSIR) of the Catalan Institute of Health (ICS) in Tarragona, Spain. The pregnant women were monitored from

the first trimester (12th gestational week) to the third trimester (36th gestational week) of pregnancy. The inclusion criteria were: healthy woman older than 18 years of age, pregnancy at ≤ 12 weeks, ability to understand the local and official state languages and the characteristics of the study, and signing the informed consent form. The women were excluded if they fulfilled any of the following exclusion criteria: multiple pregnancy, having taken iron supplements during the months previous to week 12 of pregnancy, hypersensitivity to egg protein, previous severe disease (immunosuppression) or any chronic disease which could affect their nutritional development (cancer, diabetes, malabsorption, or liver disease).

The present study is a secondary blood sample analysis of a randomized controlled trial of iron supplementation during pregnancy, called the ECLIPSES study. Finally, in the ECLIPSES study, 791 women were recruited at week 12 of pregnancy, and 534 women completed the data on week 36 of pregnancy. The causes of dropout included leaving voluntarily, miscarriage, the emergence of exclusion criteria during pregnancy (such as serious illness that could affect the nutritional status, for instance cancer, diabetes, malabsorption or liver disease) and lost to follow-up. More information can be found in the previous paper [23].

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Institute for Primary Care Research (IDIAP) and the Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV). All participants who agreed to participate signed the informed consent form.

Data collected

Midwives collected the participants' medical and obstetric history, socioeconomic information, lifestyle habits and anthropometric measurements in the first trimester of pregnancy. The medical and socioeconomic data included maternal age, ethnicity, education level (primary, secondary, or university studies), smoking habits and planned pregnancy, clinical and obstetric history. The socioeconomic level was classified as low, middle or high according to the Catalan classification of occupations (CCO-2011) [24]. Anthropometric measurements were obtained such as maternal height (cm) and weight (Kg), and BMI was calculated. The BMI was categorized as normal weight ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) or excess weight ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) according to the World Health Organization (WHO) criteria [25].

Blood sampling and determination of the fatty acid profile in plasma

Blood samples were collected at the first and third trimesters of pregnancy. They were collected in 1 tube of 7.5 ml without anticoagulant and were not mixed for

30 min at room temperature to allow coagulation. The serum was centrifuged and distributed in aliquots of 500 μ l and stored at -80°C . The samples were stored in the BioBank. At the end of the clinical study, samples were thawed and processed simultaneously in order to minimize inter-batch variation [22].

FA such as saturated, mono- and polyunsaturated FA were analysed. A combination of gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) was used to analyse FA using 7890A GC equipment coupled to QqQ 7000 Series[®] (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) after their derivatization to methyl ester (FAMES) due to their higher volatility [26]. A volume of 50 μ l of plasma samples was blended with internal standard (IS) solution (Myristic d-27 acid, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), chloroform and methanolic hydrochloric acid and incubated at 80°C during 2 hours. Then, FAMES were extracted by liquid-liquid extraction by means of hexane and then injected in the GC-MS system. Chromatographic analysis was carried out according to David et al. [26] to determine the 37 FAMES included in the Food Industry FAME Mix (Restek Corporation, Pennsylvania, USA). FAMES were split up in a high-polarity column (100 m \times 250 μm \times 0.25 μm) (HP-88 column, Agilent Technologies Inc., USA) with a temperature program between 140 and 240°C at 1 mL/min by a carrier gas (helium). Ionization was performed by electronic impact (70 eV) and the mass analyser operated on Selected Ion Monitoring mode (SIM). The processing of the FA sample was described in the previous paper [27]. The FA identified were: SFA, lauric acid, myristic acid, palmitic acid and stearic acid (the sum total of these was calculated to obtain total SFA); MUFA, palmitoleic acid and oleic acid (the sum of these FA was calculated to obtain total MUFA); n-6 PUFA, linoleic acid (LA), dihomo- γ -linolenic acid and AA (the sum total of these was calculated to obtain total n-6 PUFA); n-3 PUFA, EPA and DHA (the sum of these FA was calculated to obtain total n-3 PUFA). Moreover, total long chain fatty acids was calculated as total SFA + total MUFA + total n-6 PUFA + total n-3 MUFA.

Statistical analysis

The ability of the study sample to detect differences in FA concentration between the first and third trimesters of pregnancy was calculated using the data from this study in accordance with the following parameters: an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.20 in a bilateral contrast to paired samples. For total SFA, 444 participants were sufficient to detect a difference equal to or greater than 612 $\mu\text{mol/L}$ considering a standard deviation of 4601.2 $\mu\text{mol/L}$ (mean of 5860.5 $\mu\text{mol/L}$). For total MUFA, 440 participants were sufficient to detect a difference

equal to or greater than 198 $\mu\text{mol/L}$ considering a standard deviation of 1481.8 $\mu\text{mol/L}$ (mean of 1294.7 $\mu\text{mol/L}$). For total n-6 PUFA, 443 participants were sufficient to detect a difference equal to or greater than 403 $\mu\text{mol/L}$ considering a standard deviation of 3026.1 $\mu\text{mol/L}$ (mean of 2844.3 $\mu\text{mol/L}$). For total n-3 PUFA, 454 participants were sufficient to detect a difference equal to or greater than 13.5 $\mu\text{mol/L}$ considering a standard deviation of 102.7 $\mu\text{mol/L}$ (mean of -16.5 $\mu\text{mol/L}$). Therefore, our sample showed enough statistical power to detect differences.

For the FA concentration, outlier values were identified by z-score analysis [28], considering an absolute value of ± 3.29 as the standard value to detect outliers when the sample size is > 100 . Thus, an outlier case was considered when the z-score was above ± 3.29 or below ± 3.29 [29]. The results were presented as mean \pm standard deviation (SD) or percentage. The means between groups (the first and third trimesters of pregnancy) were compared by the paired student's t-test. The Pearson correlation was used to assess the association between each FA concentration total at the first and third trimesters. The percentage of variation from the first to third trimester was calculated for each individual FA with the following equation: (final value - initial value)/initial value $\times 100$. Statistical analyses were run by SPSS version 25.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). The significance level was at p -value < 0.05 .

Results

Participants' characteristics

The biochemical profiles of the FA in the first and third trimesters were analysed in 479 pregnant women. The baseline characteristics of pregnant women are shown in Table 1. The maternal age was 30.6 ± 5.01 years, and up to 80% were Caucasian. About 38.3% of women had a medium educational level and 69.6% were middle-class. Likewise, 25.3 and 12.5% of the pregnant women in the sample were overweight or obese, respectively, and 15.3% of participants reported that they smoked at the beginning of pregnancy. Some variables of baseline characteristics showed missing values, which range from 0.2 to 8.7%.

The FA detected in maternal serum and their concentration ($\mu\text{mol/L}$) during the first and third trimesters of pregnancy are shown in Table 2. From the first trimester to the third trimester of pregnancy there was a significant increase in total SFA (and their individual FA) and total MUFA (as well as palmitoleic acid and oleic acid) ($p < 0.001$). The percentage of variation of total SFA and total MUFA was 101.02 ± 93.05 and 184.93 ± 154.49 , respectively. In addition, a significant increase in total n-6 PUFA in the third trimester ($p < 0.0001$) was observed

Table 1 Baseline characteristics of pregnant women in the first trimester

General characteristics	Mean ± SD ^a or % (n = 479)
Maternal age (years) ^a	30.6 ± 5.01
Parity (yes %)	58.8
Planned pregnancy (yes %)	80.7
Maternal ethnic origin (%)	
Caucasian	81.9
Asian	0.7
Arab	7.8
Black	2.1
Latin American	7.6
Maternal educational level (%)	
Low (primary or less)	30.1
Medium (secondary)	38.3
High (university or more)	31.6
Socioeconomic status (%)	
Low	13.5
Middle	69.6
High	16.9
BMI (kg/m ²) at first trimester (%)	
< 25	62.2
25–30	25.3
≥ 30	12.5
Smoking status (%)	
Smoker	15.3
Non-Smoker or Ex-Smoker	84.7

^a Mean ± standard deviation. BMI body mass index

when it was compared to the maternal FA concentration in the first trimester of pregnancy, with a percentage of 77.85 ± 85.91 of variation. Nevertheless, the percentage of variation of AA was -6.33 ± 34.88 with a significant decrease in its concentration from the first to third trimesters. Regarding n-3 PUFA, the EPA concentration decreased during gestation ($p < 0.001$) with a percentage of variation of -14.93 ± 68.21. A statistically non-significant result was observed in the DHA concentration ($p = 0.357$) between the first and third trimesters of pregnancy.

Moreover, as the original study was a clinical trial with iron supplementation, we analysed whether the study group had any effect on the FA concentration. There were no significant differences in FA concentrations between the study groups in the first trimester or in the second trimester.

Moreover, Fig. 1 depicts the correlation of serum concentration of total SFA, MUFA, n-6 PUFA, n-3 PUFA and total FA between the first trimester and third trimester. A significantly low-moderate correlation of each total

FA concentration was observed from the first to third trimesters.

Discussion

This longitudinal study describes the changes in FA during pregnancy in a larger sample of women than in previous studies and, to our knowledge, for the first time in a population from the Mediterranean area. It provides valuable data on a wide range of FA, these being total SFA and lauric acid, myristic acid, palmitic acid and stearic acid; total MUFA and palmitoleic acid and oleic acid; total n-6 PUFA and linoleic acid, dihomo- γ -linolenic acid and AA; n-3 PUFA and EPA and total DHA. The data on these FA were determined using high-quality methods and evaluated at two moments of gestation (first and third trimester). This has made it possible to describe changes to the different types of FA during pregnancy. The concentrations of SFA, MUFA and PUFA n-6 increased from the first to the third trimester of gestation, except for AA, the concentrations of which decrease. In contrast, n-3 PUFA and EPA concentrations decreased during pregnancy, while DHA concentrations remained stable. It appears that essential fatty acids DHA and AA, which have a preferential placental transfer to the foetus, do not evolve in the same way as other FA during pregnancy.

There are few research projects that have analysed SFA and MUFA serum concentrations throughout pregnancy, conducted with Brazilian and Dutch pregnant woman [17–19, 21]. Our results are consistent with their findings, as they also found an increase in SFA and MUFA during pregnancy. This increase could be due to an increase in biosynthesis to cover requirements, since the rise in serum concentration may not be related to the small variation in the mothers' dietary intake [30, 31], as our research group found in this sample of healthy pregnant women in relation to their intake during pregnancy [32]. The SFA may play a key role in supporting foetal membrane growth, as the SFA bio-magnification process could help to satisfy AA demands in foetal circulation and DHA in the brain [33]. However, the crucial role played by SFA has yet to be determined. An adequate concentration of MUFA is also fundamental during pregnancy because a non-optimal level has been associated with a high risk of preterm delivery and low weight at birth [33]. Oleic acid concentration could be a biomarker for a lack of essential fatty acid in the mother's diet, as has been shown in animal models [33]. In addition, it has been suggested that the consumption of monounsaturated fats could benefit DHA metabolism because they have a low amount of LA and thus do not interfere with endogenous conversion of α -linolenic acid (ALA)

Table 2 Fatty acid concentration of maternal serum during pregnancy period from the first trimester to third trimester

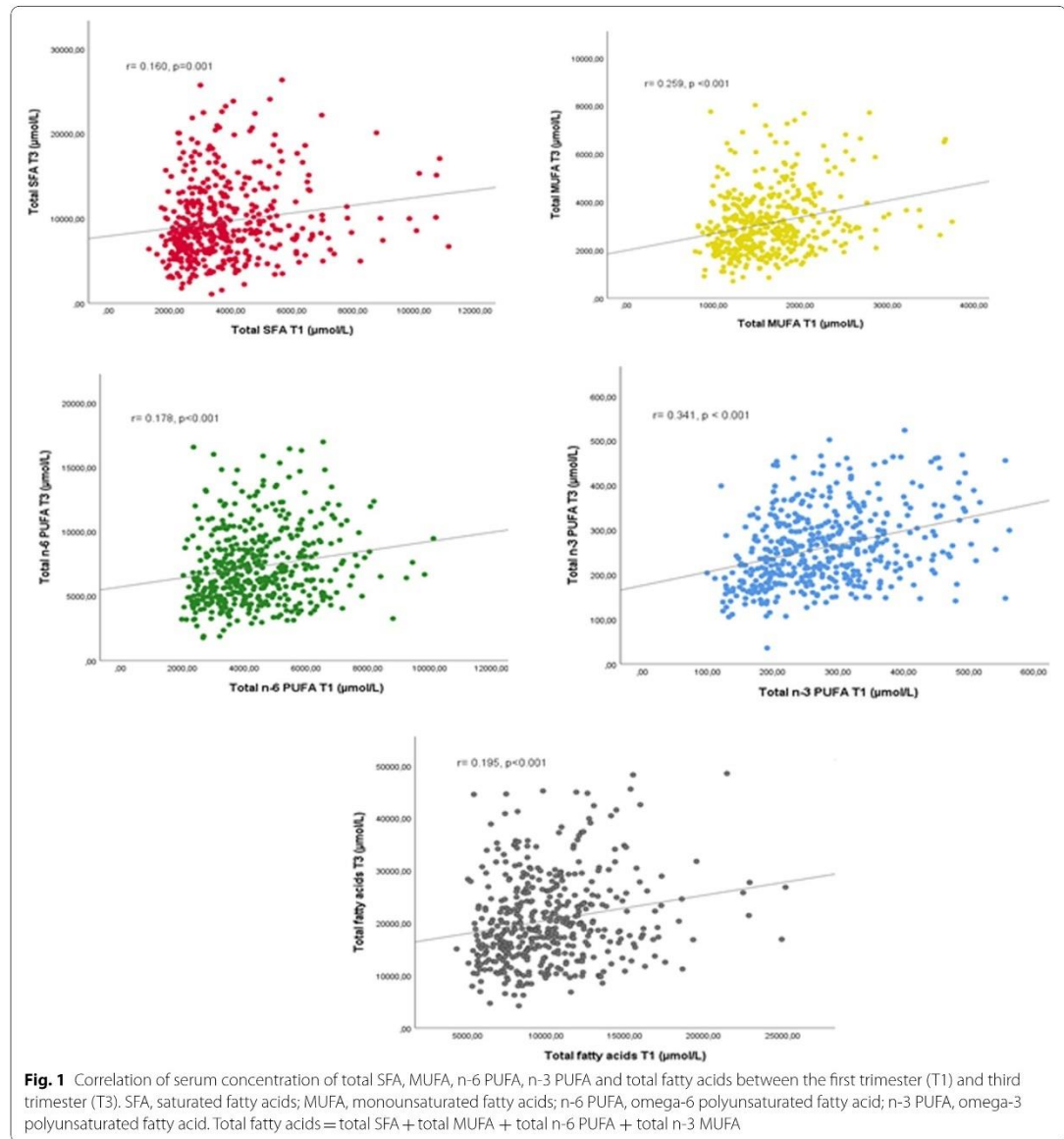
Fatty acids (μmol/L)		First Trimester (T1) (Mean ± SD)	Third Trimester (T3) (Mean ± SD)	p-value between ^(a-b)	% of variation from T1 to T3 (Mean ± SD)
SFA					
Lauric acid (C12:0)	n=444	40.14 ± 10.61	60.19 ± 28.26	<0.0001	56.33 ± 76.07
Myristic acid (C14:0)	n=450	118.16 ± 49.07	207.80 ± 80.31	<0.0001	96.32 ± 94.19
Palmitic acid (C16:0)	n=443	2904.40 ± 1403.47	8511.32 ± 4293.76	<0.0001	234.69 ± 195.97
Stearic acid (C18:0)	n=451	690.31 ± 208.05	808.08 ± 202.10	<0.0001	25.99 ± 44.26
Total SFA	n=444	3765.31 ± 1614.17	9625.65 ± 4574.33	<0.0001	184.93 ± 154.49
MUFA					
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	n=444	186.37 ± 45.88	256.66 ± 89.61	<0.0001	42.94 ± 54.20
Oleic acid (C18:1n-9)	n=441	1444.74 ± 461.90	2843.85 ± 1251.92	<0.0001	108.61 ± 100.53
Total MUFA	n=442	1634.54 ± 500.21	3116.39 ± 1330.86	<0.0001	101.02 ± 93.05
n-6 PUFA					
Linoleic acid (LA) (C18:2n-6)	n=446	3355.67 ± 1230.19	6321.14 ± 2786.02	<0.0001	107.35 ± 111.69
Dihomo-γ-linolenic acid (DHGLA) (C20:3n-6)	n=450	229.99 ± 90.64	246.20 ± 85.27	0.001	19.38 ± 53.87
Arachidonic acid (AA) (C20:4n-6)	n=451	830.82 ± 276.15	722.63 ± 220.05	<0.0001	-6.33 ± 34.88
Total n-6 PUFA	n=444	4433.77 ± 1469.64	7278.06 ± 2919.04	<0.0001	77.85 ± 85.91
n-3 PUFA					
Eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5n-3)	n=446	35.03 ± 23.95	23.88 ± 16.93	<0.0001	-14.93 ± 68.21
Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n-3)	n=456	240.28 ± 73.47	236.60 ± 71.77	0.357	4.89 ± 37.7
Total n-3 PUFA	n=454	276.98 ± 94.07	260.52 ± 84.33	0.001	1.21 ± 38.34
Total LCFA	n=442	10,073.15 ± 3349.07	20,480.82 ± 8335.23	<0.0001	118.63 ± 103.14

Fatty acid concentration (μmol/L) of maternal serum and % of variation from the first to third trimester are presented as mean ± standard deviation (SD). SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acids. Total LCFA, long chain fatty acids = total SFA + total MUFA + total n-6 PUFA + total n-3 MUFA

to DHA [34]. Further research is needed to analyse their role during pregnancy.

In terms of PUFA, we found that n-6 PUFA concentrations increased during gestation, whereas essential fatty acid (EPA, DHA, AA) concentrations decreased or remained stable. Our results are partially in concordance with the literature. For instance, Zhao et al. [20] observed that Canadian pregnant women without diabetes showed higher serum concentrations of all fatty acids except EPA at 35–37 weeks of pregnancy than at 24–28 weeks. A systematic review found that levels of absolute concentrations of DHA increased and EPA did not change [16]. Pinto et al. [17], in a study involving Brazilian pregnant women, showed that from the first to second trimesters the serum FA concentrations, EPA + DHA, increased greatly, but a slight increase in DHA and a decrease in EPA (although not statistically significant) were observed in the third trimester. However, our study found no significant variation in DHA from the first to third trimesters and observed a significant decrease of around 15% in EPA concentrations. It may be that the DHA synthesis from EPA was more efficient than from ALA [35, 36] and that DHA concentrations could be regulated by a different biosynthesis or mobilization mechanism [35–38]. In

fact, n-6 and n-3 PUFA families compete for metabolism by desaturation enzymes, and therefore a Western or industrialized diet rich in vegetable oils that are high in LA would inhibit the synthesis of n-3 PUFA by ALA. In addition, AA is an essential fatty acid that is preferential for transfer to the foetus along with DHA [1]. Our findings show that AA concentrations also decrease by around 8% during pregnancy. Although LA serum concentrations increased, it does not appear that it was to be converted into AA, which may suggest that enzymatic activity of delta 5 desaturase could be reduced. Other researchers have suggested that LA may compete with other fatty acids, including AA, for acylation [39, 40]. In agreement with our results, Stewart et al. [38] found no differences in the AA concentrations of erythrocytes; however, other researchers have found an increase in AA serum concentrations during pregnancy [16, 17, 20]. The reasons for the different findings are unclear. It should be noted that the systematic review by Wilson et al. [16] included only three studies that assessed serum concentrations of FA, one from Brazil and two from the Netherlands, whose populations have different dietary patterns with a high level of heterogeneity between them. It is possible that the differences could be due to when the



measurements were taken, to sample size, the fatty acid assay protocol or the study populations. More research is needed to clarify how essential fatty acids change over the course of the entire pregnancy.

Furthermore, our study is a secondary analysis of a clinical trial of iron supplementation. In this sense, a physiological relationship between iron and fatty acids is

hypostatized since, for instance, ferritin may incorporate FA in its structure in addition to iron [41, 42]. However, our results did not show that the iron dosage of the supplementation had any effect on FA concentration.

To our knowledge this is the first study of the changes in maternal serum FA during pregnancy in a Mediterranean region. According our findings, circulating FA

– specifically SFA, MUFA and n-6 PUFA – increases throughout pregnancy. This could be explained by a synthesis mechanism or mobilization of the maternal fat store, since the concentrations may not be related to dietary intake. Given this situation, we could consider that the increase in SFA, MUFA and n-6 PUFA serum concentration during pregnancy seems to indicate that the metabolic mechanisms involved may offer an optimal nutritional availability to meet the increased demands of these FA due to the increased growth and development of the foetus at the end of gestation. Nevertheless, essential fatty acid concentrations, which are preferential for transfer to the placenta, may be more complexly regulated. During early pregnancy the PUFA derived from the diet are stored in maternal adipose tissue. Indeed, n-3 PUFA serum concentration has been related to food consumption in pregnant woman [8, 10, 17, 27] insofar as it is transferred from intake to maternal fat stores. The amount of n-3 PUFA stored in the maternal adipose tissue could vary depending on the habitual dietary intake of n-3 fatty acids. However, metabolic and physiological changes occur during pregnancy, and these involve the complex synchronization of maternal, placental and foetal fat metabolism to ensure a continuous supply of n-3 and n-6 PUFA to the foetus [35]. Some mechanisms could be related to the mobilization of maternal fat stores, an increase in the elongation and desaturation of FA regulated by oestrogen, the differential placental uptake of FA or the rate of DHA conversion synchronized according to the period of maximal foetal demand [35–38]. The transfer of n-3 and n-6 PUFA to the foetus increases from 20 weeks of gestation and reaches a peak in the last trimester of pregnancy with a high maternal transfer of DHA and AA to ensure foetal demand [1, 35]. Overall, this decrease or non-modification of essential fatty acids during pregnancy, closely related to their intake, indicates that there are specific physiological mechanisms, such as preferential FA transfer between mother and foetus, so as to ensure high foetal demands are met [35]. This might put the mother at risk of deficiency when her intake is insufficient. Indeed, it has been found that low n-3 PUFA status and imbalance between n-6 and n-3 PUFA in early pregnancy increase the risk of postpartum depression after delivery [10, 14]. This could lead us to consider that the mechanisms involved in its storage in maternal fat, together with other possible complex mechanisms of metabolic synchronization of maternal, placental and foetal fat could be insufficient to guarantee the FA needs in situations of low contributions. In general, for all FA, further testing of normal FA levels during pregnancy would be necessary for better evaluations and follow-ups. In addition, more research is needed on the metabolic mechanisms of FA during pregnancy.

Given that essential fatty acid concentrations and their balance depend on both biological mechanisms and dietary supply, an optimal dietary intake is needed to ensure proper functioning of biological mechanisms so as to facilitate correct foetal growth and development. For this reason, we believe that the pregnancy control reviews carried out by obstetricians and health professionals should include dietary advice on foods rich in these FA, verify consumption of these foods and thus FA, and determine the serum concentrations of essential FA. There is some evidence that supports the benefits of an adequate intake of FA. Fish and seafood consumption during pregnancy has been reported to be beneficial for offspring neurocognitive development [43, 44]. Several other research projects have associated an inadequate balance of n-3 and n-6 PUFA profiles during pregnancy with deleterious consequences for the child, such as neurodevelopment disorder [43, 6], immune system disease [45, 46] and cardiometabolic risk and adiposity [47, 48]. In addition, AA is a precursor of prostaglandin and other metabolites, which play a key role in the late pregnancy period and delivery [49]. Nevertheless, an excessive activation of inflammatory mediators during pregnancy might lead to deleterious effects, such as gestational diabetes, preeclampsia or pre-term delivery [15].

The main strength of our study is its longitudinal design, which enabled us to analyse variations in serum FA concentrations throughout pregnancy. Another strength is the bigger sample size compared to other research [17–21]. However, several limitations should be considered. Although the sample is of voluntary pregnant women from a randomized clinical trial with a control group, the sample avoids the selective survival error by selecting women from each area of the primary health care ASSIR service specific for pregnant women, from an entire region. This provided a good representation of the socioeconomic and educational levels of the sample, among other aspects. In addition, exhaustive inclusion and exclusion criteria were fulfilled, previously designed and agreed on with the ASSIR service, thus guaranteeing a sample of healthy pregnant adult women. Incentives were given to minimize the loss of women in the pregnancy follow-up, consisting of follow-up visits interspersed with study visits, economic incentives for midwives who carried out these visits, and informational incentives for mothers about their health status and that of their baby. In the design phase of the study, all procedures, masking and quality control were systematized and monitored by a group external to the research group. Nevertheless, our findings may not be extended to all populations as ethnicity, nutritional habits and lifestyle may impact on the fatty acid levels. In the assessment of FA, it was not possible to assess ALA, one of the main

n-3 PUFA, in our sample. Furthermore, due to the lack of reference values, our study was unable to apply a cut-off value regarding the percentage of the pregnant population that is above or below the optimal level. Therefore, our findings indicate that it is necessary to establish reference values according to the variation of FA in each trimester. Moreover, taking into account that our results show a decrease in essential fatty acids at the end of pregnancy due to the demands of the foetus, health and nutrition counselling provided by obstetricians and health professionals could add that mothers consume foods rich in FA from the beginning of the pregnancy to prevent levels from dropping excessively at the end of gestation. In addition, clinical guidelines during pregnancy could include the assessment of FA in each trimester, so that professionals could identify those women who are at risk and recommend specific treatment or advice if necessary.

In conclusion, the circulating serum concentration of SFA, MUFA and n-6 PUFA increases during pregnancy, whereas essential fatty acids such as AA and EPA decrease and DHA remains unchanged. Therefore, the increase in SFA, MUFA and n-6 PUFA serum concentration during pregnancy, which is related to specific metabolic mechanisms during pregnancy, seems to offer an adequate availability of these FA for increased foetal growth and development at the end of pregnancy. However, the decrease or non-increase in essential fatty acids during pregnancy may indicate that there are specific physiological mechanisms that might put the mother at risk of deficiency when her intake is insufficient. More research is necessary to analyse the role of FA during pregnancy.

Abbreviations

FA: Fatty acids; SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; n-6 PUFA: Omega-6 polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFA: Omega-3 polyunsaturated fatty acids; DHA: Docosahexaenoic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; AA: Arachidonic acid; LA: Linoleic acid; ALA: α -linolenic acid.

Acknowledgments

We thank the Jordi Gol Research Institute in Primary Care (Institut d'Investigació en Atenció Primària; IDIAP) for their guidance regarding ethical matters. We also thank the entities and participants in the ECLIPSES study: Research Group in Nutrition and Mental Health (NUTRISAM), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; Sexual and Reproductive Health Care Services (ASSIR) of Tarragona, Spain, and the team of midwives recruiting for the study; the research support Unit-Tarragona and Central Unit-Barcelona of the Institut d'Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Institut Català de la Salut; Laboratory of Institut Català de la Salut (ICS), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain. Finally, we thank the Centre for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the Universitat Rovira i Virgili-Eurecat for their contribution to the chromatographic and mass spectrometry analysis.

Authors' contributions

VA conceptualized, designed, and coordinated the study. VA and JC conducted the research and research process. CM-G and EA analysed the data. EA, CM-G, VA, CH-M, NV and JC contributed to the curation of data. EA, CM-G, VA prepared and wrote the original draft of the manuscript. EA, CM-G, VA, CH-M,

NV, JC contributed to writing, reviewing and editing the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The study was funded by a grant (PI12/02777) from the Health Research Fund of the Ministry of Health and Consumption (Madrid, Spain) (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo) and co-funded by the European Union (ERDF/ESF, "A way to make Europe"/"Investing in your future"). The funding bodies played no part in the design of the study, collection and interpretation of data, or decision to publish.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are only available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Research Institute in Primary Care [Institut de Investigació en Atenció Primària; IDIAP], the Pere Virgili Institute for Health Research (Institut de Investigació Pere Virgili; IISPV), and the Spanish Agency for Medicines and Health Products [Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios; AEMPS] (AEMPS IIG-FER-2012 on Jul 9, 2018). The study is registered in ClinicalTrials.gov with identification number NCT03196882 and in the EU Clinical Trial Register, EUCTR-2012-005480-28. All participants who agreed to participate signed the informed consent form.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Research Group on Nutrition and Mental Health (NUTRISAM), Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Spain. ²Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43003 Tarragona, Spain. ³Clinical Chemistry Laboratory, Catalan Institute of Health (ICS)-Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre, Joan XXIII University Hospital in Tarragona, 43005 Tarragona, Spain. ⁴Research Center for Behavior Assessment (CRAMC), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain.

Received: 14 June 2021 Accepted: 26 October 2021

Published online: 17 November 2021

References

1. Duttaroy A, Basak S. Maternal dietary fatty acids and their roles in human placental development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2020;55:102080. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102080>.
2. Birch EE, Carlson SE, Hoffman DR, Fitzgerald-Gustafson MK, Fu VLN, Drover JR, et al. The DIAMOND (DHA intake and measurement of neural development) study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:848–59. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28557>.
3. Campoy C, Escolano-Margarit M, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr*. 2012;107(Suppl2):S85–S106. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001493>.
4. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med*. 2008;36:5–14. <https://doi.org/10.1515/JPM.2008.001>.

- Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harsløf LBS, Ciappolino V, Agostoni C. DHA effects in brain development and function. *Nutrients*. 2016;8:6 <https://doi.org/10.3390/nu8010006>.
- Steenweg-de Graaff J, Tiemeier H, Ghassabian A, Rijlaarsdam J, Jaddoe VWW, Frank C, et al. Maternal fatty acid status during pregnancy and child autistic traits: the generation R study. *Am J Epidemiol*. 2016;183:792–9 <https://doi.org/10.1093/aje/kww263>.
- Campoy C, Azaryah H, Torres-Espinola FJ, Martínez-Zaldívar C, García-Santos JA, Demmelmair H, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids, Homocysteine at birth and fatty acid Desaturase gene cluster polymorphisms are associated with Children's processing speed up to age 9 years. *Nutrients*. 2020;13:131 <https://doi.org/10.3390/nu13010131>.
- Hoge A, Bernardy F, Donneau AF, Dardenne N, Degée S, Timmermans M, et al. Low omega-3 index values and monounsaturated fatty acid levels in early pregnancy: an analysis of maternal erythrocytes fatty acids. *Lipids Health Dis*. 2018;17:1–11 <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0716-6>.
- Gellert S, Schuchardt JP, Hahn A. Higher omega-3 index and DHA status in pregnant women compared to lactating women—results from a German nation-wide cross-sectional study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016;109:22–8 <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.04.002>.
- Markhus MW, Rasinger JD, Malde MK, Frøyland L, Skotheim S, Braarud HC, et al. Docosahexaenoic acid status in pregnancy determines the maternal Docosahexaenoic acid status 3-, 6- and 12 months postpartum. Results from a longitudinal observational study. *PLoS One*. 2015;10:e0136409 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136409>.
- Shrestha N, Sleep SL, Cuffe JSM, Holland OJ, Perkins AV, You SY, et al. Role of omega-6 and omega-3 fatty acids in fetal programming. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020;47:907–15 <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13244>.
- Shrestha N, Holland OJ, Kent NL, Perkins AV, McAinch AJ, Cuffe JSM, et al. Maternal high linoleic acid alters placental fatty acid composition. *Nutrients*. 2020;12:2183 <https://doi.org/10.3390/nu12082183>.
- Vaz JS, Kac G, Nardi AE, Hibbeln RJ. Omega-6 fatty acids and greater likelihood of suicide risk and major depression in early pregnancy. *J Affect Disord*. 2014;152-154:76–82 <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.04.045>.
- Hoge A, Tabar V, Donneau AF, Dardenne N, Degée S, Timmermans M, et al. Imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy is predictive of postpartum depression in a Belgian cohort. *Nutrients*. 2019;11:1–14 <https://doi.org/10.3390/nu11040876>.
- Szczuko M, Kikut J, Komorniak N, Bilicki J, Celewicz Z, Ziętek M, et al. The role of Arachidonic and linoleic acid derivatives in pathological pregnancies and the human reproduction process. *Int J Mol Sci*. 2020;21:9628 <https://doi.org/10.3390/ijms21249628>.
- Wilson NA, Mantziaris E, Middleton PT, Muhlhauser BS. Gestational age and maternal status of DHA and other polyunsaturated fatty acids in pregnancy: a systematic review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2019;144:16–31 <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.04.006>.
- Pinto TJ, Farias DR, Rebelo F, Lepsch J, Vaz JS, Moreira JD, et al. Lower interpartum interval and unhealthy life-style factors are inversely associated with n-3 essential fatty acids changes during pregnancy: a prospective cohort with Brazilian women. *PLoS One*. 2015;10:e0121151 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121151>.
- Al MD, van Houwelingen AC, Hornstra G. Relation between birth order and the maternal and neonatal docosahexaenoic acid status. *Eur J Clin Nutr*. 1997;51:548–53 <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600444>.
- Al MD, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart THM, De Jong AEP, Hornstra G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Br J Nutr*. 1995;74:55–68 <https://doi.org/10.1079/BJN19950106>.
- Zhao JP, Levy E, Shatenstein B, Fraser WD, Julien P, Montoudis A, et al. Longitudinal circulating concentrations of long-chain polyunsaturated fatty acids in the third trimester of pregnancy in gestational diabetes. *Diabet Med*. 2016;33:939–46 <https://doi.org/10.1111/dme.12978>.
- Otto SJ, Houwelingen AC, Antal M, Manninen A, Godfrey K, López-Jaramillo P, et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr*. 1997;51:232–42 <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600390>.
- Arija V, Fargas F, March G, Abajo S, Basora J, Canals J, et al. Adapting iron dose supplementation in pregnancy for greater effectiveness on mother and child health: protocol of the ECLIPSES randomized clinical trial. *BMC Pregnancy Child*. 2014;14:33 <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-33>.
- Iglesias I, Arija V, Aranda N, Aparicio E, Serrat N, Fragas F, et al. The effectiveness of different doses of Iron supplementation and the prenatal determinants of maternal Iron status in pregnant Spanish women: ECLIPSES study. *Nutrients*. 2019;11:2418 <https://doi.org/10.3390/nu11102418>.
- Institut d'Estadística de Catalunya. *Classificació catalana d'ocupacions 2011 (CCO-2011)*. [Institut d'Estadística de Catalunya]. Catalunya: Spain; 2011.
- World Health Organization. *Global Database on Body Mass Index*. 2006. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. Accessed 18 Jan 2019.
- David F, Tienpont B, Klee MS, Tripp P. Automated Sample Preparation for Profiling Fatty Acids in Blood and Plasma Using the Agilent 7693. *Agil Appl Note [Internet]*. 5990-4822E. 2009. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4822EN.pdf> Accessed 20 Jan 2021.
- Aparicio E, Martín-Grau C, Bedmar C, Serrat N, Basora J, Arija V. Maternal factors associated with levels of fatty acids, specifically n-3 PUFA during pregnancy: ECLIPSES study. *Nutrients*. 2021;13:317 <https://doi.org/10.3390/nu13020317>.
- Mowbray F, Fox-wasylyshyn SM, El-masri MM. Univariate outliers: a conceptual overview for the nurse researcher. *Can J Nurs Res*. 2019;51:31–7 <https://doi.org/10.1177/0844562118786647>.
- Cousineau D, Chartier S. Outliers detection and treatment: a review. *Int J Psychol Res*. 2011;3:58–67 <https://doi.org/10.21500/201112084844>.
- Lepsch J, Vaz JS, Moreira JD, Pinto TJ, Soares-Mota M, Kac G. Food frequency questionnaire as an indicator of the serum composition of essential n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy, according to body mass index. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28:85–94 <https://doi.org/10.1111/jhn.12225>.
- Marchioni DM, de Oliveira MF, Carioca AAF, Miranda AAM, Carvalho AM, Oki E, et al. Plasma fatty acids: biomarkers of dietary intake? *Nutrition*. 2019;59:77–82 <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.08.008>.
- Aparicio E, Jardí C, Bedmar C, Pallejà M, Basora J, Arija V. The Eclipses study group. Nutrient intake during pregnancy and post-partum: ECLIPSES study. *Nutrients*. 2020;12:1325 <https://doi.org/10.3390/nu12051325>.
- Ogundipe E, Johnson MR, Wang Y, Crawford MA. Peri-conception maternal lipid profiles predict pregnancy outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016;114:35–43 <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.08.012>.
- Gibson RA, Muhlhauser B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr*. 2011;7(Suppl 2):17–26 <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x>.
- Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr*. 2010;21:237–55 <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104742>.
- Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*. 2002;88:411–20 <https://doi.org/10.1079/BJN2002689>.
- Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, et al. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biol Reprod*. 2012;87(14):1–11 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098095>.
- 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;42:335–44 <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3005-5>.
- Adam O, Wolfram G, Zöllner N. Influence of dietary linoleic acid intake with different fat intakes on arachidonic acid concentrations in plasma and platelet lipids and eicosanoid biosynthesis in female volunteers. *Ann Nutr Metab*. 2003;47:31–6 <https://doi.org/10.1159/000068906>.
- Friesen RW, Innis SM. Linoleic acid is associated with lower long-chain n-6 and n-3 fatty acids in red blood cell lipids of Canadian pregnant women. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:23–31.
- Zanzoni S, Pagano K, D'Onofrio M, Assfalg M, Ciambellotti S, Bernacchioni C, et al. Unsaturated long-chain fatty acids are preferred ferritin ligands that enhance Iron biomineralization. *Chemistry*. 2017;23:9879–87. <https://doi.org/10.1002/chem.201701164>.
- Bu W, Liu R, Cheung-Lau JC, Dmochowski JJ, Loll PJ, Eckenhoff RG. Ferritin couples iron and fatty acid metabolism. *FASEB J*. 2012;26:2394–400. <https://doi.org/10.1096/fj.11-198853>.

43. Hibbeln JR, Spiller P, Brenna JT, Golding J, Holub BJ, Harris WS, et al. Relationships between seafood consumption during pregnancy and childhood and neurocognitive development: two systematic reviews. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2019;151:14–36 <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.10.002>.
44. Julvez J, Méndez M, Fernández-Barres S, Romaguera D, Vioque J, Llop S, et al. Maternal consumption of seafood in pregnancy and child neuropsychological development: a longitudinal study based on a population with high consumption levels. *Am J Epidemiol*. 2016;183:169–82 <https://doi.org/10.1093/aje/kwv195>.
45. Montes R, Chisaguano AM, Castellote ME, Sunyer J, López-Sabater MC. Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67:658–63 <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.68>.
46. Notenboom ML, Mommers M, Jansen EH, Penders J, Thijs C. Maternal fatty acid status in pregnancy and childhood atopic manifestations: KOALA birth cohort study. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:407–16 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03672.x>.
47. Jochems SH, Gielen M, Rump P, Hornstra G, Zeegers MP. Potential programming of selected cardiometabolic risk factors at childhood by maternal polyunsaturated fatty acid availability in the MEFAB cohort. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;100:21–7 <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.06.001>.
48. Vidakovic AJ, Jaddoe VW, Voortman T, Demmelmaier H, Koletzko B, Gaillard R. Maternal plasma polyunsaturated fatty acid levels during pregnancy and childhood lipid and insulin levels. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27:78–85 <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.10.001>.
49. Kikut J, Komorniak N, Ziętek M, Palma J, Szczuko M. Inflammation with the participation of arachidonic (AA) and linoleic acid (LA) derivatives (HETEs and HODEs) is necessary in the course of a normal reproductive cycle and pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2020;141:103177 <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103177>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3. PUBLICACIÓN 3. Trimester-specific reference ranges for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in serum of pregnant women: a cohort study from the ECLIPSES Group.

Carla Martín-Grau, Ramón Deulofeu, Núria Serrat Orus, Victoria Arija and on behalf of the ECLIPSES Study Group. Trimester-Specific Reference Ranges for Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Serum of Pregnant Women: A Cohort Study from the ECLIPSES Group. *Nutrients*, 2021, 13 (11), 4037 (doi: 10.3390/nu13114037) [240].

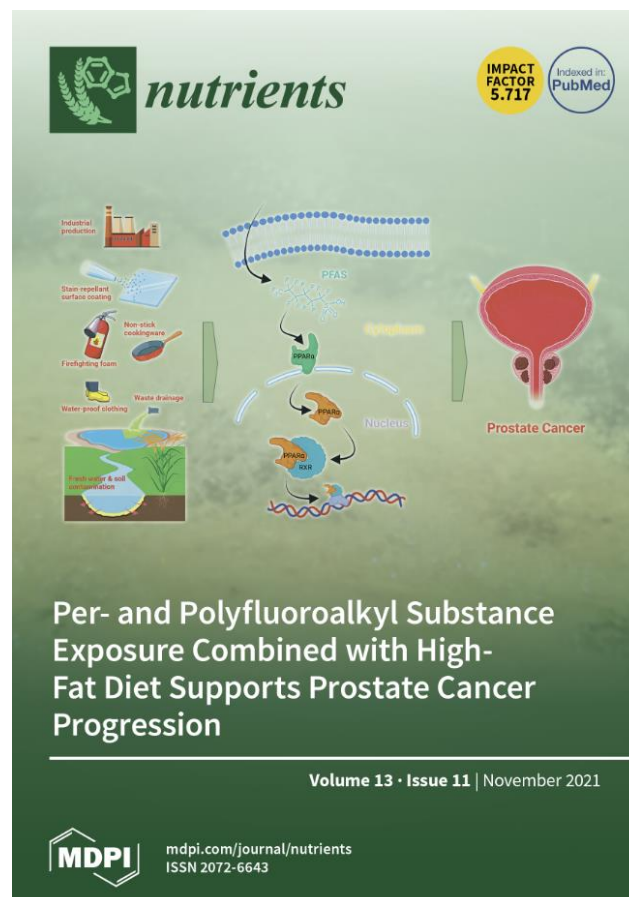
Tipo de publicación: artículo científico.

Estado: publicado en noviembre de 2021.

Métricas de la revista *Nutrients*:

Factor de impacto: 6,706 (según JCR, del inglés *Journal Citation Report*).

Categoría: en el primer cuartil (Q1) en *Nutrition & Dietetics y Food Science*.





Article

Trimester-Specific Reference Ranges for Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Serum of Pregnant Women: A Cohort Study from the ECLIPSES Group

Carla Martín-Grau ^{1,2}, Ramón Deulofeu ³, Nuria Serrat Orus ¹, Victoria Arijá ^{2,4,5,*}
and on behalf of the ECLIPSES Study Group [†]

- ¹ Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Institut Català de la Salut, Generalitat de Catalunya, University Hospital Joan XXIII, 43005 Tarragona, Spain; carla.mg324@gmail.com (C.M.-G.); nserrat.tarte.ics@gencat.cat (N.S.O.)
- ² Nutrition and Mental Health Research Group (NUTRISAM), Faculty of Medicine and Health Science, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Spain
- ³ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic Universitari, CiberEHM, 08036 Barcelona, Spain; deulofeu@clinic.cat
- ⁴ Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, 43003 Tarragona, Spain
- ⁵ Tarragona-Reus Research Support Unit, Jordi Gol Primary Care Research Institute, 43003 Tarragona, Spain
- * Correspondence: victoria.arija@urv.cat; Tel.: +34-977-759-334
- † The ECLIPSES Study Group is provided in the Acknowledgments.



Citation: Martín-Grau, C.; Deulofeu, R.; Serrat Orus, N.; Arijá, V.; on behalf of the ECLIPSES Study Group. Trimester-Specific Reference Ranges for Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Serum of Pregnant Women: A Cohort Study from the ECLIPSES Group. *Nutrients* **2021**, *13*, 4037. <https://doi.org/10.3390/nu13114037>

Academic Editor: Martine Armand

Received: 15 October 2021
Accepted: 10 November 2021
Published: 12 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In the course of pregnancy, increasing importance is being placed on maintaining optimal fatty acid (FA) levels and particularly n-3 PUFAs to ensure correct fetal development. However, reference ranges for FA have been reported in only a few studies. Our objective is to provide quantitative reference intervals for SFAs, MUFAs, and PUFAs (n-6 and n-3) in a large population of healthy pregnant women from a developed country. A prospective study of pregnant women ($n = 479$) was conducted from the first trimester (T1) to the third trimester (T3). A total of 11 fatty acids were analyzed in serum by gas chromatography mass spectrometry and were expressed as absolute ($\mu\text{mol/L}$) and relative (percentage of total FA) concentration units. Serum concentrations of SFAs, MUFAs, n-6 PUFAs, n-3 PUFAs, various FA ratios, and the EFA index were determined. The reference intervals (2.5/97.5 percentiles) in absolute values from T1 ranged from 1884.32 to 8802.81 $\mu\text{mol/L}$ for SFAs, from 959.91 to 2979.46 $\mu\text{mol/L}$ for MUFAs, from 2325.77 to 7735.74 $\mu\text{mol/L}$ for n-6 PUFAs, and from 129.01 to 495.58 $\mu\text{mol/L}$ for n-3 PUFAs. These intervals mainly include the values of other studies from European populations. However, reference ranges vary according to some maternal factors. The FA levels proposed, obtained from a large sample of pregnant women, will be a useful tool for assessing the degree of adequacy of FAs in pregnant women and will help to carry out dietary interventions based on certain maternal factors.

Keywords: individual c14-c24; fatty acid status; maternal nutrition; pregnancy; reference intervals

1. Introduction

Maternal diet during the periconceptional, pregnancy and lactation period is important for both mother and child [1,2], and specifically, the fatty acid (FA) levels play a crucial role during pregnancy [3–5]. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are specially critical regarding central nervous system, retinal photoreceptors, and immune systems development [6]. Correct concentrations (or status) both in the first trimester (T1) and the third trimester (T3) of pregnancy are of great importance considering their role during the onset of neurogenesis [7,8], and the fetal brain development [8]. Consequently, maternal serum FA levels change in the course of pregnancy, depending on fetal requirements. In this context, it is necessary to monitor FA concentration values throughout pregnancy so that deficiency can be detected. Based on this, reference ranges are the most

useful tool to evaluate the adequacy of nutritional status [9], and even in future studies these values can be used to identify women who are at risk of an adverse health outcome.

In the little literature that does exist, reference ranges for individualized FA in serum are normally reported in non-pregnant adults [10–13]. Apparently, North European populations have a higher content of total saturated fatty acids (SFAs) and a lower content of monounsaturated fatty acids (MUFAs) circulating in serum [13–15] than North American populations [11,12]. Furthermore, in populations of healthy pregnant women, serum reference values have only been described in a Brazilian cohort of 225 pregnant women [16] and in a Norwegian cohort of 247 pregnant women [17]. All these populations show different dietary patterns from the one in our study. In the Mediterranean population, the composition of the diet is well-known for its low content of SFAs, and high content of MUFAs and n-3 PUFAs, mainly derived from olive oil and fish consumption [18,19]. Consequently, reference values of circulating FA should be measured in different populations based on their lifestyle.

Additionally, FAs can be measured in serum, erythrocyte, or adipose tissue. It is well-recognized that FA levels in serum reflect short-term intake [20], and are more representative of the current dietary habits of subjects [21]. However, other authors have analyzed FAs in the erythrocyte membrane for assessing FA status as it reflects the last 30–60 days of intake [7,17] so comparisons among studies are difficult. In previous studies, the analysis of an individual FA may be found expressed either quantitatively or qualitatively as a relative percentage of total FAs. Without standardizing the criteria for providing an appropriate reference range, there is a great risk of misinterpretation. In this regard, the problem of presenting findings such as relative values is that they are difficult to compare since percent composition values depend on the set of individual FAs investigated [10,11]. By contrast, absolute values are not dependent upon the relative abundance of other FAs and the measurement of an individual FA reduces analysis costs thus could be included in routine clinical practice of laboratories and not be limited to research studies. A quantitative approach may potentially be more appropriate for analyzing whether FAs are associated with the risk of an adverse health outcome.

To support the measurement of individual FAs, the use of n-6/n-3, arachidonic acid (AA)/EPA, AA/(EPA + DHA) and linoleic acid (LA)/Dihomo- γ -linolenic acid (DHGLA) ratios and the essential fatty acid (EFA) index are also helpful in assessing the degree of adequacy of FAs. The increase in the AA/EPA ratio has been positively correlated with pro-inflammatory eicosanoids and associated with metabolic diseases [22,23]. An imbalance between AA and EPA + DHA was found to be associated to preterm delivery [22,24]. High LA/DHGLA ratios indicate an enzymatic deficit of delta-6-desaturase activity. Delta-6-desaturase is predominantly involved in the PUFA biosynthesis pathway and converts LA and alpha-lipoic acid (ALA) into their metabolites DHGLA, AA, EPA and DHA [3,7], although it can also catalyze palmitic acid and stearic acid thus affecting MUFA levels [25]. The n-6/n-3 ratio reflects the predominant PUFA family in serum and the formation of inflammatory mediators, which play important roles in pregnancy pathologies [26,27]. According to the available data, no study has reported reference intervals for serum n-6/n-3, AA/EPA, AA/(EPA + DHA) and LA/DHGLA ratios, or the EFA index in pregnant women. While providing these reference ranges, future studies will allow correlating newborn adverse outcomes with an individual FA abnormality or any ratio imbalance.

To our knowledge, no study has evaluated maternal FAs status and ratios in European Mediterranean countries, and including a large majority of SFAs, MUFAs and PUFAs. Considering the lack of reference intervals for pregnant women in the literature and the absence of interpretative criteria, the aim of this study was to provide the reference intervals for serum SFA, MUFA and PUFA (n-6 and n-3) in a large population of healthy pregnant women from a Mediterranean country in T1 and T3 of gestation, expressed both as concentrations and as percentages of the total concentration of FA in serum samples.

2. Materials and Methods

2.1. Population and Study Design

A prospective study of pregnant women was conducted from T1 to T3 (12 ± 0.5 and 36 ± 0.4 gestational week, respectively). Participants were healthy pregnant women from the ECLIPSES study [28,29] which is a randomized, triple-blind clinical trial of different doses of iron supplementation (20 mg/day, 40 mg/day 80 mg/day), registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (accessed on 9 November 2021) identification number NCT03196882, and in the European Union (EU) Clinical Trial Register, EUCTR-2012-005480-28. The present study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Institute for Primary Care Research (IDIAP) and the Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV). Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

The flow of participants and data is outlined in Figure 1. The inclusion criteria were as follows: healthy adult women older than 18 years at ≤ 12 weeks of gestation, who were able to understand the local languages (Spanish or Catalan) and the characteristics of the study. Some of the medium risk criteria and all the high risk criteria described in the Catalan pregnancy monitoring protocol [30] were used as exclusion criteria such as multiple pregnancies, underweight, morbid obesity, previous severe disease (immunosuppression), or any chronic disease that could affect nutritional development (cancer, pre-gestational diabetes mellitus, malabsorption, chronic hepatitis and liver cirrhosis).

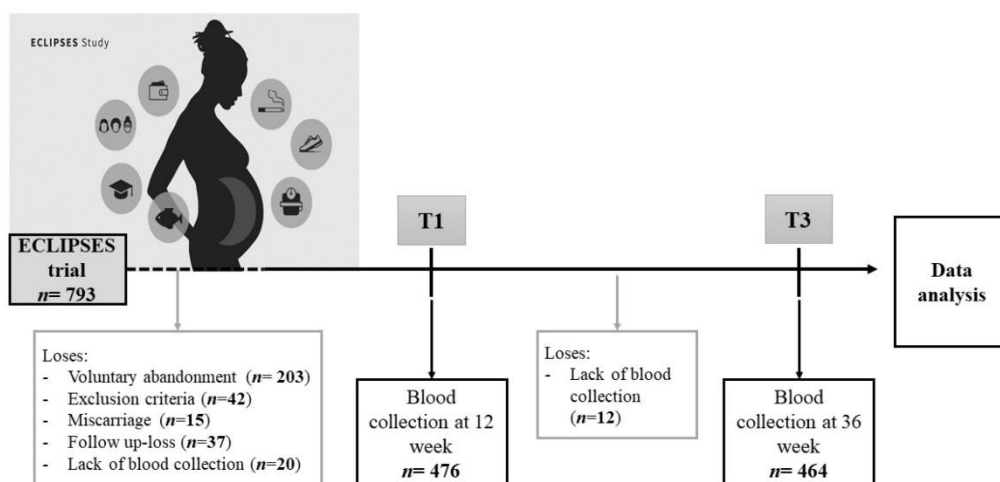


Figure 1. Flow chart of the study population.

The medical, socioeconomic, educational level and lifestyle information is shown in Table 1. The socioeconomic level was calculated by using the Catalan classification of occupations (CCO-2011) [31] such as student, employed and unemployed. The education level was classified as primary (low), high school (medium) and university studies or more (high). Physical activity was assessed by using the International Physical Activity Questionnaire [32] and was summed to obtain the total physical activity in metabolic equivalents (METs)/week. Based on total physical activity, participants were classified into 3 levels: low (< 600 METs/week), moderate (≥ 600 – 2999 METs/week) and high (≥ 3000 METs/week). BMI was calculated and classified by following WHO criteria [33]: normal weight (BMI = 18.5 – 24.9 kg/m²), overweight (BMI = 25.0 – 29.9 kg/m²) and obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) at T1. The Spanish diet quality index (SQDI) [34] was estimated from nine food groups (protein foods, dairy foods, cereals, fruits, vegetables, oil, legumes, tubers, sweets). A score was obtained ranging from 0 points (low quality diet) to 18 points (high

quality diet). Women were then classified into two categories: low-medium diet quality (score from 0 to 10) and high diet quality (score from 11 to 18). Further information can be found in our previous paper [29].

Table 1. Sociodemographic and lifestyle characteristics of pregnant women ($n = 455$).

General Characteristics	Summary Statistics
Maternal age (years) ^a	30.6 ± 5.01
Country of origin, Spain (%)	84.1
Primipara (%)	37.5
Gestational age (weeks) ^a	39.8 ± 1.08
BMI (kg/m ²) at first trimester (%)	
18.5–24.9 (normal weight)	62.2 (22.10 ± 1.76) ^a
25.0–29.9 (overweight)	25.3 (27.32 ± 1.33) ^a
≥30 (obesity)	12.5 (33.31 ± 2.91) ^a
Gestational weight gain (kg) ^a	10.86 ± 3.66
Maternal educational level (%)	
Low (primary or less)	30.1
Medium (high school)	38.3
High (university or more)	31.6
Occupation (%)	
Student	2.4
Employed	87.1
Unemployed	10.5
Smoking status (%)	
Smoker	15.3
Non-Smoker	69.5
Ex-Smoker	15.3
Maternal alcohol consumption (%)	14
Physical Activity (METs/week) (%)	
Low (<600)	56.4
Moderate (≥600–2999)	39.4
High (≥3000)	4.2
SQDI (score) ^a	9.73 ± 2.64

^a Mean ± standard deviation. Abbreviation: BMI, body mass index; SQDI, Spanish Diet Quality Index; METs, Metabolic equivalents.

2.2. Sample Preparation and GC-MS Conditions

2.2.1. Extraction, Transfer and Storage of Biological Samples

Serum samples were collected both T1 and T3 after fasting into 7.5 mL tubes without anticoagulant and were left without mixing for 30 min at room temperature to enable coagulation. The serum was separated by centrifugation and stored into aliquots of 500 µL at −80 °C inside the BioBank. Samples were thawed at the end of the study and processed simultaneously to minimize inter-batch variation [28].

2.2.2. Sample Preparation and GC-MS Conditions

The method starts with a 50 µL serum sample mixed with IS and the derivatization reagent (chloroform and methanolic hydrochloric acid). Then the sample is heated and mixed at 80 °C for 2 h. In this step, the lipidic fraction in blood or serum consisting of free FAs, sterol esters, glycerol esters (mainly triglycerides), and phospholipids were hydrolyzed and methylated into fatty acid methyl esters (FAMES). Three sequential heating and mixing steps are done every 10 min during a 30-min period. After this, a 100 µL of

iso-octane was added and the fatty acid methyl esters were extracted by a liquid-liquid extraction using hexane, and analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) combination using the 7890A GC coupled to triple quadrupole MS QQQ 7000 Series® (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Chromatographic analysis was based on David et al. [35] to determine the 36 FAMES included in the Food Industry FAME Mix (Restek Corporation). Briefly, the FAMES were separated into a high-polarity column (100 m × 250 μm × 0.25 μm) (HP-88 column, Agilent Technologies) using a temperature program ranging between 140 and 240 °C at a 10°/min pace using helium as the carrier gas at 1 mL/min. Ionization was carried out by electronic impact (70 eV), and the mass analyzer was operated in Selected Ion Monitoring (SIM) mode. The CG-MS system was controlled by the Agilent MassHunter® Workstation.

2.3. Data Analysis

A total of 36 FAs were analyzed although FA values below the limit of detection were not shown. In addition, a selection of FAs is presented such as the sum of the total saturated (Σ total SFA = C:12 + C:14 + C:16 + C18:0), total monounsaturated (Σ total MUFA = C16:1n-7 + C18:1n-9), total n-6 polyunsaturated (Σ total n-6 PUFA = C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6) and total n-3 polyunsaturated (Σ total n-3 PUFA = C20:5n-3 + C22:6n-3) fatty acids; furthermore, some index were also calculated such as the n-6 to n-3 fatty acids ratio (Σ total n-6 PUFA/ Σ total n-3 PUFA) and the essential fatty acids (EFA) index (sum of the (essential) n-3 and n-6 PUFAs/sum of the (non-essential) n-7 and n-9 FAs), which reflects the overall EFA status.

FAs were expressed as absolute (μmol/L) or relative (percentage of total FA) concentration units. The method for calculating the percentage of total fatty acids is based on total FA concentration. To assist in the evaluation of overall nutritional status, reference intervals were determined following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 guidelines [9] and represented the central 95% of the tested population (being the 2.5% and 97.5% confidence intervals the lower and upper limits, respectively). The FA values were analyzed using Agilent MassHunter® Quantitative Analysis B.06 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The results were expressed as mean ± standard deviation (SD) for normally distributed data. In this study, z-score analysis was used to detect outlier values in the population data [36]. An absolute z-score value above or below ±3.29 is considered to be an outlier when the sample size is >100 [37]. Correlations between the absolute and relative concentrations of FA in serum were computed using Pearson's correlation coefficient test. All multiple linear regression models were performed using the ENTER method for total FAs, total SFA, total MUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, LA, DHA and AA to evaluate the relation between maternal factors and FA levels. The models were adjusted for maternal factors, such as maternal age, occupation (student, employed, unemployed), educational level (low, medium, high), ethnicity (Spanish, non-Spanish women), parity (no, yes), initial BMI (Kg/m²), gestational weight gain (Kg/m²), maternal smoking status (no, yes), maternal alcohol consumption (no, yes), physical activity in METs/week (score), and SQDI (score). Data was processed using the statistical software package SPSS version 25.0 for Windows and Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Participants' Characteristics

The general characteristics of the pregnant women participating in the ECLIPSES study are given in Table 1. A total of 455/476 women answered the questions about sociodemographic and lifestyle characteristics. Most women had a medium educational level (38.3%) and were employed (87.1%). The maternal age was 30.6 ± 5.01 years old. The participants reported that 15.3% smoked and 14% drank at the beginning of pregnancy. Regarding physical activity, 56.4% of the women had a low level.

3.2. Fatty Acid Status in Serum of Pregnant Women

This study determined saturated, mono- and polyunsaturated FAs in 476 maternal serum samples at T1 and T3. A total of 36 FAs were analyzed although only 11 FAs were detected in serum of pregnant women and were summarized in Tables 2 and 3. The FA composition in maternal serum is represented as absolute (Table 2) and relative (Table 3) FA concentrations (mean \pm SD) in both T1 and T3. The absolute total amount of FAs in maternal serum increased during pregnancy (T1, 10073.15 μ mol/L and T3, 20,480.82 μ mol/L, $p < 0.01$) and the highest individual FAs were C16:0, C18:1n-9 and C18:2n-6 at both T1 and T3.

To compare the two reporting schemes, Pearson's correlations coefficients were calculated between FA values expressed in absolute and relative terms for the whole sample, which ranged from 464–476 serum samples, according to data available both in T1 and T3 of pregnancy (Supplementary Table S1). In T1, significant and positive correlations ($p < 0.01$) were observed for C12:0, C14:0, C16:0, C18:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:6n-6, Σ total SFA, Σ total n-6 PUFA and Σ total n-3 PUFA. However, the Pearson's correlation coefficient was moderate ($r < 0.5$) for the most of FAs in T1 with the exception of C16:0 ($r = 0.676$), C20:5n-3 ($r = 0.859$) and Σ total SFA ($r = 0.541$) for which a strong correlation was observed. In contrast, non-significant correlations were observed for C18:0, C16:1n-7, C18:1n-9 and Σ total MUFA. In T3, a positive correlation ($p < 0.01$) was observed for all FAs with the exception of C18:0 for which a moderate negative correlation ($p < 0.01$, $r = -0.387$) was observed. In T3, the Pearson's correlation coefficient was low-moderate ($r = 0.1-0.5$) with the exception of C12:0 ($r = 0.635$), C16:0 ($r = 0.724$), C20:5n-3 ($r = 0.763$) and Σ total SFA ($r = 0.605$) for which a strong correlation was observed. At both sampling times T1 and T3, the FA with the highest strong positive correlation (T1, $r = 0.859$ and T3, $r = 0.763$) was C20:5n-3.

The corresponding percentiles of FAs during T1 and T3 were calculated and showed in Tables 2 and 3 and expressed as either an absolute concentration or a percentage of total FAs. Consequently, our reference ranges for relative concentration can be compared to the results expressed as mean \pm SD from other European studies [14,15,19,38,39] shown in Table 4. The levels of individual FAs that were distinct from the 2.5 or 97.5 percentiles of the present study are indicated in Table 4.

3.3. Influence of Maternal Factors on Fatty Acid Serum Profiles

Multiple linear regression models of the influence of maternal determinants on total FAs, total SFA, total MUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, LA, DHA, and AA are shown in Table 5. It can be observed that women with BMI > 30 kg/m² had significantly higher levels of total SFA, total MUFA and AA in both trimesters of pregnancy. Moreover, educational level and ethnicity were significantly associated with higher values of total n-3 PUFA and DHA in T1, and lower values of total SFA, total MUFA and AA in T3. In T1, only low physical activity was associated with lower values of DHA. However, DHA and total n-3 PUFA were significantly higher in T3 at better diet quality and older age.

Table 2. Absolute concentration and percentile ($\mu\text{mol/L}$) distribution of fatty acid in maternal serum during the first (T1) and third (T3) trimesters of pregnancy.

Fatty Acids		Absolute Concentration ($\mu\text{mol/L}$) *	Absolute Percentiles ($\mu\text{mol/L}$)								
			P _{2.5}	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅	P _{97.5}
SFA											
Lauric acid (C12:0)	T1, n = 469	40.14 \pm 10.50	29.22	30.18	31.67	34.04	37.30	42.45	51.76	60.12	71.80
	T3, n = 466	60.19 \pm 28.26	32.52	34.51	36.73	40.91	51.10	69.71	97.49	121.81	146.67
Myristic acid (C14:0)	T1, n = 471	118.16 \pm 49.07	57.95	63.99	69.33	83.20	107.42	139.15	188.35	228.58	260.84
	T3, n = 470	207.80 \pm 80.31	93.68	107.69	117.21	149.71	194.20	249.20	321.04	367.13	413.69
Palmitic acid (C16:0)	T1, n = 467	2904.40 \pm 1403.47	1339.95	1463.74	1627.03	1937.08	2582.35	3500.79	4704.88	5573.20	7610.80
	T3, n = 466	8511.32 \pm 4293.76	2477.62	3017.91	3880.25	5507.61	7500.15	10,738.06	14,966.15	17,376.53	18,980.26
Stearic acid (C18:0)	T1, n = 470	690.31 \pm 208.05	398.5	435.26	465.17	547.46	639.97	804.96	1019.98	1139.45	1211.48
	T3, n = 472	808.08 \pm 202.10	474.67	522.63	569.76	664.25	779.99	930.30	1081.33	1174.58	1302.64
Σ Total SFA	T1, n = 467	3765.31 \pm 1614.17	1884.32	2073.77	2267.31	2646.97	3408.43	4504.30	5907.35	6961.68	8802.81
	T3, n = 467	9625.65 \pm 4574.33	3171.60	3756.01	4644.10	6401.81	8574.46	11,903.47	16,488.0	18,902.97	20,791.60
MUFA											
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	T1, n = 465	186.37 \pm 45.88	119.70	125.68	136.35	151.80	180.84	211.59	250.73	283.54	296.39
	T3, n = 468	256.66 \pm 89.61	100.78	134.70	163.33	194.08	245.46	303.10	378.4	422.99	487.91
Oleic acid (C18:1n-9)	T1, n = 466	1444.74 \pm 461.90	817.01	881.34	959.76	1097.08	1381.89	1666.88	2044.13	2333.50	2694.42
	T3, n = 466	2843.85 \pm 1251.92	1083.25	1319.01	1507.87	1915.78	2602.09	3514.33	4400.45	5507.76	6221.64
Σ Total MUFA	T1, n = 466	1634.54 \pm 500.21	959.91	1020.19	1104.29	1257.50	1555.50	1900.07	2275.35	2596.12	2979.46
	T3, n = 467	3116.39 \pm 1330.86	1254.75	1475.81	1711.59	2157.40	2860.01	3823.08	4920.80	6034.19	6668.84
n-6 PUFA											
LA (C18:2n-6)	T1, n = 466	3355.67 \pm 1230.19	1602.64	1756.72	1927.14	2439.91	3213.76	4097.77	5012.97	5710.44	6211.58
	T3, n = 470	6321.14 \pm 2786.02	2408.12	2737.37	3282.10	4194.24	5722.28	7957.48	10,332.80	11,602.18	13,327.69
DHGLA (C20:3n-6)	T1, n = 469	229.99 \pm 90.64	101.13	114.98	127.81	165.93	216.25	280.67	360.30	407.91	450.08
	T3, n = 471	246.20 \pm 85.27	116.31	129.41	146.81	184.03	233.43	300.70	363.36	397.26	445.50
AA (C20:4n-6)	T1, n = 473	830.82 \pm 276.15	421.52	455.60	520.47	631.14	791.72	991.31	1247.92	1398.0	1523.56
	T3, n = 469	722.63 \pm 220.05	387.52	423.29	472.62	560.47	692.0	855.29	1035.63	1114.09	1223.84
Σ Total n-6 PUFA	T1, n = 465	4433.77 \pm 1469.64	2325.77	2420.11	2697.52	3325.21	4219.65	5333.68	6482.27	7114.28	7735.74
	T3, n = 469	7278.06 \pm 2919.04	3126.65	3435.44	4072.94	5029.21	6758.36	9100.77	11,346.52	12,917.44	14,348.43
n-3 PUFA											
EPA (C20:5n-3)	T1, n = 467	35.03 \pm 23.95	7.80	9.51	11.58	17.67	29.30	45.36	74.50	87.17	103.34
	T3, n = 470	23.88 \pm 16.93	3.96	5.07	6.35	11.10	19.04	32.31	47.78	59.45	68.46
DHA (C22:6n-3)	T1, n = 473	240.28 \pm 73.47	119.02	134.43	151.61	185.65	234.05	291.00	340.30	381.36	406.58
	T3, n = 474	236.60 \pm 71.77	123.02	132.54	150.80	182.27	224.54	283.39	336.38	374.51	396.16
Σ Total n-3 PUFA	T1, n = 473	276.98 \pm 94.07	129.01	149.88	169.46	205.28	264.05	332.67	414.77	469.19	495.58
	T3, n = 473	260.52 \pm 84.33	133.12	141.08	160.92	194.55	250.85	315.61	377.51	426.69	454.23

Table 2. Cont.

Fatty Acids		Absolute Concentration ($\mu\text{mol/L}$) *	Absolute Percentiles ($\mu\text{mol/L}$)								
			P _{2.5}	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅	P _{97.5}
Total FAs	T1, n = 464	10,073.15 \pm 3349.07	5589.89	5808.29	6420.65	7561.30	9551.76	11,982.98	14,557.61	16,156.53	18,491.35
	T3, n = 468	20,480.82 \pm 8335.23	8214.61	9780.29	10,719.47	14,577.32	18,797.72	25,341.41	31,644.12	36,078.82	41,359.35
n-6/n-3 ratio ^(c)	T1, n = 471	16.80 \pm 5.19	8.39	9.25	10.54	13.23	16.39	19.70	24.25	27.01	29.61
	T3, n = 471	29.29 \pm 11.52	11.83	13.44	15.77	20.98	27.69	36.54	46.83	51.60	54.88
AA/EPA ratio	T1, n = 469	31.77 \pm 19.08	6.31	7.66	11.10	17.73	27.44	42.68	57.56	72.19	80.34
	T3, n = 470	44.09 \pm 30.61	9.19	10.80	13.36	22.56	37.83	57.30	92.27	113.43	133.61
AA/(EPA + DHA)	T1, n = 474	3.12 \pm 0.87	1.65	1.83	2.05	2.49	3.05	3.73	4.32	4.53	5.06
	T3, n = 475	2.96 \pm 0.91	1.46	1.61	1.82	2.30	2.85	3.56	4.14	4.55	4.99
LA/DHGLA ratio	T1, n = 469	15.45 \pm 5.12	7.40	8.03	9.67	11.84	14.80	18.55	23.20	25.04	27.86
	T3, n = 471	26.59 \pm 10.58	11.59	12.97	14.44	18.71	24.20	32.78	42.46	47.05	51.60
EFA index	T1, n = 473	2.91 \pm 0.64	1.77	1.94	2.11	2.49	2.85	3.30	3.74	4.05	4.37
	T3, n = 470	2.53 \pm 0.90	1.20	1.30	1.48	1.90	2.39	3.07	3.81	4.29	4.71

P: Percentile; T1: First trimester of pregnancy; T3: Third trimester of pregnancy. LA, Linoleic acid; DHGLA, Dihomo- γ -linolenic acid; AA, Arachidonic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acid; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid; total FAs, total fatty acids = Σ total SFA + Σ total MUFA + Σ total n-6 PUFA + Σ total n-3 PUFA; (c) n-6/n-3 ratio = Σ total n-6 PUFA/ Σ total n-3 PUFA; EFA index, Essential fatty acid index. (*): Fatty acid absolute concentration is presented as mean \pm standard deviation (SD).

Table 3. Relative concentration and percentile (%) distribution of fatty acid in maternal serum during the first (T1) and third (T3) trimester of pregnancy.

Fatty Acids		Relative Concentration (% of Total FAs) *	Relative Percentiles (%)								
			P _{2.5}	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅	P _{97.5}
SFA											
Lauric acid (C12:0)	T1, n = 472	0.42 \pm 0.13	0.20	0.23	0.27	0.33	0.40	0.49	0.60	0.65	0.74
	T3, n = 470	0.34 \pm 0.20	0.12	0.14	0.16	0.20	0.28	0.40	0.62	0.79	0.94
Myristic acid (C14:0)	T1, n = 472	1.17 \pm 0.32	0.65	0.71	0.80	0.94	1.12	1.37	1.62	1.74	1.90
	T3, n = 473	1.07 \pm 0.36	0.49	0.56	0.67	0.81	1.02	1.29	1.59	1.76	1.97
Palmitic acid (C16:0)	T1, n = 471	28.09 \pm 4.52	20.29	21.40	22.60	24.83	27.75	30.87	33.72	36.61	38.10
	T3, n = 475	40.89 \pm 6.82	28.06	30.81	32.88	36.17	40.47	44.98	49.74	52.76	57.08
Stearic acid (C18:0)	T1, n = 475	6.88 \pm 1.06	4.41	4.41	4.90	5.42	6.23	7.01	7.64	8.14	8.47

Table 3. Cont.

Fatty Acids		Relative Concentration (% of Total FAs) *	Relative Percentiles (%)								
			P _{2.5}	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅	P _{97.5}
Σ Total SFA	T3, n = 474	4.20 ± 1.04	2.49	2.65	2.91	3.48	4.09	4.81	5.57	6.27	6.76
	T1, n = 470	36.57 ± 4.38	28.84	30.01	30.59	33.49	36.55	39.34	42.02	44.15	45.65
	T3, n = 474	46.51 ± 6.27	35.89	37.41	39.08	42.10	46.06	50.42	54.30	58.07	62.08
MUFA											
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	T1, n = 475	1.92 ± 0.45	1.14	1.25	1.39	1.62	1.87	2.19	2.58	2.78	2.96
	T3, n = 472	1.35 ± 0.45	0.61	0.72	0.81	1.02	1.33	1.60	1.91	2.23	2.52
Oleic acid (C18:1n-9)	T1, n = 474	14.52 ± 2.27	10.22	11.18	11.89	13.02	14.24	16.10	17.68	18.57	19.50
	T3, n = 471	14.16 ± 3.36	8.52	9.11	10.13	11.68	13.72	16.37	18.77	20.32	21.40
Σ Total MUFA	T1, n = 475	16.46 ± 2.53	11.47	12.57	13.55	14.79	16.18	18.16	19.83	20.91	21.68
	T3, n = 473	15.58 ± 3.51	9.50	10.49	11.32	12.93	15.14	17.84	20.19	31.81	22.98
n-6 PUFA											
LA (C18:2n-6), n = 446	T1, n = 476	33.30 ± 5.19	23.21	24.90	26.58	29.82	33.38	36.81	39.95	42.13	44.14
	T3, n = 476	31.13 ± 6.95	17.65	19.97	22.21	26.28	31.03	35.61	40.23	42.68	45.69
DHGLA (C20:3n-6), n = 450	T1, n = 473	2.26 ± 0.58	1.20	1.38	1.54	1.84	2.21	2.61	2.96	3.33	3.52
	T3, n = 474	1.27 ± 0.40	0.63	0.71	0.81	0.98	1.21	1.54	1.78	2.05	2.20
AA (C20:4n-6), n = 451	T1, n = 475	8.31 ± 2.05	4.33	4.88	5.62	7.09	8.29	9.66	10.95	11.89	12.69
	T3, n = 471	3.83 ± 1.33	1.79	2.03	2.27	2.91	3.62	4.54	5.69	6.30	7.55
Σ Total n-6 PUFA, n = 444	T1, n = 474	44.35 ± 5.07	33.62	36.25	38.20	41.05	44.59	47.44	50.80	52.94	54.46
	T3, n = 476	36.50 ± 7.27	21.78	24.07	27.36	31.43	36.47	40.95	45.85	48.62	50.86
n-3 PUFA											
EPA (C20:5n-3), n = 446	T1, n = 467	0.36 ± 0.24	0.07	0.11	0.13	0.18	0.30	0.46	0.66	0.86	1.04
	T3, n = 470	0.13 ± 0.10	0.02	0.03	0.04	0.06	0.10	0.16	0.27	0.33	0.39
DHA (C22:6n-3), n = 456	T1, n = 474	2.24 ± 0.66	1.25	1.49	1.63	1.97	2.37	2.85	3.35	3.58	3.87
	T3, n = 472	1.24 ± 0.46	0.58	0.65	0.73	0.92	1.17	1.50	1.89	2.08	2.41
Σ Total n-3 PUFA	T1, n = 470	2.77 ± 0.83	1.41	1.62	1.79	2.16	2.67	3.28	3.93	4.35	4.74
	T3, n = 470	1.36 ± 0.53	0.64	0.70	0.78	0.98	1.27	1.66	2.12	2.42	2.67
n-6/n-3 ratio ^(a)	T1, n = 472	16.93 ± 5.27	8.39	9.25	10.54	13.23	16.40	19.70	24.41	27.53	29.67
	T3, n = 472	29.54 ± 11.66	11.83	13.45	15.78	21.02	27.71	36.63	46.99	51.68	55.53

Table 3. Cont.

Fatty Acids		Relative Concentration (% of Total FAs) *	Relative Percentiles (%)								
			P _{2.5}	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅	P _{97.5}
AA/EPA ratio	T1, n = 469	31.68 ± 19.01	6.31	7.66	11.10	17.73	27.44	42.68	57.56	72.19	80.34
	T3, n = 470	45.25 ± 32.05	9.19	10.80	13.36	22.56	37.83	57.30	92.27	113.43	133.61
AA/(EPA + DHA)	T1, n = 474	3.12 ± 0.87	1.65	1.83	2.05	2.49	3.05	3.73	4.32	4.53	5.06
	T3, n = 475	2.96 ± 0.91	1.46	1.61	1.82	2.30	2.85	3.56	4.14	4.55	4.99
LA/DHGLA ratio	T1, n = 471	15.69 ± 5.37	7.41	8.03	9.70	11.84	14.86	18.57	23.27	25.22	28.98
	T3, n = 472	26.64 ± 10.69	11.59	12.97	14.46	18.72	24.22	32.87	42.61	47.25	51.65
EFA index	T1, n = 473	2.93 ± 0.64	1.78	1.95	2.13	2.51	2.87	3.32	3.77	4.07	4.40
	T3, n = 470	2.55 ± 0.90	1.20	1.31	1.48	1.91	2.40	3.08	3.83	4.30	4.74

P: Percentile; T1: First trimester of pregnancy; T3: Third trimester of pregnancy. LA, Linoleic acid; DHGLA, Dihomo- γ -linolenic acid; AA, Arachidonic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acid; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid; (*) n-6/n-3 ratio = Σ total n-6 PUFA/ Σ total n-3 PUFA; EFA index, Essential fatty acid index. (*): Fatty acid relative concentration is presented as mean \pm standard deviation (SD).

Table 4. A comparison of reported concentrations (%) of total fatty acids in maternal serum from different European countries.

Fatty Acids		Our Reference Intervals (T1, n = 472; T3, n = 468)	Montes et al. [19] (n = 170) (Spain)	Otto et al. [14] (n = 23) (The Netherlands)	Enke et al. [15] (n = 55) (Germany)	Vlaardingerbroek et al. [38] (n = 172) (The Netherlands)	Wheeler et al. [39] (n = 142) (United Kingdom)
SFA							
Myristic acid (C14:0)	T1	0.65–1.90	-	-	-	-	-
	T3	0.49–1.97	-	-	1.21 \pm 0.40	-	1.21 \pm 0.03
Palmitic acid (C16:0)	T1	20.29–38.10	-	-	-	-	-
	T3	28.06–57.08	-	-	30.20 \pm 2.31 *	-	25.9 \pm 0.17 *
Stearic acid (C18:0)	T1	4.41–8.47	-	-	-	-	-
	T3	2.49–6.76	-	-	5.59 \pm 0.78	-	5.84 \pm 0.05
Σ Total SFA	T1	28.84–45.65	30.34 \pm 2.06	44.14 \pm 0.46	-	45.06 \pm 0.09	-
	T3	25.89–62.08	-	-	67.80 \pm 4.77 †	45.80 \pm 0.07	33.0 \pm 0.20
MUFA							
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	T1	1.14–2.96	-	-	-	-	-
	T3	0.61–2.52	-	-	-	-	2.41 \pm 0.07

Table 4. Cont.

Fatty Acids		Our Reference Intervals (T1, n = 472; T3, n = 468)	Montes et al. [19] (n = 170) (Spain)	Otto et al. [14] (n = 23) (The Netherlands)	Enke et al. [15] (n = 55) (Germany)	Vlaardingerbroek et al. [38] (n = 172) (The Netherlands)	Wheeler et al. [39] (n = 142) (United Kingdom)
		Percentiles (2.5–97.5%)			Mean ± SD		
Oleic acid (C18:1n-9)	T1	10.22–19.50	-	-	-	-	-
	T3	8.52–21.40	-	-	23.90 ± 2.45 †	-	22.2 ± 0.40 †
Σ Total MUFA	T1	11.47–21.68	23.29 ± 3.62 †	12.05 ± 0.25	-	11.20 ± 0.08 *	-
	T3	9.50–22.98	-	-	29.20 ± 2.93 †	11.99 ± 0.10	28.8 ± 0.25 †
n-6 PUFA							
LA (C18:2n-6)	T1	23.21–44.14	32.16 ± 4.16	20.48 ± 0.48 *	-	21.28 ± 0.18 *	-
	T3	17.65–45.69	-	-	23.50 ± 3.41	21.78 ± 0.18	27.1 ± 0.29
DIIGLA (C20:3n-6)	T1	1.20–3.52	1.35 ± 0.56 *	3.53 ± 0.17 †	-	3.22 ± 0.05	-
	T3	0.63–2.20	-	-	1.55 ± 0.32	3.46 ± 0.04 †	7.88 ± 0.20 †
AA (C20:4n-6)	T1	4.33–12.69	7.33 ± 1.74	9.34 ± 0.35	-	9.64 ± 0.11	-
	T3	1.79–7.55	-	-	3.83 ± 0.89	8.15 ± 0.10 †	5.40 ± 0.08
Σ Total n-6 PUFA	T1	33.62–54.46	42.56 ± 4.22	34.88 ± 0.62	-	-	-
	T3	21.78–50.86	-	-	-	-	34.7 ± 0.31
n-3 PUFA							
EPA (C20:5n-3)	T1	0.07–1.04	0.39 ± 0.30	0.62 ± 0.11	-	0.58 ± 0.02	-
	T3	0.02–0.39	-	-	0.24 ± 0.10	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.02
DHA (C22:6n-3)	T1	1.25–3.87	2.68 ± 0.62	3.93 ± 0.22 †	-	3.88 ± 0.07 †	-
	T3	0.58–2.41	-	-	1.21 ± 0.35	3.74 ± 0.06 †	2.07 ± 0.04
Σ Total n-3 PUFA	T1	1.41–4.74	3.69 ± 0.87	5.35 ± 0.33 †	-	-	-
	T3	0.64–2.67	-	-	1.61 ± 0.46	-	2.72 ± 0.06 †
n-6/n-3 ratio ^(c)	T1	8.39–29.61	12.16 ± 3.04	6.44 ± 0.29 *	-	-	-
	T3	11.83–54.88	-	-	-	-	-
AA/(EPA + DHA)	T1	1.65–5.06	-	-	-	-	-
	T3	1.46–4.99	-	-	-	-	2.32 ± 0.04
EFA index	T1	1.78–4.40	-	3.48 ± 0.09	-	3.62 ± 0.04	-
	T3	1.20–4.74	-	-	-	3.34 ± 0.04	-

T1: First Trimester of pregnancy; T3: Third trimester of pregnancy. LA, Linoleic acid; DIIGLA, Dihomo-γ-linolenic acid; AA, Arachidonic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acid; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid; ^(c) n-6/n-3 ratio = Σtotal n-6 PUFA/Σtotal n-3 PUFA; EFA index, Essential fatty acid index. (-) indicates that the fatty acid is not reported. The (*) and (†) denote: under 2.5 percentile and over 97.5 percentile of the present study, respectively.

Table 5. Multiple linear regression of potential factors related to maternal serum fatty acids composition in the first (T1) and third (T3) trimesters of pregnancy.

	Fatty Acids											
	Total FA			Total SFA			Total MUFA			Total n-6 PUFA		
	B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p
Maternal factors in T1												
Maternal Age	5.8	44.0	0.895	-14.5	21.1	0.494	0.3	6.6	0.959	2.1	19.6	0.915
Occupation	100.9	423.8	0.812	115.2	202.1	0.569	32.3	63.8	0.614	22.2	188.3	0.906
Educational level	-152.8	299.0	0.610	16.2	143.1	0.910	47.1	45.4	0.300	-124.4	132.8	0.350
Ethnicity	395.4	578.6	0.495	334.0	275.5	0.226	108.4	86.4	0.211	93.5	256.8	0.716
Parity	403.7	412.6	0.329	417.3	198.2	0.036 *	116.5	62.4	0.063	115.2	183.0	0.530
BMI	97.3	43.2	0.025	56.1	20.4	0.006 *	13.2	6.5	0.044 *	34.7	19.2	0.072
Gestational weight gain	49.8	48.3	0.304	-27.5	23.1	0.236	-0.1	7.3	0.992	-19.9	21.5	0.354
Smoking	-148.3	256.3	0.563	-4.1	123.0	0.973	-35.1	39.0	0.369	-99.6	113.8	0.382
Alcohol consumption	-2790.3	3316.8	0.401	-1917.9	1589.0	0.228	-567.4	502.5	0.260	-468.6	1473.4	0.751
Physical Activity	-145.6	333.0	0.662	6.4	159.4	0.968	-25.2	50.4	0.617	-118.3	147.8	0.424
Diet Quality	106.3	73.4	0.149	55.8	35.1	0.113	16.5	11.1	0.138	21.0	32.6	0.520
	R ² = 0.056, F _{11,283} = 1.502; p = 0.130			R ² = 0.081, F _{11,281} = 2.248; p = 0.012 *			R ² = 0.060, F _{11,281} = 1.632; p = 0.089			R ² = 0.041, F _{11,281} = 1.101; p = 0.360		
Maternal factors in T3												
Maternal Age	191.2	108.3	0.079	37.0	59.8	0.536	37.2	17.9	0.080	36.5	38.2	0.340
Occupation	-1059.6	1058.4	0.318	-878.9	576.9	0.129	-306.2	174.3	0.511	154.0	369.9	0.677
Educational level	-1453.6	737.6	0.050	-1002.6	406.6	0.014 *	-81.1	123.4	0.026 *	-446.0	259.0	0.086
Ethnicity	-1851.1	1429.2	0.196	-922.6	785.1	0.241	-527.1	235.1	0.384	-761.8	500.1	0.129
Parity	-745.5	1030.0	0.470	739.1	569.5	0.195	-148.1	170.0	0.014 *	-483.3	360.8	0.181
BMI	254.1	108.4	0.020	164.3	59.5	0.006 *	44.0	17.8	0.635	57.3	37.8	0.130
Gestational weight gain	149.2	119.7	0.214	107.2	66.2	0.106	9.5	20.0	0.229	17.3	42.2	0.683
Smoking	-271.5	638.2	0.671	-386.9	354.1	0.275	-127.9	106.1	0.659	-36.2	223.8	0.872
Alcohol consumption	-4228.6	8281.3	0.610	-1697.3	4543.5	0.709	-609.0	1378.4	0.475	-2083.2	2909.4	0.475
Physical Activity	-482.1	818.8	0.557	-688.4	456.4	0.133	-97.2	136.0	0.507	-49.0	287.8	0.865
Diet Quality	130.1	182.9	0.477	89.0	100.2	0.375	20.2	30.3	0.080	58.8	64.5	0.363
	R ² = 0.061, F _{11,283} = 1.673; p = 0.079			R ² = 0.091, F _{11,282} = 2.573; p = 0.004 *			R ² = 0.091, F _{11,283} = 2.587; p = 0.004 *			R ² = 0.041, F _{11,284} = 1.098; p = 0.362		
	Total n-3 PUFA			Linoleic Acid			Arachidonic Acid			Docosahexaenoic Acid		
	B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p
Maternal factors in T1												
Maternal Age	2.9	1.3	0.027 *	5.6	16.5	0.735	-1.6	3.7	0.671	1.6	1.0	0.101
Occupation	-9.1	12.5	0.465	-52.1	159.1	0.744	26.7	36.1	0.460	9.7	9.7	0.316
Educational level	23.3	8.8	0.009 *	-161.1	111.8	0.151	33.4	25.6	0.193	17.2	6.8	0.012 *
Ethnicity	42.3	16.8	0.012 *	11.5	216.7	0.958	6.8	48.6	0.889	29.1	13.0	0.026 *
Parity	13.8	12.1	0.257	81.4	154.6	0.599	70.2	35.1	0.046 *	11.2	9.3	0.233
BMI	0.7	1.3	0.600	29.0	16.2	0.074	8.6	3.6	0.018 *	0.8	1.0	0.404
Gestational weight gain	-0.2	1.4	0.880	-16.0	18.1	0.379	0.3	4.1	0.950	-0.2	1.1	0.834
Smoking	-2.6	7.6	0.736	-122.6	96.1	0.203	8.2	22.0	0.709	-3.3	5.8	0.570
Alcohol consumption	-67.8	97.8	0.489	-156.9	1245.0	0.900	-303.4	284.6	0.287	-25.1	75.6	0.740
Physical Activity	-17.9	9.8	0.068	-30.2	124.9	0.809	-64.7	28.4	0.024	-17.4	7.6	0.023 *

)

Table 5. Cont.

	Fatty Acids											
	Total FA			Total SFA			Total MUFA			Total n-6 PUFA		
Diet Quality	1.0	2.2	0.645	28.8	27.5	0.296	−5.0	6.3	0.429	0.9	1.7	0.581
	R ² = 0.111, F _{11,283} = 3.198; p = <0.001 *			R ² = 0.045, F _{11,282} = 1.214; p = 0.277			R ² = 0.061, F _{11,285} = 1.675; p = 0.078			R ² = 0.108, F _{11,284} = 3.132; p = 0.001 *		
Maternal factors in T3												
Maternal Age	3.2	1.1	0.004 *	27.5	35.3	0.437	1.8	2.9	0.543	2.8	0.9	0.002
Occupation	−3.4	10.8	0.753	204.9	342.5	0.550	24.4	28.3	0.388	−0.2	9.1	0.981
Educational level	8.8	7.6	0.246	−419.4	239.4	0.081	−11.1	19.9	0.578	6.4	6.4	0.314
Ethnicity	1.6	14.5	0.915	−624.9	462.4	0.178	−96.8	38.4	0.015 *	5.2	12.2	0.674
Parity	−7.0	10.4	0.501	−406.5	334.1	0.225	1.8	27.4	0.947	−9.1	8.8	0.304
BMI	−0.2	1.1	0.855	49.3	34.9	0.160	6.0	2.9	0.036 *	−0.3	0.9	0.776
Gestational weight gain	−0.2	1.2	0.876	11.3	39.0	0.773	3.1	3.6	0.384	−0.2	1.0	0.825
Smoking	4.3	6.5	0.506	−26.4	207.1	0.899	17.7	17.2	0.303	3.0	5.5	0.582
Alcohol consumption	−86.9	84.8	0.306	−1756.6	2690.1	0.514	−161.6	221.9	0.467	−62.4	71.7	0.385
Physical Activity	−10.4	8.4	0.215	4.8	266.1	0.986	−7.4	21.9	0.737	−7.2	7.1	0.307
Diet Quality	3.6	1.9	0.055	38.9	60.0	0.517	−7.5	5.0	0.133	3.1	1.6	0.050 *
	R ² = 0.082, F _{11,286} = 2.331; p = 0.009 *			R ² = 0.037, F _{11,285} = 0.996; p = 0.450			R ² = 0.065, F _{11,283} = 1.792; p = 0.049 *			R ² = 0.077, F _{11,287} = 2.170; p = 0.016 *		

B, unstandardised coefficient; SE, standard error. (*) Level of statistical significance $p > 0.05$. Variables included in multiple linear regression: maternal age (years), occupation (student, employed, unemployed), ethnicity (Spanish, non-Spanish women), parity (no, yes), initial BMI (Kg/m²), gestational weight gain (Kg/m²), maternal smoking status (no, yes), maternal alcohol consumption (no, yes), physical activity in METs (score), diet quality (score).

4. Discussion

The results of present study provide a reference range for the vast majority of serum circulating FAs and FAs ratios in 479 healthy pregnant women from the ECLIPSES study [28], assessed both in T1 and T3 of gestation. These results complement the few studies on reference ranges of FAs that exist in pregnant women for different moments of gestation, and add a new measurement with FAs index. Furthermore, this study describes the variation of FA levels in serum according to some maternal factors such as age, obesity, sedentary lifestyle, lower educational level, low diet quality, parity and non-Spanish ethnicity.

In general, any laboratory test is compared with reference ranges in order to assess the degree of compliance with normality levels, both individually in the clinical follow-up of the subject and collectively in epidemiological studies [9]. Adequate levels of FAs in T1 are of great importance considering the part they play in the onset of neurogenesis [7,8]. EPA and DHA are particularly critical for supporting the development of the central nervous system, retinal photoreceptors and immune system [6]. Nevertheless, few investigations have reported reference intervals for serum individualized FA concentrations, mainly due to the technical complexity of FAs evaluation compared to other nutrients or biomarkers. In the scarce literature available, FA reference ranges for serum are reported in non-pregnant adults [10–13]. Geographical region, sex, age, physio-pathological conditions [13,22] such as pregnancy [17] and dietary pattern have been seen to lead to some discrepancies. Kish-Trier et al. [40] and Mayo Clinic [12] separately provided reference intervals in age groups from the North American population with somewhat different results. Abdelmagid et al. [11] also reported significant differences between Canadian male and female adults in such FAs as LA or DHA. For pregnant women, reference values have only been described in a Brazilian cohort of 225 healthy pregnant women [16] and in a Norwegian cohort of 247 healthy pregnant women [17]. However, the concentration units (relative terms) and type of sample (erythrocyte membrane) evaluated in these two cohorts cannot be compared with our work methodology and our results. In this regard, reference intervals should be developed using a more uniform and systematic process. In any case, our study provides new information on the European Mediterranean region with socioeconomic, cultural and dietary characteristics different from the previous ones.

Depending on concentration units, the reference intervals of individual FAs in serum can be expressed as either absolute concentrations or percentages of total FA. To the best of our knowledge, no study has reported serum reference ranges in both types of concentration units in healthy pregnant women. To make our results comparable with those of previous studies, reference ranges were reported as relative concentrations because very little literature reports absolute values in pregnant women. Correlations between FA concentrations expressed in absolute and relative values were low-moderate ($r = 0.1-0.5$) with the exception of C12:0, C16:0, Total SFA and C20:5n-3 for which a strong correlation was observed ($r > 0.5$). Identically to our results, other studies have already noted poor correlations between absolute and relative concentrations [40–43] in non-pregnant adults. It is postulated that differences between percentages and concentrations depended on individual FA-characteristics [43]. Moreover, the difference in the correlation could be due to the fact that the percentage of individual FA is calculated based on the whole set of FAs detected, however absolute concentration of individual FA is not dependent upon the relative abundance of other FAs. For this reason, we believe that the measurement expressed in absolute terms would facilitate comparisons among studies.

Our relative results were compared with those reported in other European studies (Table 3). As expected, in the Mediterranean diet pattern Σ total MUFA levels appear to be higher in the study from Spain [19] and lower in non-Spanish countries such as the study from the Netherlands [14,38]. Surprisingly, similar levels of Σ total MUFA have also been observed in Germany [15] and in UK [39], which are not characterized by following a Mediterranean pattern diet. DHGLA and AA values were higher in the Netherlands than other countries. Normally, the production of inflammatory mediators such as AA is associated with the course of pregnancy. However, abnormally high levels have been

related to pathological pregnancy complications such as preeclampsia, premature labor, fetal growth, among others (especially in women with risk factors for overweight and obesity) [27]. Some of these complications occur during T3, however Otto et al. [14] measured FA during T1. Furthermore, certain maternal factors such as obesity predispose to suffer a greater number of complications and the study of Vlaardingerbroek et al. [38] did not report the BMI of their pregnant women population. In addition to the above, DHA concentrations from the Netherlands are higher than those reported in the other studies. Possible explanations for increased DHA in the Netherlands might be the high intake of n-3 supplements or the higher consumption of seafood per capita [17]. Finally, the differences in the measurement time window, sample size and FA assay protocol could explain the difference found with these authors [14,15,19,38,39]. Nevertheless, it is important to note that absolute concentrations are more useful and facilitate comparisons between studies and the recommendation for future studies is to report FA levels as absolute units. Further, absolute values consist in an individual measure that assure an economic analysis compared with relative values that require the measurement of all circulating FAs in serum. In this regard, absolute analysis could be included in routine clinical practice of laboratories and not be limited to research studies.

Regarding the evolution of FA levels between T1 and T3, we conclude in an article from the ECLIPSES study, that serum FA profile changed during the gestational period: Σ total SFA, Σ total MUFA and Σ total n-6 PUFA increased during pregnancy, whereas essential FAs such as AA and EPA decrease and DHA remains unchanged [44]. It is well-known that the composition in serum of essential FAs such as n-6 PUFA and n-3 PUFA is closely linked to dietary FA consumption [18,19]. However, Volk et al. [45] showed that dietary and plasma SFA and MUFA are not related. In addition, some authors reported likewise to our results that FAs intake and the dietary pattern remained similar throughout pregnancy [14,29]. In this sense, diet would not explain the variations observed in serum FA composition and levels, including the lack of correlation between absolute and relative concentrations in our results, which could be related to other factors in combination with physiological changes in plasma volume during pregnancy.

We found that the women with obesity, sedentary lifestyle, lower educational level and those of non-Spanish ethnicity had higher levels of total SFA, total MUFA and AA, and lower levels of total n-3 PUFA and DHA. Factors such as obesity and sedentary lifestyle, could favor the presence of proinflammatory FAs such as AA. Ma et al. showed that overweight, smoking and alcohol drinking can increase the endogenous synthesis of SFA [46]. Other studies showed that variations in FA concentrations could be affected by the genetically conditions, such as genotype expression of fatty acid desaturase [25,47]. Overall, it is important to note that lifestyle, sociodemographic and genetic factors can affect normal FA reference intervals in pregnancy. Therefore, serum FA measure could be considered as an integration of dietary intake and individual biological response [46]. Consequently, absolute percentiles of FAs for 95% of the population could assist the evaluation of FA status and the identification of women at risk of either under exposure ($\leq 2.5\%$ percentile) or over exposure ($\geq 97.5\%$ percentile) to an individual FA.

One of the strengths of this study is that it is the first one to define individual SFA, MUFA, and PUFA reference ranges in absolute and relative units in a large sample of healthy women at the beginning and end of pregnancy. The representativeness of the sample size emphasizes the validity of the proposed reference values in the present study. All data were collected by the same trained researchers, and all FA analyses were performed in the same research laboratory. Furthermore, FAs were analyzed by GC-MS which is the more recently clinically validated method for individual FA quantitation [40] and can be applied for fully automated FA profiling in serum samples during dietary studies [35]. Further, our results would facilitate future research into the role of high/low concentrations of individual FAs in obstetric and fetal pathologies. Nevertheless, it does have several limitations. First, FAs were not analyzed in the second trimester of pregnancy and it would have been interesting to monitor the whole gestational period. Second, we were unable to

assess all FAs in our sample. One of these was ALA, one of the main n-3 PUFAs, which may explain why the n-3 PUFA relative levels in our study were lower than those in other countries. Third, it is difficult to establish a comparison between countries because the FA profile analyzed in total serum/plasma lipids can vary from different populations, included in the same country; further the measurement of FAs in all circulating lipids differ from FA profile performed in circulating triglycerides, phospholipids or esters of cholesterol.

5. Conclusions

The present study provides the serum reference interval for FA levels in a large sample of pregnant women from a Mediterranean region. The data are reported in the first and third trimesters of pregnancy, expressed both as absolute values of their serum concentrations, and as relative values in terms of the percentage of total FA. The percentiles of reference ranges proposed will be a useful tool for assessing the degree of adequacy of FAs in pregnant women, in both individual monitoring of pregnancy, and population-based epidemiological studies. However, every region must provide their own reference ranges in accordance with the characteristics of their population. Further research is needed to identify the personal and environmental factors that contribute to a healthy diet during pregnancy.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13114037/s1>, Table S1: Pearson correlations between absolute ($\mu\text{mol/L}$) and relative (% of total FAs) concentration of fatty acids in serum.

Author Contributions: Conceptualization, V.A.; formal analysis, C.M.-G. and V.A.; data curation, N.S.O., C.M.-G. and V.A.; investigation, C.M.-G., R.D. and V.A.; writing—original draft preparation, C.M.-G. and V.A.; writing—review and editing, C.M.-G., R.D. and V.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by a grant (PI12/02777) from the Health Research Fund of the Ministry of Health and Consumption (Madrid, Spain) [Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo] and co-funded by European Union (ERDF/ESE, “A way to make Europe”/“Investing in your future”). The funding bodies play no part in the design of the study, collection and interpretation of data, or decision to publish.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Research Institute in Primary Care [Instituto de Investigación en Atención Primaria; IDIAP] and the Spanish Agency for Medicines and Health Products [Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios; AEMPS] (AEMPS IJG-FER-2012 on 9 July 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to restrictions of privacy.

Acknowledgments: The authors thank the following entities for their contributions in ECLIPSES study: NUTRISAM Research Group, Universitat Rovira i Virgili (URV), Reus, Spain. Sexual and Reproductive Health Care Services (ASSIR) of Tarragona, Spain. Research support Unit-Tarragona and Central Unit-Barcelona of the Institut d’Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Institut Català de la Salut, and Research Centre for Omic Sciences (COS, Eurecat), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mousa, A.; Naqash, A.; Lim, S. Macronutrient and micronutrient intake during pregnancy: An overview of recent evidence. *Nutrients* **2019**, *11*, 443. [CrossRef]
2. Gernand, A.D.; Schulze, K.J.; Stewart, C.P.; West, K.P.; Christian, P. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: Health effects and prevention. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 274–289. [CrossRef] [PubMed]
3. Haggarty, P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58*, 1559–1570. [CrossRef] [PubMed]

4. Hoge, A.; Tabar, V.; Donneau, A.-F.; Dardenne, N.; Degée, S.; Timmermans, M.; Nisolle, M.; Guillaume, M.; Castronovo, V. Imbalance between Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Early Pregnancy Is Predictive of Postpartum Depression in a Belgian Cohort. *Nutrients* **2019**, *11*, 876. [CrossRef] [PubMed]
5. Huang, Y.; Iosif, A.-M.; Hansen, R.L.; Schmidt, R. Maternal polyunsaturated fatty acids and risk for autism spectrum disorder in the MARBLES high-risk study. *Autism* **2020**, *24*, 1191–1200. [CrossRef] [PubMed]
6. Wu, G.; Imhoff-Kunsch, B.; Girard, A.W. Biological Mechanisms for Nutritional Regulation of Maternal Health and Fetal Development. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2012**, *26*, 4–26. [CrossRef]
7. Hoge, A.; Bernardy, F.; Donneau, A.-F.; Dardenne, N.; Degée, S.; Timmermans, M.; Nisolle, M.; Guillaume, M.; Castronovo, V. Low omega-3 index values and monounsaturated fatty acid levels in early pregnancy: An analysis of maternal erythrocytes fatty acids. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 1–11. [CrossRef]
8. Lauritzen, L.; Brambilla, P.; Mazzocchi, A.; Harsløf, L.B.S.; Ciappolino, V.; Agostoni, C. DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients* **2016**, *8*, 6. [CrossRef] [PubMed]
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2010.
10. Sera, R.K.; McBride, J.H.; Higgins, S.A.; Rodgerson, D.O. Evaluation of reference ranges for fatty acids in serum. *J. Clin. Lab. Anal.* **1994**, *8*, 81–85. [CrossRef]
11. Abdelmagid, S.A.; Clarke, S.E.; Nielsen, D.E.; Badawi, A.; El-Sohehy, A.; Mutch, D.M.; Ma, D.W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116195. [CrossRef]
12. Mayo Clinic Laboratories, Fatty Acid Profile, Essential, Serum. Available online: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/82426> (accessed on 9 November 2021).
13. Khaw, K.-T.; Friesen, M.D.; Riboli, E.; Luben, R.; Wareham, N. Plasma Phospholipid Fatty Acid Concentration and Incident Coronary Heart Disease in Men and Women: The EPIC-Norfolk Prospective Study. *PLoS Med.* **2012**, *9*, e1001255. [CrossRef] [PubMed]
14. Otto, S.J.; Van Houwelingen, A.C.; Badart-Smook, A.; Hornstra, G. Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 302–307. [CrossRef]
15. Enke, U.; Jaudszus, A.; Schleussner, E.; Seyfarth, L.; Jahreis, G.; Kuhnt, K. Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: Special focus on individual trans fatty acids and conjugated linoleic acids. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 247. [CrossRef] [PubMed]
16. Pinto, T.J.P.; Farias, D.R.; Rebelo, F.; Lepsch, J.; Vaz, J.S.; Moreira, J.D.; Cunha, G.M.; Kac, G. Lower Inter-Partum Interval and Unhealthy Life-Style Factors Are Inversely Associated with n-3 Essential Fatty Acids Changes during Pregnancy: A Prospective Cohort with Brazilian Women. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121151. [CrossRef]
17. Araujo, P.; Kjellefjord, M.; Nerhus, I.; Dahl, L.; Aakre, I.; Moe, V.; Smith, L.; Markhus, M.W. Fatty Acid Reference Intervals in Red Blood Cells among Pregnant Women in Norway—Cross Sectional Data from the ‘Little in Norway’ Cohort. *Nutrients* **2020**, *12*, 2950. [CrossRef]
18. Mazzocchi, A.; Leone, L.; Agostoni, C.; Pali-Schöll, I. The Secrets of the Mediterranean Diet. Does [Only] Olive Oil Matter? *Nutrients* **2019**, *11*, 2941. [CrossRef]
19. Montes, R.; Chisaguano, A.M.; I Castellote, A.; Morales, E.; Sunyer, J.; López-Sabater, M.C. Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2013**, *67*, 658–663. [CrossRef] [PubMed]
20. Kohlmeier, L. Future of dietary exposure assessment. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 702S–709S. [CrossRef]
21. Bradbury, K.E.; Skeaff, C.M.; Crowe, F.L.; Green, T.J.; Hodson, L. Serum Fatty Acid Reference Ranges: Percentiles from a New Zealand National Nutrition Survey. *Nutrients* **2011**, *3*, 152–163. [CrossRef] [PubMed]
22. Zhao, J.P.; Levy, E.; Shatenstein, B.; Fraser, W.D.; Julien, P.; Montoudis, A.; Spahis, S.; Xiao, L.; Nuyt, A.M.; Luo, Z.C. Longitudinal circulating concentrations of long-chain polyunsaturated fatty acids in the third trimester of pregnancy in gestational diabetes. *Diabet. Med.* **2015**, *33*, 939–946. [CrossRef]
23. Ohnishi, H.; Saito, Y. Eicosapentaenoic Acid (EPA) Reduces Cardiovascular Events: Relationship with the EPA/Arachidonic Acid Ratio. *J. Atheroscler. Thromb.* **2013**, *20*, 861–877. [CrossRef] [PubMed]
24. Christian, L.M.; Blair, L.M.; Porter, K.; Lower, M.; Cole, R.M.; Belury, M.A. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Status in Pregnant Women: Associations with Sleep Quality, Inflammation, and Length of Gestation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148752. [CrossRef]
25. Hu, Y.; Tanaka, T.; Zhu, J.; Guan, W.; Wu, J.; Psaty, B.M.; McKnight, B.; King, I.B.; Sun, Q.; Richard, M.; et al. Discovery and fine-mapping of loci associated with MUFAs through trans-ethnic meta-analysis in Chinese and European populations. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 974–981. [CrossRef] [PubMed]
26. Gibson, R.A.; Muhlhausler, B.; Makrides, M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern. Child Nutr.* **2011**, *7*, 17–26. [CrossRef]
27. Szczuko, M.; Kikut, J.; Komorniak, N.; Bilicki, J.; Celewicz, Z.; Ziętek, M. The Role of Arachidonic and Linoleic Acid Derivatives in Pathological Pregnancies and the Human Reproduction Process. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9628. [CrossRef]

28. Arija, V.; Fargas, F.; March, G.; Abajo, S.; Basora, J.; Canals, J.; Ribot, B.; Aparicio, E.; Serrat, N.; Hernández-Martínez, C.; et al. Adapting iron dose supplementation in pregnancy for greater effectiveness on mother and child health: Protocol of the ECLIPSES randomized clinical trial. *BMC Pregnancy Childbirth* **2014**, *14*, 33. [CrossRef] [PubMed]
29. Jardí, C.; Aparicio, E.; Bedmar, C.; Aranda, N.; Abajo, S.; March, G.; Basora, J.; Arija, V.; the ECLIPSES Study Group Food Consumption during Pregnancy and Post-Partum. ECLIPSES Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2447. [CrossRef]
30. Fernández, R.; Escuriet, R.; Costa, D.; Armelles, M.; Cabezas, C. Protocol de seguiment de l'embaràs a catalunya, Dir. Gen. Salut Pública. 2018. Available online: https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/promocio_salut/embaras_part_puerperi/protocol_seguint_embaras/protocol-seguiment-embaras-2018.pdf. (accessed on 9 November 2021).
31. De Catalunya, G. Classificació Catalana d'Ocupacions (CCO-2011). 2011. Available online: <https://www.idescat.cat/serveis/biblioteca/docs/cat/cco2011.pdf> (accessed on 9 November 2021).
32. Edwards, M.K.; Loprinzi, P.D. Affective Responses to Acute Bouts of Aerobic Exercise, Mindfulness Meditation, and Combinations of Exercise and Meditation: A Randomized Controlled Intervention. *Psychol. Rep.* **2019**, *122*, 465–484. [CrossRef]
33. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. (accessed on 9 November 2021).
34. Norte Navarro, A.I.; Ortiz Moncada, R. Calidad de la dieta española según el índice de alimentación saludable. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 330–336. [CrossRef]
35. Automated Sample Preparation for Profiling Fatty Acids in Blood and Plasma using the Agilent 7693. Available online: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4822EN.pdf>. (accessed on 9 November 2021).
36. Mowbray, F.I.; Fox-Wasylyshyn, S.M.; El-Masri, M.M. Univariate outliers: A conceptual overview for the nurse researcher. *Can. J. Nurs. Res.* **2019**, *51*, 31–37. [CrossRef]
37. Cousineau, D.; Chartier, S. Outliers detection and treatment: A review. *Int. J. Psychol. Res.* **2010**, *3*, 58–67. [CrossRef]
38. 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. Fat. Acids* **2004**, *71*, 363–374. [CrossRef] [PubMed]
39. Wheeler, S.J.; Poston, L.; Thomas, J.E.; Seed, P.T.; Baker, P.N.; Sanders, T.A.B. Maternal plasma fatty acid composition and pregnancy outcome in adolescents. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 601–610. [CrossRef] [PubMed]
40. Kish-Trier, E.; Schwarz, E.; Pasquali, M.; Yuzyuk, T. Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS. *Clin. Mass Spectrom.* **2016**, *2*, 11–17. [CrossRef]
41. Lagerstedt, S.A.; Hinrichs, D.R.; Batt, S.M.; Magera, M.J.; Rinaldo, P.; McConnell, J.P. Quantitative Determination of Plasma C8–C26 Total Fatty Acids for the Biochemical Diagnosis of Nutritional and Metabolic Disorders. *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *73*, 38–45. [CrossRef] [PubMed]
42. Sergeant, S.; Ruczinski, I.; Ivester, P.; Lee, T.C.; Morgan, T.M.; Nicklas, B.J.; Mathias, R.A.; Chilton, F.H. Impact of methods used to express levels of circulating fatty acids on the degree and direction of associations with blood lipids in humans. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 251–261. [CrossRef] [PubMed]
43. Mocking, R.J.T.; Assies, J.; Lok, A.; Ruhé, H.G.; Koeter, M.W.J.; Visser, I.; Bockting, C.L.H.; Schene, A.H. Statistical Methodological Issues in Handling of Fatty Acid Data: Percentage or Concentration, Imputation and Indices. *Lipids* **2012**, *47*, 541–547. [CrossRef]
44. Aparicio, E.; Martín-Grau, C.; Hernández-Martínez, C.; Voltas, N.; Canals, J.; Arija, V. Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth* **2021**. in process of being published.
45. Volk, B.M.; Kunces, L.J.; Freidenreich, D.J.; Kupchak, B.R.; Saenz, C.; Artistizabal, J.C.; Fernandez, M.L.; Bruno, R.; Maresh, C.M.; Kraemer, W.J.; et al. Effects of Step-Wise Increases in Dietary Carbohydrate on Circulating Saturated Fatty Acids and Palmitoleic Acid in Adults with Metabolic Syndrome. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113605. [CrossRef]
46. Ma, J.; Folsom, A.R.; Shahar, E.; Eckfeldt, J.H. Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 564–571. [CrossRef]
47. Wilson, N.; Mantzioris, E.; Middleton, P.; Muhlhauser, B. Influence of sociodemographic, lifestyle and genetic characteristics on maternal DHA and other polyunsaturated fatty acid status in pregnancy: A systematic review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2020**, *152*, 102037. [CrossRef] [PubMed]

Tabla 13. Correlación de Pearson entre los valores séricos absolutos y relativos de los ácidos grasos durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación.

Fatty acids	First trimester (T1)		Third trimester (T3)			
	Between absolute and relative concentration		Between absolute and relative concentration			
	<i>r</i>	<i>p-values*</i>	<i>r</i>	<i>p-values*</i>		
SFA						
Lauric acid (C12:0)	n= 471 – 472	0.254	< 0.001	n= 466 – 470	0.635	< 0.001
Myristic acid (C14:0)	n= 471 – 472	0.454	< 0.001	n= 472 – 473	0.334	< 0.001
Palmitic acid (C16:0)	n= 468 – 471	0.676	< 0.001	n= 470 – 475	0.724	< 0.001
Stearic acid (C18:0)	n= 472 – 475	-0.41	0.374	n= 474 – 475	-0.387	< 0.001
Σ Total SFA	n= 468 – 470	0.541	< 0.001	n= 468 – 474	0.605	< 0.001
MUFA						
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	n= 466 – 475	0.108	0.020	n= 469 – 472	0.211	< 0.001
Oleic acid (C18:1n-9)	n= 466 – 474	0.084	0.071	n= 469 – 471	0.349	< 0.001
Σ Total MUFA	n= 466 – 475	-0.007	0.880	n= 469 – 472	0.285	< 0.001
n-6 PUFA						
LA (C18:2n-6)	n= 467 – 476	0.397	< 0.001	n= 473 – 474	0.370	< 0.001
DHGLA (C20:3n-6)	n= 471 – 473	0.477	< 0.001	n= 474	0.163	< 0.001
AA (C20:4n-6)	n= 473 – 475	0.307	< 0.001	n= 471 – 473	0.154	0.001
Σ Total n-6 PUFA	n= 469 – 474	0.169	< 0.001	n= 473 – 476	0.206	< 0.001
n-3 PUFA						
EPA (C20:5n-3)	n= 467 – 469	0.859	< 0.001	n= 464	0.763	< 0.001
DHA (C22:6n-3)	n= 474 – 475	0.306	< 0.001	n= 472 – 476	0.215	< 0.001
Σ Total n-3 PUFA	n= 470 – 473	0.416	< 0.001	n= 470 – 475	0.291	< 0.001

LA, Linoleic acid; DHGLA, Dihomo- γ -linolenic acid; AA, Arachidonic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-6 PUFA, omega-6 polyunsaturated fatty acid; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid. (*) *p-values* < 0.01 were considered significant.

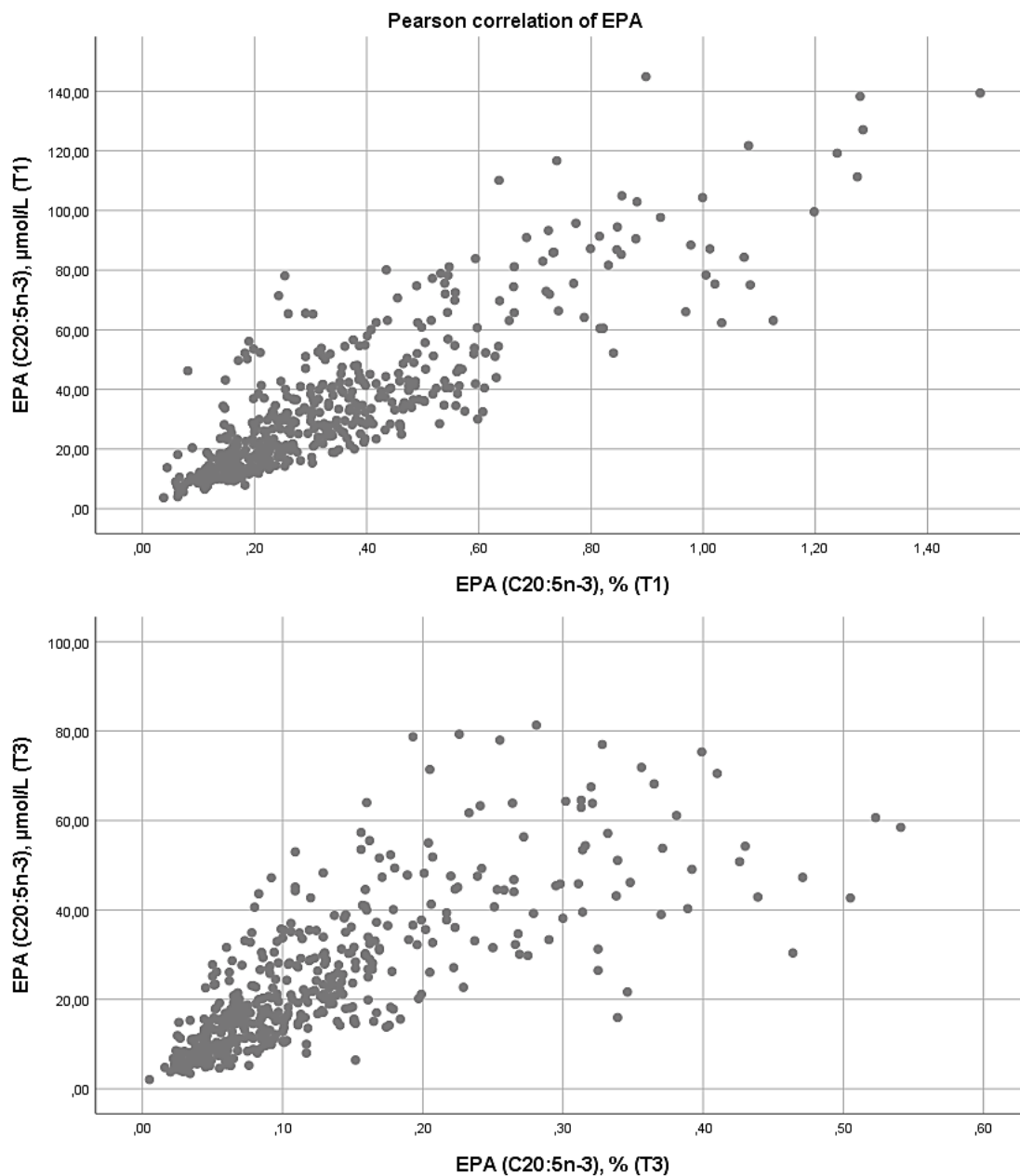


Figura 16. Correlación de Pearson entre los valores séricos absolutos y relativos del ácido eicosapentaenoico (EPA) durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación.

4. PUBLICACIÓN 4. Short-chain fatty acid reference ranges in pregnant women from a mediterranean region of Northern Spain: ECLIPSES Study.

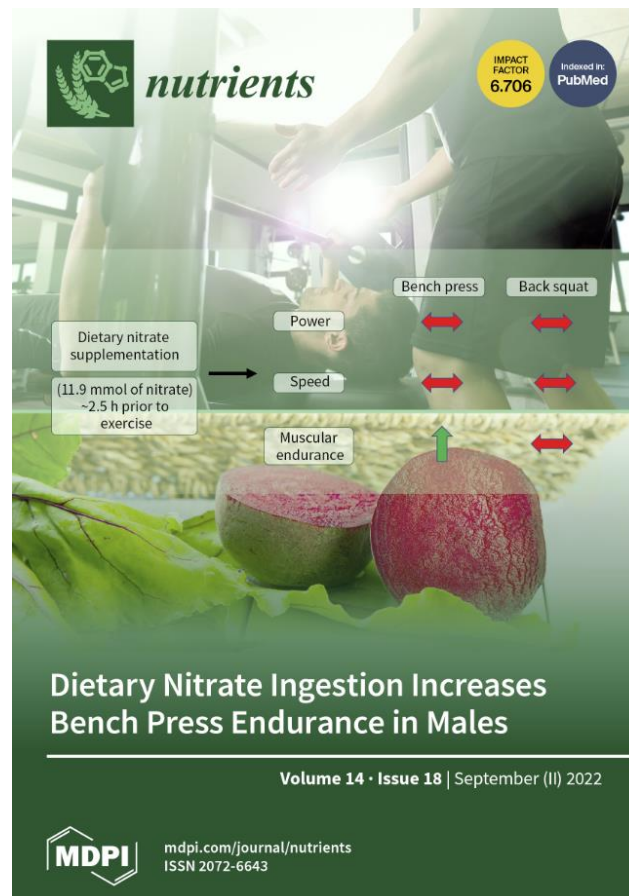
Carla Martín-Grau, Andrés Díaz-López, Estefania Aparicio and Victoria Arija. Short-Chain Fatty Acid Reference Ranges in Pregnant Women from a Mediterranean Region of Northern Spain: ECLIPSES Study. *Nutrients*, 2022, 14 (18), 3798 (doi: 10.3390/nu14183798) [241].

Tipo de publicación: artículo científico.

Estado: publicado en septiembre de 2022.

Métricas de la revista *Nutrients*:

- Factor de impacto: 6,706 (según JCR, del inglés *Journal Citation Report*).
- Categoría: en el primer cuartil (Q1) en *Nutrition & Dietetics* y *Food Science*.





Article

Short-Chain Fatty Acid Reference Ranges in Pregnant Women from a Mediterranean Region of Northern Spain: ECLIPSES Study

Carla Martín-Grau ^{1,2,3}, Andrés Díaz-López ^{2,4}, Estefania Aparicio ^{2,4} and Victoria Arija ^{2,4,5,*}

- ¹ Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Institut Català de la Salut, Generalitat de Catalunya, University Hospital Joan XXIII, 43005 Tarragona, Spain
 - ² Department of Basic Medical Sciences, Nutrition and Mental Health Research Group (NUTRISAM), Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University (URV), 43201 Reus, Spain
 - ³ Genetics Unit, Health Research Institute of Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain
 - ⁴ Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43005 Tarragona, Spain
 - ⁵ CENIT Research Group (Collaborative Group on Lifestyles, Nutrition and Smoking), Unitat de Suport a la Recerca Tarragona-Reus, Fundació Institut Universitari per a la Recerca a l'Atenció Primària de Salut Jordi Gol i Gurina (IDIAPJGol), 43202 Reus, Spain
- * Correspondence: victoria.arija@urv.cat; Tel.: +34-977-759334

Abstract: Maternal short-chain fatty acids (SCFAs) play a critical role in fetal development and metabolic programming. However, an important gap in the analysis of such relationships is the lack of reference values in pregnant women. Therefore, we establish serum SCFA percentile reference ranges both early and later in pregnancy in a population from a Mediterranean region of Northern Spain. A population-based follow-up study involving 455 healthy pregnant women (mean age 30.6 ± 5.0 years) from the ECLIPSES study is conducted. Sociodemographic, obstetric, anthropometric, lifestyle, dietary variables and blood samples were collected in the first and third trimesters. Serum SCFA concentrations were measured by LC-MS/MS. The 2.5/97.5 percentiles of the reference interval for serum acetic, propionic, isobutyric, and butyric acids were 16.4/103.8 µmol/L, 2.1/5.8 µmol/L, 0.16/1.01 µmol/L and 0.32/1.67 µmol/L in the first trimester of pregnancy, respectively. In the third trimester, butyrate levels increased with most of the maternal factors and categories studied, while acetic acid and isobutyric acid decreased only in some maternal categories. Propionic acid was not affected by maternal factors. Reference ranges did not vary with maternal age, body weight, social class or diet, but decreased with smoking, high physical activity, low BMI and primiparity. This study establishes for the first-time SCFAs reference ranges in serum for women in our region in both early and late pregnancy. This information can be useful to monitor pregnancy follow-up and detect risk values.

Keywords: short chain fatty acid; reference ranges; pregnancy; ECLIPSES



Citation: Martín-Grau, C.; Díaz-López, A.; Aparicio, E.; Arija, V. Short-Chain Fatty Acid Reference Ranges in Pregnant Women from a Mediterranean Region of Northern Spain: ECLIPSES Study. *Nutrients* **2022**, *14*, 3798. <https://doi.org/10.3390/nu14183798>

Academic Editor: Tim Green

Received: 25 July 2022

Accepted: 13 September 2022

Published: 15 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

SCFAs including acetate acid, propionate acid and butyrate acid are important metabolites produced by anaerobic bacterial fermentation in the colon of food components, mainly dietary fiber. To a lesser extent, they are ingested directly from food or are produced endogenously through metabolic processes [1]. In addition to acting as local substrates for energy production at the intestinal mucosa, after absorption, circulating SCFAs regulate numerous metabolic pathways through the G-protein coupled receptors (GPCRs) activation [2,3], such as GPR41, GPR43, and GPR109A, which are expressed in a variety of tissues such as liver, adipose tissue, skeletal muscle, and brain.

Some recent evidence indicates that maternal SCFAs status and their metabolism seem to play a crucial role during pregnancy. Interestingly, expression of both GPR41 and GPR43 receptors have been detected in human gestational tissues such as the uterus,

myometrium, placenta, amnion, and chorion [2] which have been related to the modulation of modulating inflammatory processes involved in parturition and the functional integrity of fetal membranes [2]. Moreover, experimental evidence in pregnant rats indicated that butyric acid supplementation during early pregnancy improved embryo implantation and maintained pregnancy through enhancing maternal phospholipids metabolism and ovarian progesterone synthesis [4]. Additionally, it has been demonstrated in mice that propionate acting as GPR43 ligands influences the control of insulin levels in the embryo, and via receptors GPR41 in the fetus influence the development of the sympathetic nervous system [5].

Pregnancy is a period of critical physiological and physical changes. Proper adaptation to these changes will influence the health of both mother and offspring [6–8]. In this regard, circulating maternal SCFAs are speculated to determine the development and metabolic programming of the fetus [9,10], and therefore their imbalance may be detrimental. Supporting such effects, epidemiological studies have observed that maternal gut microbiota alteration and circulating SCFA levels are associated with a range of pregnancy complications including maternal obesity, gestational diabetes, as well as hypertensive disorders such as preeclampsia and eclampsia [9,11–13]; while in the offspring, associations with childhood obesity, atopic diseases, and neurological diseases, such as autism has also been reported [9,14]. These immediate but mostly long-term consequences highlight the importance to maintain adequate SCFA levels during pregnancy.

To assess the global physiological effect of SCFAs, a relatively simple and reliable method in clinical practice is the determination of serum levels of SCFAs, since they are the ones that cross the intestinal barrier and reach the blood circulation. In this sense, the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>, accessed on 24 July 2022) and Tian, Z. et al. [15], although with great variability in the data offered, has reported from few studies the mean concentration in blood samples in non-pregnant adult population (>18 years) of acetate, propionate, butyrate and isobutyrate. Concerning pregnant women, only two studies have assessed SCFAs by reporting values as mean concentrations [12,16]. However, to our knowledge, there are no reference ranges or a consensus as to what constitutes normal maternal SCFA values in pregnant women. Moreover, it is also important to know the evolution of SCFA levels during the course of pregnancy, since some studies have reported that between the first and last trimester of pregnancy, there are significant changes in SCFA-producing gut microbiota [6,17–19].

Considering the above-mentioned background, the need for population-based SCFA reference values throughout the course of the pregnancy and reported as percentiles will be an important contribution to the correct assessment of SCFA status both in routine clinical practice and in research. Therefore, the aim of this study was to establish serum SCFA percentile reference ranges both early and later in pregnancy in a pregnant population from a Mediterranean region of Northern Spain. In addition, the association between socioeconomic and maternal lifestyle factors and the maternal SCFAs profile has been evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Participants

A population-based prospective cohort study of pregnant women was conducted from the first trimester (T1) to the third trimester (T3). Participants were pregnant women without chronic pathology, who participated in the ECLIPSES study [20,21]. This study is registered in both the ClinicalTrials.gov (identification number NCT03196882) and the European Union (EU) Clinical Trial Register (EUCTR-2012-005480-28). A detailed description of the Details of ECLIPSES have been published elsewhere [20]. The ECLIPSES trial was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Jordi Gol Institute for Primary Care Research (IDIAP) and the Pere Virgili Institute for Health Research (IISPV). Eligible participants were healthy adult women older than 18 years at ≤ 12 weeks of gestation from Catalonia, Spain. The exclusion criteria were multiple pregnancies, anemic status, taking iron supplements (>10 mg) before week 12 of gestation, hypersensitivity to egg protein,

previous severe disease such as immunosuppression, or any chronic disease that could affect nutritional development (malabsorption syndrome, diabetes, cancer, hepatopathies). These exclusion criteria were applied at the beginning of the study and during gestational follow-up. Informed consent was obtained from all women included in this study. The study complies with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Of the 793 pregnant women initially recruited, for the present analysis, all women who had data regarding serum SCFAs measurements at first (around 12 weeks of gestation) and third (around 36 weeks of gestation) trimester of pregnancy were included. Therefore, the total study sample consisted of 455 pregnant women. Participant dropout was caused by voluntary abandonment (women who have voluntarily decided to not continue with the study, $n = 245$), emergence of exclusion criteria during pregnancy ($n = 41$), miscarriage or termination of pregnancy ($n = 14$), and lost to follow-up ($n = 36$), and laboratory incident ($n = 2$). The flow of participants and serum collection is outlined in Figure 1.

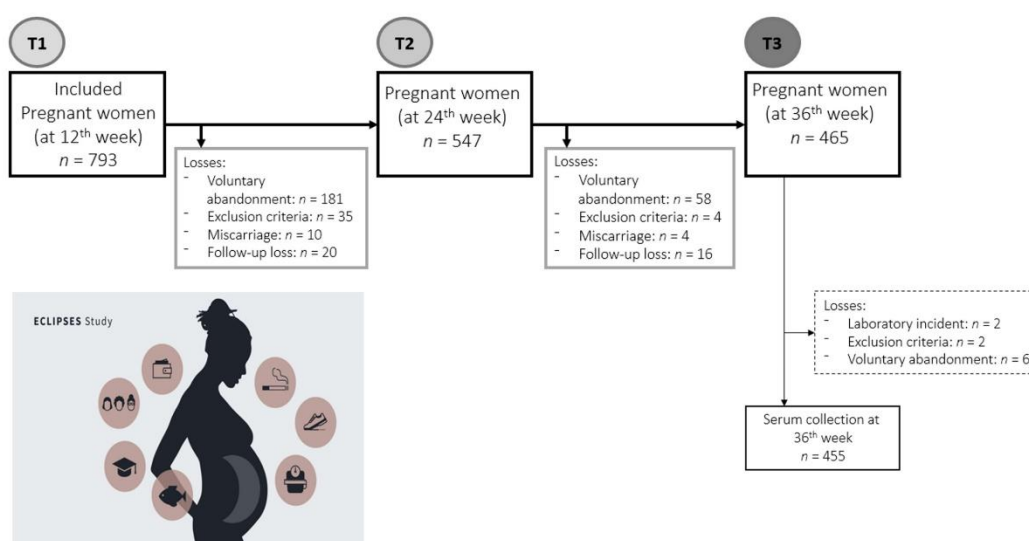


Figure 1. The flow of participants and serum collection during pregnancy.

2.2. Data Collection

Midwives, gynecologist and nutritionists collected the participants' medical and obstetric history (including parity (primipara and multipara) and gestational age calculated by fetal ultrasound biometry and extracted from medical records), socioeconomic information, ethnicity, education level, lifestyle habits, and anthropometric measurements was collected throughout pregnancy during the personal interview and from specific questionnaires. The socioeconomic level was calculated by using the Catalan classification of occupations (CCO-2011) [22] such as student, employed and unemployed. The education level was classified as low (primary or less), medium (high school), and high (university studies or more). Physical activity was assessed by using the International Physical Activity Questionnaire [23]. Physical activity was derived from total metabolic equivalents (METs) values based on frequency and duration of walking and moderate and vigorous-intensity activity and classified as sedentary/low (<600 METs min/week), moderate (≥ 600 to 2999 METs min/week), and high (≥ 3000 METs min/week). The Fagerström questionnaire (Fagerström_Q) [24] was used to assess smoking. The women were classified as smoker, ex-smoker and non-smokers. Anthropometric measures were height (cm) and weight (kg). Body mass index (BMI) was calculated and categorized following World Health Organization (WHO) criteria [25] as normal weight (BMI = 18.5–24.9 kg/m²),

overweight (BMI = 25.0–29.9 kg/m²) and obesity (BMI ≥ 30 kg/m²). Total gestational weight gain (GWG) was calculated and conditioned by the initial BMI, and was categorized into insufficient, adequate or excessive GWG according to the 2009 Institute of Medicine (IOM) recommendations [26]. An adequate GWG corresponds between 11.5–16 kg for an initial normal weight, between 11.5–16 kg for an initial overweight, and between 5–9 kg for an initial obesity. Values below or above adequate GWG were considered insufficient or excessive GWG, respectively.

Usual food consumption of the women was assessed both T1 and T3 through a self-administered food frequency questionnaire (FFQ) regarding 45-food groups, previously validated in our population [27]. This questionnaire asked about the usual frequency of consumption per week or per month for each food group. Grams per day were calculated for each food group according to the standardized size and weight of a serving portion of validated questionnaire. Daily intake of energy and nutrients was calculated using the REGAL (Répertoire Général des Aliments) food composition table [28] and was complemented by the Spanish food composition table [29]. As a result, we obtained daily intake of macronutrients such as fiber and protein which were analyzed in this study in relation to SCFA since could be related to microbiota and may change during pregnancy. From this FFQ, a Spanish diet quality index (SQDI) [30] was estimated based on intake of nine food groups (fruits, vegetables, legumes, cereals, fresh fish, meat and processed meat, dairy products, olive oil, and alcohol). The resulting score ranged from 0 to 18 points, with higher values indicating a greater adherence to the SDQI, and therefore, higher diet quality. Since there are no pre-established cut-off points for the pregnant population, scores were categorized as low (0–6 points), moderate (7–10 points), and high (11–18 points) diet quality. Regarding alcohol consumption, women were classified as non-drinker and drinker of alcohol.

2.3. Short-Chain Fatty Acids Measurers

During the course of the study, fasting serum samples were collected both T1 and T3 (12 ± 0.5 and 36 ± 0.4 gestational week, respectively) of gestation into 7.5 mL tubes without anticoagulant and were left without mixing for 30 min at room temperature to enable coagulation. The serum was separated by centrifugation and stored into aliquots of 500 µL at –80°C inside the BioBank until assayed. Samples were thawed at the end of the study and simultaneously assayed to minimize inter-batch variation [20].

With respect to the sample preparation [31] and quantification of the serum SCFAs (acetate, propionate, isobutyric, and butyrate acids) by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), briefly, the method starts with a 20 µL sample mixed with internal standard mixture in methanol to precipitate proteins. Then, supernatants were mixed with water, o-Benzylhydroxylamine (BHA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC, Sigma Aldrich) to obtain SCFAs derivatives. SCFAs derivatives were purified by a liquid-liquid extraction using diethyl ether and SCFAs quantification was performed by LC-MS/MS using the Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) 1290 Infinity II Series coupled to a QqQ 6470 Series[®] (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The chromatographic separation was performed with an elution gradient using a ternary mobile phase containing water, methanol and isopropanol with ammonium formate on the analytical Kinetex Polar C18 (2.6 µm 2.1 × 100 mm) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mass spectrometer operates in multiple reaction monitoring (MRM) mode and SCFAs were ionized by positive electrospray. The UHPLC-MS/MS system was controlled by the Agilent MassHunter[®] Workstation (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The samples were analyzed in duplicate and the mean of the two values was calculated.

2.4. Statistical Analysis

Descriptive data were presented as mean ± SD for quantitative variables or number (%) for qualitative variables. The range, mean, and percentiles of the maternal serum con-

centration expressed as $\mu\text{mol/L}$ of SCFAs (acetate, propionate, isobutyrate, and butyrate) during first and third trimester of pregnancy were profiled. The SCFAs reference intervals were determined following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 guidelines [32] and represented the central 95% of the tested population (being the 2.5% and 97.5% confidence intervals the lower and upper limits, respectively). In this study, outlier values were identified and handled such as Martín-Grau, C et al. [33]. The means between groups (the first and third trimesters of pregnancy) were compared by the paired Student's *t*-test. While ANOVA or independent-sample *t*-tests, as appropriate, was used to determine statistical differences in the distribution of SCFAs for intragroup comparisons. The subgroup-variable included the following prenatal characteristics: maternal age (<25, 25–29, ≥ 30 years), initial BMI (normal weight, overweight, obesity), gestational weight gain (insufficient, adequate, excessive), social class (low, medium, high), maternal smoking status (no, yes), parity (primiparous, multiparous), alcohol consumption (no, yes), physical activity (low, moderate, high), SQDI score (low, moderate, high), fiber (in terciles) and proteins (in terciles). Additional multivariable-adjusted analysis to investigate the independent association between maternal factors and circulating SCFA was performed (Tables S1 and S2). Results were reported as mean \pm SD. All of the statistical analyses were run by the statistical software package SPSS version 25.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Participants' Characteristics

Table 1 shows the baseline sociodemographic and lifestyle characteristics of the pregnant women participating in the ECLIPSES study. Overall, the mean age was 30.6 ± 5.0 years old, and 23.3% of them had over 35 years old. Most of the women were Spanish (84%), 38% had a medium/high educational level, 22% were of high social class, 17% of them smoked during pregnancy, and up to 87% of them were employed. Their mean BMI initial was $24.8 \pm 4.3 \text{ kg/m}^2$ and about 13% of women were stratified as obese with $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. The mean GWG was $10.0 \pm 3.6 \text{ kg}$. According to the IOM recommendations, 39% met, 41% fell below and 20% exceeded the criteria for GWG. The participants reported that 15.3% smoked and 14% drank at the beginning of pregnancy. The mean Physical activity was $709 \pm 961 \text{ METs min/week}$ and 56.4% of the women had a low level. The SQDI scores ranged from 4 to 17 points with the mean score being 9.7 ± 2.3 .

Table 1. Sociodemographic and lifestyle characteristics of pregnant women (*n* = 455).

Characteristics	Summary Statistics
Age (years) ^a	30.6 ± 5.0
Country of origin, Spain (%)	84.1
Primipara (%)	37.5
Gestational age at T1 (weeks) ^a	12 ± 0.5
Gestational age at birth (weeks) ^a	39.8 ± 1.1
BMI (kg/m^2) at first trimester (%)	
18.5–24.9 (normal weight)	62.2 (22.1 ± 1.7) ^a
25.0–29.9 (overweight)	25.3 (27.3 ± 1.3) ^a
≥ 30 (obesity)	12.5 (33.3 ± 2.9) ^a
Gestational weight gain (kg) ^a	10.8 ± 3.6
Educational level (%)	
Low (primary or less)	30.1
Medium (high school)	38.3
High (university or more)	31.6

Table 1. Cont.

Characteristics	Summary Statistics
Occupation (%)	
Student	2.4
Employed	87.1
Unemployed	10.5
Smoking status (%)	
Smoker	15.3
Non-Smoker	69.5
Ex-Smoker	15.3
Alcohol consumption (%)	14
Physical Activity (METs min/week) at first trimester (%)	
Low (<600)	56.4
Moderate (≥600–2999)	39.4
High (≥3000)	4.2
SQDI (score) at first trimester ^a	9.7 ± 2.6

^a Values are expressed as a mean ± standard deviation (SD). Abbreviation: BMI, body mass index; SQDI, Spanish Diet Quality Index; METs, Metabolic equivalents.

3.2. Short Chain Fatty Acids in Serum of Pregnant Women

Table 2 reports the means, ranges (min/max), and percentiles (from 2.5th to 97.5th) of serum SCFAs concentrations at both T1 and T3 of pregnancy expressed as µmol/L for the entire study population. The reference interval 2.5th/97.5th percentiles for acetic, propionic, isobutyric, and butyric acids in serum were 16.4/103.8 µmol/L, 2.1/5.8 µmol/L, 0.16/1.01 µmol/L, and 0.32/1.67 µmol/L in the first trimester of pregnancy, respectively. At the third trimester, the reference interval 2.5th/97.5th percentiles of SCFAs were quantitatively similar to those observed at the beginning of pregnancy.

Table 2. Range, mean, and percentile distribution of maternal short chain fatty acid serum concentration (µmol/L) during pregnancy period.

Short Chain Fatty Acid		Range			Reference Interval	Percentile												
		Min	Mean ± SD	Max	Percentiles (2.5–97.5%)	2.5	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	97.5
Acetic acid (C2:0)	T1	4.37	49.0 ± 21.4	172.8	16.4–103.8	16.4	21.4	29.2	34.5	38.4	42.0	45.7	49.7	53.9	60.7	72.2	84.9	103.8
	T3	13.9	48.5 ± 18.2	130.4	23.3–108.1	23.3	26.8	30.8	35.0	38.8	42.5	45.0	48.6	52.6	59.1	68.9	89.3	108.1
Propionic acid (C3:0)	T1	1.60	3.54 ± 0.87	6.55	2.1–5.8	2.1	2.3	2.5	2.8	3.1	3.3	3.5	3.7	3.9	4.2	4.6	4.9	5.8
	T3	1.63	3.52 ± 1.03	7.81	2.1–6.5	2.1	2.2	2.4	2.8	3.0	3.1	3.3	3.5	3.8	4.1	5.0	5.6	6.5
Isobutyric acid (C4:0)	T1	0.19	0.47 ± 0.19	1.35	0.16–1.01	0.16	0.21	0.26	0.33	0.38	0.41	0.45	0.48	0.53	0.57	0.66	0.83	1.01
	T3	0.24	0.45 ± 0.24	1.83	0.14–1.19	0.14	0.18	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40	0.44	0.49	0.56	0.68	0.92	1.19
Butyric acid (C4:0)	T1	0.33	0.79 ± 0.33	1.98	0.32–1.67	0.32	0.37	0.43	0.52	0.60	0.67	0.73	0.82	0.89	1.05	1.26	1.48	1.67
	T3	0.41	0.91 ± 0.42 ^a	2.70	0.37–2.09	0.37	0.42	0.49	0.58	0.66	0.74	0.81	0.90	1.03	1.16	1.52	1.70	2.09

Abbreviation: SD, standard deviation; T1, First Trimester of pregnancy; T3, Third trimester of pregnancy. The significance of (^a) is $p < 0.05$ compared with T1 and T3 as derived from Student's *t*-tests.

In both trimesters, acetic acid was present in higher concentrations in serum (T1, 49.0 ± 21.4 µmol/L; T3, 48.5 ± 18.2 µmol/L) followed by butyric acid (T1, 0.79 ± 0.33 µmol/L; T3, 0.91 ± 0.42 µmol/L) and isobutyric acid (T1, 0.47 ± 0.19 µmol/L; T3, 0.45 ± 0.24 µmol/L), while serum propionic acid concentrations were lower (T1, 3.54 ± 0.87 µmol/L; T3, 3.52 ± 1.03 µmol/L) (Table 2). From T1 to T3, there was clearly significant increase in butyrate globally (0.91 ± 0.42 µmol/L, $p < 0.001$). A comparison of the mean of circulating SCFAs by sociodemographic and lifestyle factors of the pregnant women is shown in Table 3. Despite some differences, most of the maternal factors had low influence in the concentrations of SCFAs or reference ranges. In T1, only propionic acid was affected by

maternal factors, the mean values decreased significantly in the subgroups of smokers' women, and in women who practice intense physical activity. Nevertheless, levels of propionic acid at the T3 were higher in obese women and multiparity. In T3, pregnant smokers also had lower values of isobutyrate and butyrate. In addition, the high physical activity decreased isobutyrate levels in T3.

When comparisons of SCFAs concentrations between trimesters were performed, no changes were observed for serum propionate levels throughout the course of the pregnancy according to maternal factors (Table 3). However, a significant decrease in values of acetate were observed in T3 in mothers younger than 25 years, in those women who drunk alcohol and had poorer diet quality. Related to isobutyrate levels, lower values were significantly observed in women with adequate weight gain, low social class, intense physical activity and poorer diet quality in T3. By contrast, most of the maternal factors, and in almost all of their categories, influence the increase in butyric acid levels from T1 to T3.

Table 3. Mean of maternal serum short chain fatty acids concentrations by selected sociodemographic and lifestyle characteristics of pregnant women.

Maternal Factors	Short Chain Fatty Acids (µmol/L)											
	Acetic Acid (C2:0)			Propionic Acid (C3:0)			Isobutyric Acid (C4:0)			Butyric Acid (C4:0)		
	T1 (n = 454) Mean ± SD	T3 (n = 454) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 449) Mean ± SD	T3 (n = 449) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 450) Mean ± SD	T3 (n = 450) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 457) Mean ± SD	T3 (n = 457) Mean ± SD	p T1–T3
All	49.0 ± 21.4	48.5 ± 18.2	0.661	3.54 ± 0.87	3.52 ± 1.03	0.701	0.47 ± 0.19	0.45 ± 0.24	0.103	0.79 ± 0.33	0.91 ± 0.42	<0.001 *
Age (years)												
<25	52.6 ± 22.7	43.8 ± 12.7	0.023 *	3.52 ± 0.83	3.39 ± 0.94	0.351	0.46 ± 0.18	0.40 ± 0.17	0.101	0.81 ± 0.32	0.86 ± 0.38	0.181
25–34.9	49.4 ± 21.6	49.1 ± 18.9	0.731	3.55 ± 0.87	3.53 ± 1.05	0.872	0.47 ± 0.19	0.46 ± 0.26	0.182	0.79 ± 0.33	0.92 ± 0.44	<0.001 *
≥35	46.6 ± 20.8	49.6 ± 19.4	0.197	3.55 ± 0.91	3.54 ± 1.05	0.954	0.45 ± 0.19	0.46 ± 0.25	0.726	0.79 ± 0.35	0.87 ± 0.37	0.040 *
BMI (kg/m ²) at T1												
18.5–24.9 (NW)	49.3 ± 22.0	47.6 ± 18.1	0.305	3.53 ± 0.87	3.41 ± 0.96	0.134	0.48 ± 0.20	0.44 ± 0.23	0.071	0.81 ± 0.34	0.90 ± 0.41	<0.001 *
25.0–29.9 (OW)	48.6 ± 19.6	50.5 ± 18.7	0.387	3.59 ± 0.92	3.61 ± 1.00	0.985	0.45 ± 0.18	0.47 ± 0.28	0.677	0.80 ± 0.32	0.87 ± 0.40	0.086
≥30 (O)	48.9 ± 25.0	47.3 ± 19.2	0.732	3.65 ± 0.82	3.86 ± 1.34 ^a	0.243	0.46 ± 0.19	0.43 ± 0.26	0.474	0.74 ± 0.30	0.92 ± 0.45	0.015 *
Gestational weight gain (kg)												
Insufficient	49.9 ± 20.1	47.9 ± 18.2	0.411	3.54 ± 0.92	3.46 ± 1.07	0.786	0.47 ± 0.2	0.44 ± 0.24	0.331	0.81 ± 0.36	0.86 ± 0.38	0.148
adequate	48.8 ± 22.3	48.7 ± 17.2	0.937	3.64 ± 0.91	3.56 ± 1.00	0.450	0.48 ± 0.20	0.42 ± 0.21	0.011	0.77 ± 0.32	0.91 ± 0.42	0.003 *
Excessive	48.8 ± 18.7	45.7 ± 19.1	0.353	3.51 ± 0.70	3.51 ± 1.19	0.892	0.47 ± 0.17	0.43 ± 0.27	0.133	0.77 ± 0.27	0.91 ± 0.48	0.024 *
Social class												
Low	50.7 ± 19.6	48.3 ± 17.2	0.464	3.71 ± 0.82	3.76 ± 1.15	0.543	0.51 ± 0.24	0.42 ± 0.22	0.047	0.83 ± 0.34	0.93 ± 0.50	0.123
Medium	49.0 ± 20.9	48.1 ± 18.4	0.548	3.54 ± 0.86	3.50 ± 1.01	0.469	0.46 ± 0.17	0.44 ± 0.25	0.361	0.81 ± 0.33	0.91 ± 0.42	<0.001 *
High	49.7 ± 23.7	51.1 ± 19.4	0.782	3.47 ± 0.95	3.53 ± 1.04	0.764	0.47 ± 0.20	0.48 ± 0.26	0.884	0.74 ± 0.31	0.90 ± 0.38	0.004 *
Smoking during pregnancy												
No	50.0 ± 22.5	48.9 ± 18.4	0.414	3.59 ± 0.88	3.54 ± 1.01	0.440	0.47 ± 0.19	0.46 ± 0.25	0.282	0.79 ± 0.32	0.92 ± 0.42	<0.001 *
Yes	45.0 ± 13.6	47.2 ± 17.8	0.311	3.32 ± 0.71 ^a	3.41 ± 1.11	0.333	0.44 ± 0.18	0.38 ± 0.22 ^a	0.172	0.81 ± 0.39	0.81 ± 0.36 ^a	0.752
Parity												
Primiparous	50.8 ± 24.6	47.2 ± 17.5	0.127	3.53 ± 0.88	3.39 ± 1.00	0.307	0.48 ± 0.20	0.45 ± 0.25	0.302	0.82 ± 0.35	0.92 ± 0.43	0.003 *
Multiparous	48.2 ± 19.0	49.6 ± 18.9	0.396	3.57 ± 0.85	3.61 ± 1.04 ^a	0.677	0.46 ± 0.19	0.44 ± 0.24	0.254	0.78 ± 0.33	0.90 ± 0.41	<0.001 *
Alcohol consumption												
No	49.3 ± 21.5	48.7 ± 18.3	0.687	3.55 ± 0.87	3.58 ± 1.03	0.786	0.46 ± 0.19	0.44 ± 0.25	0.145	0.80 ± 0.34	0.91 ± 0.42	<0.001 *
Yes	46.4 ± 5.38	34.3 ± 3.6	0.037	3.90 ± 0.36	3.00 ± 0.59	0.219	0.53 ± 0.09	0.34 ± 0.08	0.117	0.77 ± 0.10	0.66 ± 0.24	0.959
Physical Activity (METs/week) at T1												
Low (<600)	48.7 ± 21.2	48.4 ± 19.0	0.716	3.64 ± 0.92	3.58 ± 1.12	0.382	0.48 ± 0.20	0.48 ± 0.27	0.757	0.79 ± 0.31	0.89 ± 0.42	<0.001 *
Moderate (600–2999)	50.6 ± 21.6	49.2 ± 18.1	0.571	3.46 ± 0.82	3.49 ± 0.92	0.623	0.45 ± 0.18	0.42 ± 0.22 ^a	0.119	0.82 ± 0.37	0.95 ± 0.42	0.001 *
High (≥3000)	46.7 ± 18.3	46.3 ± 11.1	0.940	3.19 ± 0.53 ^a	3.40 ± 0.93	0.401	0.48 ± 0.19	0.36 ± 0.13	0.050 *	0.74 ± 0.24	0.89 ± 0.41	0.092
SQDI (score) in T1 or T3												
Low (0–6 pts)	54.1 ± 20.3	47.6 ± 17.3	0.115	3.67 ± 0.90	3.54 ± 1.26	0.553	0.48 ± 0.19	0.46 ± 0.29	0.672	0.85 ± 0.37	0.86 ± 0.47	0.928
Moderate (7–10 pts)	49.0 ± 21.7	46.5 ± 17.5	0.239	3.59 ± 0.87	3.53 ± 1.07	0.547	0.48 ± 0.19	0.45 ± 0.23	0.237	0.81 ± 0.33	0.90 ± 0.43	0.026 *
High(11–18 pts)	47.9 ± 22.1	47.3 ± 16.4	0.770	3.48 ± 0.87	3.53 ± 1.05	0.686	0.45 ± 0.19	0.41 ± 0.21	0.053	0.76 ± 0.31	0.89 ± 0.39	0.002 *

Table 3. Cont.

Maternal Factors	Short Chain Fatty Acids (µmol/L)											
	Acetic Acid (C2:0)			Propionic Acid (C3:0)			Isobutyric Acid (C4:0)			Butyric Acid (C4:0)		
	T1 (n = 454) Mean ± SD	T3 (n = 454) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 449) Mean ± SD	T3 (n = 449) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 450) Mean ± SD	T3 (n = 450) Mean ± SD	p T1–T3	T1 (n = 457) Mean ± SD	T3 (n = 457) Mean ± SD	p T1–T3
Fiber (g/d) in T1 or T3												
t ₁ (<10 g/d)	49.0 ± 21.8	47.4 ± 15.3	0.504	3.59 ± 0.88	3.56 ± 1.07	0.803	0.46 ± 0.17	0.43 ± 0.22	0.222	0.80 ± 0.33	0.90 ± 0.41	0.031 *
t ₂ (10–14 g/d)	49.3 ± 20.7	45.5 ± 16.4	0.110	3.48 ± 0.87	3.39 ± 1.07	0.436	0.46 ± 0.19	0.42 ± 0.19	0.062	0.77 ± 0.32	0.85 ± 0.39	0.049 *
t ₃ (>14 g/d)	49.6 ± 22.8	47.9 ± 19.0	0.534	3.60 ± 0.88	3.63 ± 1.08	0.821	0.49 ± 0.21	0.46 ± 0.27	0.310	0.83 ± 0.33	0.91 ± 0.44	0.073
Proteins (g/d) in T1 or T3												
t ₁ (<49g/d)	47.8 ± 22.1	47.7 ± 15.5	0.960	3.47 ± 0.86	3.57 ± 1.03	0.419	0.45 ± 0.19	0.43 ± 0.22	0.335	0.79 ± 0.34	0.92 ± 0.43	0.007 *
t ₂ (49–61g/d)	50.3 ± 22.4	46.9 ± 17.8	0.194	3.55 ± 0.87	3.54 ± 1.11	0.953	0.49 ± 0.20	0.44 ± 0.23	0.064	0.76 ± 0.30	0.92 ± 0.44	0.001 *
t ₃ (>61 g/d)	49.9 ± 20.7	46.3 ± 17.6	0.142	3.67 ± 0.90	3.49 ± 1.10	0.152	0.48 ± 0.19	0.44 ± 0.24	0.248	0.84 ± 0.34	0.83 ± 0.38	0.824

Values are expressed as a mean ± standard deviation (SD). Abbreviations: T, trimester; BMI, body mass index; NW, normal weight; OW, overweight; O, obesity; METs, metabolic equivalents; SQDI, Spanish Diet Quality Index in T1 or T3, depending on the SCFA assessment trimester; pts, points; t, tercile; g/d, grams per day. The significance of (*) is *p*-value < 0.05. ^a *p* < 0.05 compared with the first category as derived from ANOVA or Student's *T* tests, as appropriate. *p* values for the differences in serum short chain fatty acids concentrations between trimesters (T1 vs. T3) as derived from Student's *T* tests.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study that has explored the serum levels of SCFA, acetate, propionate, butyrate, and isobutyrate throughout pregnancy in a cohort of pregnant women from a Mediterranean region of Northern Spain. The current study describes the status of SCFA and the reference ranges corresponding to the 2.5th and 97.5th percentile interval at the beginning and the end of the pregnancy, and also assess the influence of maternal factors on the serum levels of SCFA, which there is scarce evidence of in the literature. The data obtained in this study will allow for greater control of SCFA serum levels during pregnancy follow-up, and detect levels outside the normal range, which may be linked to complications for the mother and her offspring [12,13].

Despite the importance of preserving a healthy state during pregnancy, there are no reliable reference ranges representing healthy pregnant women to judge the status of SCFAs, making medical/therapeutic decisions, or other physiological assessments during the gestational process. Based on the literature, we did not find any community-based study that analyses serum concentrations of SCFAs in pregnant women. Only two studies with a small sample size determined mean concentrations of SCFAs in the first trimester of gestation which mean values of SCFA differs from our results. First, Priyadarshini, M. et al. [12] have analyzed mean values for acetic acid (25.6–26.9 $\mu\text{mol/L}$), propionic acid (1.8–2.0 $\mu\text{mol/L}$) and butyric acid (0.5–0.9 $\mu\text{mol/L}$) in obese ($n = 10$) vs. normal weight ($n = 10$) pregnant women during the first trimester of pregnancy by gas chromatography. Second, Bahado-Singh, R.O. et al. [16] have reported mean values for acetic acid (28.2–22.9 $\mu\text{mol/L}$) and isobutyric acid (6.7–5.6 $\mu\text{mol/L}$) in British women with fetal aneuploidies ($n = 30$) vs. normal control cases ($n = 114$) during the first trimester of pregnancy employing nuclear magnetic resonance. The first trimester of pregnancy is described as a state of low-grade inflammation at the gut mucosal surface characterized by an increase in Ruminococcus and Faecalibacterium (butyrate-producing microorganisms with anti-inflammatory activity) [7,17,34], which is similar to that observed in healthy, non-pregnant women [17,19]. Therefore, basal fatty acid status during the first trimester should resemble those published in healthy adults. In this sense, some studies in the adult population are available in the Human Metabolome Database (HMD) (<http://www.hmdb.ca/>, accessed on 24 July 2022) which compiles the mean concentration of SCFAs in blood samples of adults (>18 years old) and values from Tian, Z. et al. [15]. In particular, 41.9–69.1 $\mu\text{mol/L}$ of acetic acid ($n = 21$, with NMR spectroscopy and $n = 40$, with UHPLC-MS/MS system, respectively compiled in HMD), 1.1–2.84 $\mu\text{mol/L}$ of propionic acid (bibliography not available in HMD and $n = 14$, with GC-MS system [15]), 0.3–2.7 $\mu\text{mol/L}$ of butyric acid (bibliography not available in HMD and $n = 14$, with GC-MS system [15]), and 2.3 $\mu\text{mol/L}$ of isobutyric acid (bibliography not available in HMD). The mean values showed by these few publications from this database show that mean values for acetic (49.0 $\mu\text{mol/L}$) and butyric (0.79 $\mu\text{mol/L}$) acid are similar to our cohort of healthy pregnant women, whereas we found higher mean values for propionic (3.54 $\mu\text{mol/L}$) acid and lower mean values for isobutyric (0.47 $\mu\text{mol/L}$). The differences in these values can be attributed to several causes. One point to consider is that the methodology used in these previous studies differed from one study to another so comparisons among them are difficult. In addition, the studies discussed (<http://www.hmdb.ca/>, accessed on 24 July 2022 and [15,18,19]) have a very small sample size and, therefore, the presence of extreme intra-individual values can greatly modify the mean and cannot be considered as population values.

Recent research has shown that the composition of the gut microbiota changes significantly from T1 to T3 [19] and, thus, may affect SCFAs production. The highest concentration of SCFAs is found in the lumen of the colon, where they are readily absorbed by colonocytes in a concentration-dependent manner. If not metabolized by colonocytes, SCFAs are then released from the gut via the hepatic and portal venous systems [35,36]. Some authors suggested that the liver takes up propionate and butyrate, thus decreasing release of these two SCFAs into the systemic circulation. However, acetate apparently escapes hepatic metabolism to some degree and is present at a higher concentration in the peripheral circu-

lation than either propionate or butyrate [36,37]. Moreover, acetate enters the peripheral circulation to be metabolized by peripheral tissues [38]. Related to the serum SCFAs levels, our results support the idea that the acetate is the most abundant SCFA such as the Human Metabolome Database and other authors [9]. However, no study to date has evaluated maternal SCFAs status in the third trimester of pregnancy, and therefore, their changes during pregnancy was unknown. Overall, our results showed that SCFA levels remained relatively constant over the course of pregnancy with some minor exceptions for acetic acid and isobutyric acid, while there was a large change for butyric acid. Butyric acid increased significantly with all maternal factors studied and in almost all category of each factor from early to later pregnancy. This change is important because the butyrate has been described as an anti-inflammatory agent [1,37] that increased to counteract the higher degree of inflammation that occurs in late pregnancy compared to T1 [6]. This fact could be related to the change in the intestinal microbiota during pregnancy as an increase in Actinobacteria and Proteobacteria Phyla and a reduction in Faecalibacterium has been reported, which induced more intestinal inflammation, and increased energy storage with maternal weight gain and hyperglycemia [6,18,19]. Changes in gut microbiota during T3 are very similar to those that occur in patients with certain inflammatory metabolic syndrome such as obesity or diabetes [6,12,19]. Nevertheless, despite the decline in Faecalibacterium during T3 described by some authors [6,19], a slight increase in butyrate levels (from 1.5% to 1.7%) was detected in our pregnant women. Therefore, variation in butyrate concentrations during pregnancy does not appear to be related to the described changes in the microbiota but could be influenced by other characteristics such as the amounts of microbiota present in the colon, the source of the substrate, intestinal transit time [9], host genetics, dietary composition, lifestyle factors [39]. However, in our results we observed that the increase in butyric acid levels from T1 to T3 was detected in all categories of the factors studied, so it seems that the increase in butyric acid levels is independent of these maternal factors. Further studies are needed to understand the underlying mechanisms of these changes. In contrast to butyric acid, only some environmental characteristics assessed in our sample modified acetate (younger age and alcohol consumption) and isobutyrate (low social class, adequate gestational weight gain and high physical activity) levels, decreasing them in T3.

In terms of dietary composition, many authors claim that SCFA concentrations increase when following a correct diet with high-fiber soluble products, while the production of SCFAs is reduced with the use of a fiber-restricted or high-fat diet [17–19]. Nevertheless, these findings are not supported by our results, nor a recent systematic review of 44 studies on the impact of dietary fiber on SCFA production, which showed that most studies (a total of 26) did not show significant differences in individual SCFA levels respected to fiber intake, while the others reported significant differences for one or only for some SCFA, but differing in the type of SCFA [40]. In our study, significant differences are only detected for butyric acid which increased in T3 compared to T1 when fiber intake was <14 g/d (1st and 2nd tercile) and when protein intake was <61 g/d (1st and 2nd tercile). Indeed, some authors have observed that the concentration of SCFAs seems to be dosage-influenced and type and structure of dietary fibers [40]. Normally, gut bacteria rely on carbohydrates and fiber for energy and use protein as an energy source when the first ones are scarce [39]. In this study, only women who maintain a moderate-high quality diet increased their butyrate levels in T3 compared to T1. It is noteworthy to consider that in our cohort, the reference values provided for serum SCFAs are independent of diet and fiber intake.

In term of lifestyle factors, women who consume alcohol, are younger, have lower social class and practice high physical activity during pregnancy, reduce acetic acid or isobutyric acid concentrations in T3 compared to T1. In general, physical activity raises Faecalibacterium (Firmicutes phyla) and modifies microbial composition [39]. In fact, athletes produce an abundance of fecal butyrate concentrations [41]. Nevertheless, an increase in butyrate concentration is observed in our women when they practice low-moderate physical activity in T3 compared to T1. It should be noted that only 4.2% of our pregnant women were highly physically active and therefore a larger number of women would be

needed to establish the trend of butyric acid in these physical conditions. With regards to tobacco, smokers' women have a tendency to lower mean values for all SCFAs compared to non-smokers and in the case of butyric acid, the decrease was significant. This difference is observed throughout the pregnancy but is most significant during T3. One of the mechanisms of absorbing SCFAs across intestinal barrier include SCFA transporters such as monocarboxylate transporter that can also use nicotinic acid as substrate [37]. Consequently, SCFAs transportation could be reduced by the presence of nicotinic acid, which acts as a metabolic inhibitor of SCFAs. Respected to BMI, the propionate is higher in obese women compared to women with normal weight. In human and experimental mice studies, the clinical effects of propionic acid manifest a reduction in fat storage, preventing insulin resistance and anti-inflammatory activity [9,42]. Priyadarshini, M. et al. [12] observed that propionate was beneficial against the development of obesity in pregnant women.

Although small changes in mean SCFAs values between the first and third trimester of pregnancy related to maternal factors have been observed in our population, these factors as a whole have hardly affected the reference ranges. The fact of being a primiparous, together with other modifiable maternal factors such as smoking and lack of physical activity, which decrease SCFAs levels, and maternal obesity at the beginning of pregnancy, which increases them, are the only factors that modify the reference ranges described for the pregnant population in the Mediterranean area of northern Spain. Therefore, we consider that more community-based population studies are needed in different populations, due to the possible influence that these maternal characteristics may have on pregnant women in other settings.

Finally, our results can cautiously point to some of the maternal factors that negatively influence SCFAs levels and for which there are currently some plausible hypotheses about the mechanisms of action, such as excess weight in early pregnancy, smoking and intense physical activity.

One of the strengths of this study is that it is the first one to define SCFA concentrations in a large sample of healthy women at the beginning and end of pregnancy, which emphasizes the strength and validity of the proposed reference ranges in the present study for pregnant women in a Mediterranean region of northern Spain. All serum samples were collected and performed in the same research laboratory. In addition, LC-MS methodology has proven to be a robust technique for SCFA analysis that could be implemented in an automated way in laboratories and facilitate the analysis of serum samples in population-based studies with larger numbers of samples [31]. Nevertheless, we also acknowledge some limitations. SCFAs were not analyzed in the second trimester of pregnancy, and it would have been interesting to monitor the whole gestational period. Moreover, our main purpose was to establish serum SCFA reference ranges throughout pregnancy, but not studying associations with health outcomes. Further studies in larger cohorts are needed to investigate possible associations between SCFAs and adverse pregnancy outcomes.

5. Conclusions

The present study provides reference intervals for acetate, propionate, butyrate and isobutyrate from early to late gestation in a large sample of pregnant women from a Mediterranean region of northern Spain. SCFAs concentrations generally remained remarkably stable throughout pregnancy, except for butyrate which increased in late pregnancy, and for most of the maternal factors studied. Although SCFAs levels were hardly influenced by maternal factors, some modifiable lifestyles in early pregnancy and mainly in the third trimester of pregnancy, such as smoking, intense physical activity or obesity in early pregnancy, may modify SCFAs values in a possibly detrimental way. Further research is needed to understand the mechanism of these relationships, and to observe how SCFAs behave with these maternal factors in other populations.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14183798/s1>, Table S1: Multivariate- adjusted linear regression of potential maternal factors related to maternal serum short chain fatty acids composition in the first trimester of pregnancy; Table S2: Multivariate- adjusted linear regression of potential maternal factors related to maternal serum short chain fatty acids composition in the third trimester of pregnancy.

Author Contributions: V.A. designed and conducted the research. V.A. performed data curation. C.M.-G. and A.D.-L. analyzed the data. C.M.-G. wrote the article. All authors (V.A., C.M.-G., A.D.-L. and E.A.) revised the manuscript for important intellectual content and read and approved the final manuscript. The corresponding author attests that all listed authors meet authorship criteria and that no others who meet the criteria have been omitted. V.A. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The ECLIPSES study was funded by the Health Research Fund of the Ministry of Health and Consumption (Madrid, Spain) [Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo] and co-funded by European Union (ERDF/ESE, “A way to make Europe”/“Investing in your future”), grants number PI12/02777, PI17/01754.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Institut d’Investigació en Atenció Primària de Salut (IDIAP) (protocol code: IJG-FER-2012, AC13/04 and date of approval: 3 April 2017) and Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) (protocol code: 118/2017 and date of approval: 28 September 2017) for studies involving humans.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank all the volunteers for their participation and the personnel for their contribution to the ECLIPSES trial. We would also like to thank the Computer Service of the Catalan Health Institute (ICS) for the data extraction. Without them this study would not have been possible. We also thank the Jordi Gol Research Institute in Primary Care [Instituto de Investigación en Atención Primaria; IDIAP].

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Roy, R.; Nguyen-Ngo, C.; Lappas, M. Short-chain fatty acids as novel therapeutics for gestational diabetes. *J. Mol. Endocrinol.* **2020**, *65*, 21–34. [CrossRef]
2. Voltolini, C.; Battersby, S.; Etherington, S.L.; Petraglia, F.; Norman, J.E.; Jabbour, H.N. A novel antiinflammatory role for the short-chain fatty acids in human labor. *Endocrinology* **2012**, *153*, 395–403. [CrossRef] [PubMed]
3. Al Mahri, S.; Malik, S.S.; Al Ibrahim, M.; Haji, E.; Dairi, G.; Mohammad, S. Free Fatty Acid Receptors (FFARs) in Adipose: Physiological Role and Therapeutic Outlook. *Cells* **2022**, *11*, 750. [CrossRef] [PubMed]
4. Ye, Q.; Cai, S.; Wang, S.; Zeng, X.; Ye, C.; Chen, M.; Zeng, X.; Qiao, S. Maternal short and medium chain fatty acids supply during early pregnancy improves embryo survival through enhancing progesterone synthesis in rats. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *69*, 98–107. [CrossRef]
5. Kimura, I.; Miyamoto, J.; Ohue-Kitano, R.; Watanabe, K.; Yamada, T.; Onuki, M.; Aoki, R.; Isobe, Y.; Kashiwara, D.; Inoue, D.; et al. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice. *Science* **2020**, *367*, aaw8429. [CrossRef] [PubMed]
6. Nuriel-Ohayon, M.; Neuman, H.; Koren, O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1031. [CrossRef]
7. Blaser, M.J.; Dominguez-Bello, M.G. The Human Microbiome before Birth. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 558–560. [CrossRef]
8. Yang, L.L.; Millischer, V.; Rodin, S.; MacFabe, D.F.; Villaescusa, J.C.; Lavebratt, C. Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J. Neurochem.* **2020**, *154*, 635–646. [CrossRef]
9. Ziętek, M.; Celewicz, Z.; Szczuko, M. Short-chain fatty acids, maternal microbiota and metabolism in pregnancy. *Nutrients* **2021**, *13*, 1244. [CrossRef]
10. García-Mantrana, I.; Selma-Royo, M.; González, S.; Parra-Llorca, A.; Martínez-Costa, C.; Collado, M.C. Distinct maternal microbiota clusters are associated with diet during pregnancy: Impact on neonatal microbiota and infant growth during the first 18 months of life. *Gut Microbes* **2020**, *11*, 962–978. [CrossRef]

11. Ojo, O.; Feng, Q.Q.; Ojo, O.O.; Wang, X.H. The role of dietary fibre in modulating gut microbiota dysbiosis in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrients* **2020**, *12*, 3239. [CrossRef] [PubMed]
12. Priyadarshini, M.; Thomas, A.; Alexandra, A.C.; Scholtens, D.M.; Wolever, T.M.S.; Josefson, J.L.; Layden, B.T. Maternal short-chain fatty acids are associated with metabolic parameters in Mothers and Newborns. *Transl. Res.* **2015**, *164*, 153–157. [CrossRef]
13. Soderborg, T.K.; Borengasser, S.J.; Barbour, L.A.; Friedman, J.E. Microbial transmission from mothers with obesity or diabetes to infants: An innovative opportunity to interrupt a vicious cycle. *Diabetologia* **2016**, *59*, 895–906. [CrossRef]
14. Ristori, M.V.; Quagliarriello, A.; Reddel, S.; Ianiro, G.; Vicari, S.; Gasbarrini, A.; Putignani, L. Autism, gastrointestinal symptoms and modulation of gut microbiota by nutritional interventions. *Nutrients* **2019**, *11*, 2812. [CrossRef] [PubMed]
15. Tian, Z.; Zhuang, X.; Luo, M.; Yin, W.; Xiong, L. The propionic acid and butyric acid in serum but not in feces are increased in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* **2020**, *20*, 73. [CrossRef]
16. Bahado-Singh, R.O.; Akolekar, R.; Chelliah, A.; Mandal, R.; Dong, E.; Kruger, M.; Wishart, D.S.; Nicolaides, K. Metabolomic analysis for first-trimester trisomy 18 detection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2013**, *209*, 65.e1–65.e9. [CrossRef] [PubMed]
17. Sparvoli, L.G.; Cortez, R.V.; Daher, S.; Padilha, M.; Sun, S.Y.; Nakamura, M.U.; Taddei, C.R. Women's multisite microbial modulation during pregnancy. *Microb. Pathog.* **2020**, *147*, 104230. [CrossRef]
18. Taddei, C.R.; Cortez, R.V.; Mattar, R.; Torloni, M.R.; Daher, S. Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2018**, *80*, e12993. [CrossRef]
19. Koren, O.; Goodrich, J.K.; Cullender, T.C.; Spor, A.; Laitinen, K.; Bäckhed, H.K.; Gonzalez, A.; Werner, J.J.; Angenent, L.T.; Knight, R.; et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* **2013**, *150*, 470–480. [CrossRef]
20. Arija, V.; Fargas, F.; March, G.; Abajo, S.; Basora, J.; Canals, J.; Ribot, B.; Aparicio, E.; Serrat, N.; Hernández-Martínez, C.; et al. Adapting iron dose supplementation in pregnancy for greater effectiveness on mother and child health: Protocol of the ECLIPSES randomized clinical trial. *BMC Pregnancy Childbirth* **2014**, *14*, 33. [CrossRef]
21. Jardí, C.; Aparicio, E.; Bedmar, C.; Aranda, N.; Abajo, S.; March, G.; Basora, J.; Arija, V.; Study Group, T.E. Food Consumption during Pregnancy and Post-Partum. ECLIPSES Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2447. [CrossRef] [PubMed]
22. De Catalunya, G. Classificació Catalana D'ocupacions (CCO-2011). 2011. Available online: <https://www.idescat.cat/serveis/biblioteca/docs/cat/cco2011.pdf> (accessed on 24 August 2022).
23. Edwards, M.K.; Loprinzi, P.D. Affective Responses to Acute Bouts of Aerobic Exercise, Mindfulness Meditation, and Combinations of Exercise and Meditation: A Randomized Controlled Intervention. *Psychol. Rep.* **2019**, *122*, 465–484. [CrossRef]
24. Fagerström, K. Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment. *Addict. Behav.* **1978**, *3*, 235–241. [CrossRef]
25. World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight, (s.f.). Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 24 August 2022).
26. Institute of Medicine (US); National Research Council (US); Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines. *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*; Rasmussen, K., Yaktine, A., Eds.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2009.
27. Rodríguez, I.; Ballart, J.; Pastor, G.; Jordà, E.; Arija-Val, V. Validation of a short questionnaire on frequency of dietary intake: Reproducibility and validity. *Nutr. Hosp.* **2008**, *23*, 242–252.
28. Favier, J.; Ireland-Ripert, J.; Toque, C.; Feinberg, M. *Répertoire Général des Aliments: Tables de Composition; Technique & Documentation*; INRA: Paris, France, 1995.
29. Mataix, J.; García-Diz, L.; Mañas, M.; Martínez de Vitoria, E.; Llopis, J. *Tablas de Composición de Alimentos*, 5th ed.; Editorial Universidad de Granada: Granada, Spain, 2009.
30. Norte Navarro, A.I.; Ortiz Moncada, R. Calidad de la dieta española según el índice de alimentación saludable. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 330–336. [CrossRef] [PubMed]
31. Zeng, M.; Cao, H. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1083*, 137–145. [CrossRef] [PubMed]
32. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*, 3rd ed; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2010.
33. Martín-Grau, C.; Deulofeu, R.; Orus, N.S.; Arija, V. Trimester-specific reference ranges for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in serum of pregnant women: A cohort study from the eclipses group. *Nutrients* **2021**, *13*, 4037. [CrossRef]
34. Edwards, S.M.; Cunningham, S.A.; Dunlop, A.L.; Corwin, E.J. The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. *MCN Am. J. Matern. Nurs.* **2017**, *42*, 310–316. [CrossRef]
35. Layden, B.T.; Angueira, A.R.; Brodsky, M.; Durai, V.; Lowe, W.L. Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Transl. Res.* **2013**, *161*, 131–140. [CrossRef]
36. Bloemen, J.G.; Venema, K.; van de Poll, M.C.; Olde Damink, S.W.; Buurman, W.A.; Dejong, C.H. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin. Nutr.* **2009**, *28*, 657–661. [CrossRef]
37. Liu, H.; Wang, J.; He, T.; Becker, S.; Zhang, G.; Li, D.; Ma, X. Butyrate: A double-edged sword for health? *Adv. Nutr.* **2018**, *9*, 21–29. [CrossRef] [PubMed]

38. Wong, J.M.W.; de Souza, R.; Kendall, C.W.C.; Emam, A.; Jenkins, D.J.A. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40*, 235–243. [[CrossRef](#)]
39. Grace-farfaglia, P.; Frazier, H.; Iversen, M.D. Essential Factors for a Healthy Microbiome: A Scoping Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 8361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vinelli, V.; Biscotti, P.; Martini, D.; Del Bo', C.; Marino, M.; Meroño, T.; Nikoloudaki, O.; Calabrese, F.M.; Turrone, S.; Taverniti, V.; et al. Effects of Dietary Fibers on Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 2559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mitchell, C.M.; Davy, B.M.; Hulver, M.W.; Neilson, A.P.; Bennett, B.J.; Davy, K.P. Does Exercise Alter Gut Microbial Composition? A Systematic Review. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2019**, *51*, 160–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lin, H.V.; Frassetto, A.; Kowalik, E.J.; Nawrocki, A.R.; Lu, M.M.; Kosinski, J.R.; Hubert, J.A.; Szeto, D.; Yao, X.; Forrest, G.; et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. RESULTADOS GENERALES

5.1. Características de las mujeres embarazadas de la cohorte ECLIPSES-AG

La edad materna de las gestantes fue de $30,6 \pm 5,01$ años y el 23,3% fueron mayores de 35 años. La mayoría de las mujeres eran españolas (84%), tenían un empleo (87,1%), un nivel educativo medio (38,3%) y una clase social media (69,6%). Al inicio de la gestación, el IMC medio fue de $24,8 \pm 4,3$ kg/m², el 25,3% presentaba sobrepeso y el 12,5% de las embarazadas se clasificaron como obesas con un IMC ≥ 30 kg/m². La media de la ganancia de peso gestacional fue de $10,0 \pm 3,6$ kg. Según las recomendaciones del Instituto de Medicina de EE.UU., el 39% cumplía con una ganancia normal, el 41% estaba por debajo y el 20% superaba el peso recomendado. Además, las participantes informaron de que el 15,3% fumaba y el 14% bebía al inicio del embarazo. En cuanto a la actividad física, la media fue de 709 ± 961 METs/min/semana y el 56,4% de las mujeres tenían un nivel bajo de actividad.

5.2. Resultados de las publicaciones

PUBLICACIÓN 1. Maternal factors associated with levels of fatty acids, specifically n-3 PUFA during pregnancy: ECLIPSES study:

En este artículo se ha determinado la influencia que tienen los factores maternos socioeconómicos y de estilo de vida de la gestante sobre sus concentraciones séricas de ácidos grasos (AG), mediante un análisis estadístico multivariante.

Aquellas gestantes que presentaron mayor edad y mayor nivel educativo, se asociaron con concentraciones séricas de EPA y DHA aumentadas y con valores de n-6/n-3 y AA/EPA disminuidos en el primer y tercer trimestre de gestación. Respecto a la dieta, el consumo de pescados y marisco aumentó la concentración de EPA y redujo los valores de n-6/n-3 y de AA/EPA en ambos trimestres de gestación, mientras que aumentó la concentración de DHA únicamente en el primer trimestre de gestación. El hábito tabáquico se asoció con una concentración de DHA disminuida en el primer trimestre y mayores valores de n-6/n-3 en ambos trimestres de gestación. El sobrepeso y la obesidad se asociaron con valores más altos de n-6/n-3 y AA/EPA en el primer trimestre de gestación.

No se encontró ninguna asociación relevante entre los factores maternos estudiados y las concentraciones de AGS y AGMI.

PUBLICACIÓN 2. Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy.

Del primer al tercer trimestre del embarazo, se produjo un aumento significativo de los todos los AGS (totales e individuales), de los AGMI totales (así como del ácido palmítico y del ácido oleico) y de los AGPI n-6 totales. Sin embargo, se produjo una disminución significativa de la

concentración de AA desde el primer al tercer trimestre. En cuanto a los AGPI n-3, la concentración de EPA disminuyó significativamente durante la gestación, mientras que, no se observó un resultado estadísticamente significativo en la concentración de DHA ($p=0,357$) entre el primer y el tercer trimestre del embarazo. Se observaron correlaciones significativas entre cada una de las concentraciones de AG totales del primer y tercer trimestre.

PUBLICACIÓN 3. Trimester-specific reference ranges for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in serum of pregnant women: a cohort study from the ECLIPSES Group.

Se calcularon los valores medios y los percentiles correspondientes de los AG en suero materno durante el primer (T1) y tercer (T3) trimestre de gestación. Los valores se expresaron en términos absolutos y relativos, y se hizo una comparación entre ambos: se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los valores de AG expresados en términos absolutos y relativos. En el primer trimestre, se observaron correlaciones moderadas significativas y positivas para la mayoría de AG, a excepción del ácido esteárico, ácido palmitoleico, ácido oleico y AGMI totales que no mostraron una correlación entre los valores absolutos y relativos. En T3, se observó una correlación positiva ($p < 0,01$) para todos los AG menos para el ácido esteárico que presentó una correlación negativa moderada ($p < 0,01$, $r=0,387$). Nuestros intervalos de referencia establecidos se compararon con los valores de AG (concentraciones medias en términos relativos) publicados por otros estudios europeos encontrando ciertas discrepancias. Los valores de los intervalos de referencia para los AG propuestos, obtenidos a partir de una amplia muestra de mujeres embarazadas, son una herramienta útil para evaluar el estado nutricional de los AG en las mujeres embarazadas y realizar intervenciones dietéticas en función de determinados factores maternos.

PUBLICACIÓN 4. Short-chain fatty acid reference ranges in pregnant women from a Mediterranean region of Northern Spain: ECLIPSES Study.

En ambos trimestres, el ácido acético fue el AGCC mayoritario en suero (T1, $49,0 \pm 21,4 \mu\text{mol/L}$; T3, $48,5 \pm 18,2 \mu\text{mol/L}$), seguido del ácido propiónico (T1, $3,54 \pm 0,87 \mu\text{mol/L}$; T3, $3,52 \pm 1,03 \mu\text{mol/L}$) y del ácido butírico (T1, $0,79 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$; T3, $0,91 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$), mientras que las concentraciones séricas del ácido isobutírico fueron inferiores (T1, $0,47 \pm 0,19 \mu\text{mol/L}$; T3, $0,45 \pm 0,24 \mu\text{mol/L}$). De T1 a T3, hubo un aumento claramente significativo únicamente en el butirato ($0,91 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). En T3, las concentraciones de butirato aumentaron con la mayoría de los factores maternos y categorías estudiadas, mientras que el ácido acético y el ácido isobutírico disminuyeron sólo en algunas categorías materna. El ácido propiónico no se vio afectado por los factores maternos. Los intervalos de referencia no variaron con la edad materna, el peso corporal, la clase social o la dieta, pero disminuyeron con el tabaquismo, la actividad física intensa, el bajo IMC y la primiparidad. Este estudio establece por primera vez los intervalos de referencia de AGCC en suero para las mujeres gestantes en nuestra región, tanto al principio como al final del embarazo. Esta información puede ser útil para monitorizar el seguimiento del embarazo y detectar valores de riesgo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El proyecto ECLIPSES-AG describe, por primera vez, el estado nutricional de los ácidos grasos (AG) de cadena corta, media y larga en una amplia muestra de mujeres embarazadas de una región Mediterránea del sur de Cataluña desde el inicio hasta el final de la gestación. Determina las concentraciones séricas y su evolución durante la gestación, analiza los factores maternos implicados en estas concentraciones y establece sus intervalos de referencia.

Los datos obtenidos en este estudio, permiten un mayor control de las concentraciones séricas de los AG durante el seguimiento del embarazo y detectar aquellas que estén fuera del intervalo normal, pudiendo estar relacionadas con efectos adversos en la salud de la madre y su descendencia.

1. CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO, POBLACIÓN Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

En cuanto al diseño del proyecto ECLIPSES-AG, se debe valorar la participación de un número muy elevado de mujeres embarazadas en comparación al tamaño muestral de otros estudios [30,196,198,203,221]. El amplio tamaño y la representatividad de la muestra enfatiza la validez de los resultados a nivel poblacional. La selección de las mujeres se realizó en diferentes centros de atención primaria (CAP) especializados en asistencia a la Salud Sexual y Reproductiva (ASSIR) de varias áreas sanitarias, específicos para embarazadas. Esto proporcionó una buena representación de los niveles socioeconómicos y educativos de la población gestante, entre otros aspectos. Además, se cumplieron exhaustivos criterios de inclusión y exclusión, previamente diseñados y consensuados con los servicios CAP ASSIR garantizando una muestra de mujeres adultas embarazadas sanas.

Para minimizar la pérdida de las mujeres durante el seguimiento del embarazo, se aprovecharon las visitas mensuales de control prenatal para que éstas coincidieran con las visitas del estudio ECLIPSES-AG y así, facilitar la adhesión al proyecto y evitar las posibles pérdidas por falta de seguimiento. También se incentivaron económicamente a las matronas que atendieron a las madres y que ayudaron a la recogida de los datos referentes a la historia clínica. Los datos recogidos por las matronas del estudio, se realizaron a través de un aplicativo informático que fue supervisado por un grupo de profesionales externos al proyecto: expertos en la revisión, control y seguimiento de la recogida de datos; los cuales garantizaron que los registros se habían efectuado de forma óptima según el protocolo.

En cuanto a la recogida de los datos relacionados con el consumo de alimentos o estilo de vida, se optimizó mediante el empleo de diversos cuestionarios más fáciles de aplicar en estudios poblacionales al ser autoadministrados y rellenados por las propias participantes, aunque posteriormente un profesional revisó su cumplimentación. Hay que tener en cuenta que el diseño longitudinal de este estudio nos permitió analizar los factores maternos involucrados y las variaciones en las concentraciones séricas de los AG desde el primer hasta el tercer trimestre

de gestación, mientras que, la mayoría de los estudios publicados aportan las concentraciones en un momento puntual del embarazo [184,197–199]. Del mismo modo, este es el primer estudio que ha analizado un conjunto de AGS y AGMI en función de varios factores maternos, ya que la mayoría de estudios se centran en los AGPI n-3 [129–138]. Todos los procedimientos relacionados con el análisis de las muestras, se realizaron en el mismo laboratorio de investigación.

Referente a las muestras de suero, se analizaron las concentraciones de AG mediante métodos cromatográficos de alta sensibilidad y robustez que están ampliamente descritos y validados clínicamente para la cuantificación de los AG [242]. El empleo de estas técnicas automatizadas permitió el análisis simultáneo de 1) una gran cantidad de muestras que, a su vez, facilita la realización de estudios poblacionales a gran escala; 2) un perfil amplio de AG en suero para valorar el estado nutricional de los individuos y sus necesidades dietéticas [234]. De hecho, la automatización es una de las grandes ventajas que se tienen en cuenta a la hora de implantar una nueva técnica en los laboratorios clínicos [243]. A diferencia de los estudios previamente publicados [30,201,202], nuestro estudio proporcionó los valores medios de la concentración sérica y los percentiles de los intervalos de referencia de los AG de cadena corta, media y larga, tanto en unidades absolutas como relativas.

2. ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA Y LARGA DURANTE LA GESTACIÓN

Debido a la gran repercusión que los AG tienen sobre la salud de la madre y la de su descendencia [29,95,96,120,151], nuestro estudio ha analizado la posible asociación de un amplio número de factores maternos prenatales (sociodemográficos y de estilo de vida) con las concentraciones séricas de AG a lo largo de la gestación. Para ello, se han realizado regresiones multivariantes ajustadas por los factores que pudieron influir en la relación estudiada.

La dieta materna durante el período preconcepcional, el embarazo y la lactancia es importante tanto para la madre como para el niño [94,195] y, concretamente, las concentraciones de AG juegan un papel crucial durante el embarazo [29,120,151]. El EPA y DHA son particularmente necesarios para ayudar al desarrollo del sistema nervioso central, los fotorreceptores de la retina y el sistema inmunológico [111]. En el primer trimestre de embarazo (T1), unas concentraciones adecuadas de EPA y DHA tienen una gran importancia considerando el papel que juegan en el inicio de la neurogénesis [30,122], aunque alcanzan su mayor acumulación en el cerebro fetal durante el tercer trimestre de embarazo (T3) [122]. En consecuencia, las concentraciones séricas de los AG cambian en el curso del embarazo para satisfacer los requerimientos fetales. En este contexto, es necesario monitorizar los valores de las concentraciones de AG a lo largo del embarazo para poder detectar la posibilidad de un riesgo por déficit de éstos. Para este fin, los intervalos de referencia son una herramienta eficaz para la toma de decisiones médicas y la intervención dietética [187], ya que pueden usarse para identificar a las mujeres que estén en riesgo de padecer complicaciones.

2.1. Factores maternos relacionados

Referente a la dieta, observamos que el consumo de pescado y marisco se relacionó positivamente con mayores concentraciones séricas de EPA y DHA y con valores bajos de n-6/n-3 y AA/EPA durante T1. Según las estimaciones basadas en nuestro modelo estadístico, se determinó que por cada porción de pescado (150 g de peso aproximadamente), la concentración de EPA y DHA aumentaba en 22,5 y 51 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente, mejorando considerablemente sus concentraciones. En cuanto al T3, solo el EPA y las relaciones n-6/n-3 y AA/EPA se mantuvieron elevadas, mientras que no aumentaron para las concentraciones de DHA tal y como muestran otros autores [244]. Sin embargo, existen diferentes mecanismos de biosíntesis o movilización (hacia la circulación fetal) que pueden influir en la regulación y niveles de DHA [245]. Por ejemplo, los cambios hormonales que se producen durante el embarazo, como el aumento de estrógenos, favorecen la conversión del ácido alfa-linolénico (ALA) en DHA [198,246]. Otra razón podría ser la movilización preferente de DHA, con respecto a otros AG, que se produce desde las reservas de grasa materna hacia el feto en T3 [154–156] y que parece ser una estrategia para favorecer el desarrollo del sistema cerebral y ocular del feto.

La adquisición de hábitos alimentarios saludables (como el consumo de pescado y marisco) durante el embarazo, es esencial para conseguir una concentración óptima de EPA y DHA desde el inicio de la gestación y favorecer una biodisponibilidad continua de estos AG según las necesidades del feto [247–249]. Contrariamente, el cociente materno n-6/n-3 elevado y las concentraciones maternas de AGPI n-6 totales elevados forman parte de los factores de riesgo ambientales que se asocian al trastorno del espectro autista [122,248] y a enfermedades del sistema inmunitario [197]. El riesgo de aparición de estas enfermedades se ve fomentado por el hecho de que los lípidos maternos son transportados desde la placenta hacia el feto por un gradiente de concentración; el feto al disponer de concentraciones de grasa sustancialmente más bajas favorece la transferencia de los AG que, en ese momento, son abundantes en el suero materno como los AGPI n-6 [122]. La consecuencia es un desequilibrio entre las concentraciones de AGPI n-3 y n-6 que puede contribuir al desarrollo de enfermedades a largo plazo en el recién nacido.

La edad y el nivel educativo de las gestantes también influyeron en las concentraciones séricas de AG a lo largo del embarazo. En nuestra cohorte, aquellas mujeres mayores de 25 años o con un nivel educativo medio/alto presentaron valores elevados de EPA y DHA y valores bajos en los ratios n-6/n-3 y AA/EPA. En la bibliografía existen discrepancias con respecto a estas observaciones, algunos autores no detectaron estas variaciones [221,250], mientras que otros obtuvieron resultados similares [30,203,251]. Incluso, algunas investigaciones demostraron que las mujeres de mayor edad con un nivel educativo más alto tendían a consumir más pescado y marisco durante el embarazo [252,253] o bien, mantenían una dieta con un índice de calidad elevado [254,255] que favorecía un aumento de los AGPI n-3. Al contrario, y de acuerdo a nuestros resultados, algunos autores observaron que las gestantes jóvenes socioeconómicamente desfavorecidas (bajo nivel educativo y bajos ingresos) corrían un riesgo de presentar concentraciones de AGPI n-3 disminuidas, posiblemente por disponer de menor acceso a fuentes alimentarias ricas en n-3 (como el pescado y marisco) que suelen tener un elevado coste [203,256].

El IMC de la embarazada también fue un factor materno con resultados controvertidos [30,203,221,251,257]. Lesch *et al.* [257] descubrieron que las mujeres con sobrepeso mostraban mayores concentraciones de AA y AGPI n-3. Sin embargo, nuestros resultados determinaron que el sobrepeso u obesidad se asociaban a mayores concentraciones de AGS, AA y valores elevados de n-6/n-3 y AA/EPA. El aumento de las concentraciones de estos AG en nuestra cohorte, podría deberse a un mayor consumo de alimentos ricos en AGPI n-6 que interfieren en la conversión de derivados de la serie n-3 como el EPA. Además, la excesiva adiposidad materna podría alterar la transferencia placentaria de los AGPI n-3 [218].

Las mujeres embarazadas fumadoras mostraron concentraciones bajas de DHA y AGPI n-3 totales, y un valor elevado de n-6/n-3 en T1. Concretamente, las fumadoras redujeron sus concentraciones de DHA en 40 $\mu\text{mol/L}$ en comparación a las no fumadoras durante el T1. Estos resultados confirman los hallazgos observados por otros autores [30,203,218,221,251]. Esta influencia se debe posiblemente al efecto adverso del tabaco en el proceso de conversión del ALA en DHA [219,220]. Esta relación con el DHA y los AGPI n-3 totales no se observó en el T3, probablemente por el mecanismo de transferencia de las reservas maternas de DHA al feto. Sin embargo, se demostró que el tabaquismo aumentaba la relación n-6/n-3 y, por tanto, podía afectar al perfil de AG mediante algún otro mecanismo. De esta manera, el tabaco fomentaría la síntesis de eicosanoides proinflamatorios derivados AGPI n-6, como la prostaglandina E2 (PGE₂) [220] que desempeña un papel importante en la regulación de las contracciones durante el parto [56,57]. Se ha demostrado que fumar durante el embarazo es un factor de riesgo de parto prematuro [258] y, a tal efecto, aconsejar a la madre que deje de fumar podría mejorar el perfil de AG a lo largo de la gestación y prevenir resultados negativos para la madre y el niño.

Aunque los AGPI n-3 totales e individuales (DHA y EPA) y los cocientes n-6/n-3 y AA/EPA fueron los más susceptibles a los factores maternos, debemos destacar que prácticamente ninguno de los factores evaluados se relacionó con las concentraciones de AGS (aparte del sobrepeso y la obesidad) y AGMI (aparte de la edad materna superior a 30 años en T3).

2.2. Concentraciones séricas de los ácidos grasos de cadena media y larga

El presente estudio describió el estado nutricional de los AG en el suero de las mujeres embarazadas, así como su evolución a lo largo de la gestación. Las concentraciones de AGS totales, AGMI totales y AGPI n-6 totales aumentaron de T1 a T3, excepto el AA, cuyas concentraciones disminuyeron. De la misma manera, las concentraciones de AGPI n-3 totales y EPA disminuyeron durante el embarazo, mientras que las concentraciones de DHA permanecieron estables.

Aunque nuestros resultados mostraron un aumento de los AGS y AGMI durante la gestación, su función en el embarazo todavía sigue sin esclarecerse [198,203,259,260]. En cuanto a las concentraciones de AGPI, nuestros resultados concuerdan parcialmente con la literatura. Zhao *et al.* [196] observaron que las mujeres embarazadas canadienses sin diabetes mostraban concentraciones séricas más altas en todos los AG, excepto en el EPA al final de la gestación (semana 35-37); una revisión sistemática encontró que las concentraciones de DHA aumentaban

y las de EPA no cambiaban [261]; Pinto *et al.* [203], en un estudio con mujeres embarazadas brasileñas, mostraron que, del primer al segundo trimestre, las concentraciones séricas de AG y EPA + DHA aumentaron, pero en T3, observaron un ligero aumento del DHA y una disminución del EPA (aunque no fue estadísticamente significativa). En cambio, nuestros resultados no revelaron ninguna variación significativa del DHA entre T1 y T3, aunque se observó una disminución significativa de alrededor del 15% en las concentraciones de EPA. Es posible que la síntesis de DHA a partir del EPA sea más eficiente que a partir del ALA y que las concentraciones de DHA pudieran estar reguladas por otros mecanismos de biosíntesis o movilización [28,152].

Tanto el AA (derivado del LA) como el DHA (derivado del ALA) son AG que se transportan a la circulación fetal de forma preferente [97]. Nuestros resultados determinaron que las concentraciones de AA disminuyeron alrededor de un 8% durante el embarazo, pese a que las concentraciones séricas de LA aumentaron, no parece que fueran a convertirse en AA. Este hecho sugiere que la actividad enzimática de la desaturasa podría estar reducida para evitar una producción excesiva de eicosanoides de la serie n-6. No obstante, en la literatura, observamos resultados diferentes [196,203,261]. Es posible que las diferencias encontradas se deban a las semanas de gestación en las que se realizaron las determinaciones, al tamaño de la muestra, a las características de las poblaciones estudiadas o la metodología empleada para el análisis de los AG. En este sentido, se necesitan más investigación para aclarar cómo cambian estos AG a lo largo de todo el embarazo.

En relación al incremento observado de los AG circulantes (concretamente los AGS, los AGMI y los AGPI n-6) a lo largo del embarazo, se pueden realizar algunas argumentaciones. Esta tendencia al alza podría explicarse por un mecanismo de síntesis o movilización de las grasas maternas, ya que el aumento de las concentraciones parece no estar relacionado con la ingesta dietética. Cabe señalar que estas adaptaciones metabólicas que se producen en la mujer embarazada tienden a garantizar una adecuada disponibilidad de los AGS, AGMI y AGPI n-6 durante la gestación y, su aumento en el tercer trimestre, parece coincidir cuando el feto requiere mayor demanda para su crecimiento y desarrollo. No obstante, las concentraciones de AA, DHA y EPA, parece que están reguladas de forma más compleja, pese a poseer mayor afinidad por las proteínas transportadoras de la placenta con respecto al resto de AG. Durante los primeros meses del embarazo, los AGPI derivados de la dieta se almacenan en el tejido adiposo materno. De hecho, la concentración sérica de AGPI n-3 se ha relacionado con el consumo de alimentos en la mujer embarazada [30,203,238,250] y como éstos se transfieren a las reservas de grasa materna. Por tanto, la cantidad de AGPI n-3 almacenada en el tejido adiposo podría variar en función de la ingesta dietética de dichos n-3. Sin embargo, los cambios metabólicos y fisiológicos que se producen durante el embarazo implican una sincronización compleja del metabolismo lipídico de la madre, la placenta y el feto para garantizar el suministro continuo de AGPI n-3 y AGPI n-6 al feto [152]. Algunos mecanismos podrían estar relacionados con la movilización de las reservas de grasa materna, un aumento de la síntesis de AG regulados por los estrógenos, la captación placentaria específica de determinados AG o la tasa de conversión de DHA sincronizada con el periodo de máxima demanda fetal [28,152]. La transferencia de AGPI n-3 y n-6 al feto aumenta a partir de la semana 20 de gestación y alcanza un pico en el último trimestre del embarazo, favoreciendo el paso de DHA y AA, para garantizar los requerimientos fetales en esa etapa del desarrollo [97,151,152]. Consecuentemente, en situaciones de ingesta insuficiente, aumentará el riesgo de déficit de AG y la aparición de

posibles problemas de salud en la mujer embarazada. De hecho, se ha descrito que un estado bajo de AGPI n-3 y el desequilibrio entre n-6 y n-3 al principio del embarazo aumentan el riesgo de depresión postparto [29,250]. Esto podría llevarnos a considerar que, en situaciones de bajo aporte, los mecanismos implicados en el transporte placentario de grasas podrían ser insuficientes para garantizar las necesidades fetales de AG, o bien, que el poco aporte de AG de la madre se antepusiera a las demandas fetales y supusiera un riesgo de déficit en ella al no asegurar unas reservas adecuadas para la gestante.

En nuestra cohorte de embarazadas, los valores de n-6/n-3 (T1, $16,80 \pm 5,19$; T3, $29,29 \pm 11,52$) parecen mostrar un claro desequilibrio si nos basamos en las recomendaciones propuestas por la Fundación Española de la Nutrición (www.fen.org.es) donde aconsejan no sobrepasar la proporción 16:1. No obstante, se deben realizar más investigaciones sobre el posible efecto del aumento de AGPI n-6 en la mujer gestante.

Dado que las concentraciones de AG y su equilibrio dependen tanto de los mecanismos biológicos como del suministro de la dieta, se necesita una ingesta dietética óptima para garantizar el correcto crecimiento y desarrollo del feto. Por este motivo, consideramos que los controles prenatales que se realizan por los obstetras y otros profesionales de la salud deberían incluir consejos dietéticos sobre alimentos ricos en AG, verificar el consumo de estos alimentos y determinar el perfil sérico de los AG, especialmente AA, EPA y DHA. Entre las principales implicaciones de los AG durante el embarazo, se conoce que el consumo de pescado y marisco es beneficioso para el desarrollo neurocognitivo de los recién nacidos [247,249]; un desequilibrio entre las series de AGPI n-3 y n-6 puede desencadenar consecuencias nocivas para el niño, como trastornos del neurodesarrollo [247,248], enfermedades del sistema inmunitario [197], riesgo cardiometabólico y exceso de adiposidad [49,52,53]; en cuanto al AA, en concentraciones adecuadas, actúa como precursor de prostaglandinas y otros metabolitos que desempeñan un papel clave en el período final del embarazo y el parto [262], mientras que, en concentraciones elevadas, genera una activación excesiva de los mediadores inflamatorios que puede provocar problemas obstétricos como la diabetes gestacional, preeclampsia o parto prematuro [263].

2.3. Intervalos de referencia séricos de los ácidos grasos de cadena media y larga.

Actualmente, una de las herramientas más empleadas para determinar el estado de salud de un individuo es comparar los resultados obtenidos en un determinado analito con los intervalos de referencia establecidos para dicho analito. Con ello, se puede realizar un diagnóstico médico o tomar una decisión clínica-terapéutica que mejoren la salud de la persona. En este estudio, se han establecidos los intervalos de referencia de los AG de cadena media y larga en las mujeres embarazadas tanto en T1 como en T3.

Como se ha comentado anteriormente, los niveles adecuados de AG son de gran importancia en T1, teniendo en cuenta el papel que desempeñan en el inicio de la neurogénesis [30,122], y en T3, favoreciendo la maduración del sistema nervioso y retina [122]. Sin embargo, muy pocos estudios han informado de los intervalos de referencia para las concentraciones séricas de los

AG y, los trabajos disponibles, reportan mayoritariamente los intervalos en adultos (conjunto de hombres y mujeres no embarazadas) [180,181,189,192]. En el caso de las mujeres embarazadas, solo se han descrito valores de referencia en una cohorte brasileña de 225 mujeres embarazadas sanas [203] y en una cohorte noruega de 247 mujeres embarazadas sanas [204]. Sin embargo, los valores en estas dos cohortes son difícilmente comparables con nuestros resultados al estar expresados en términos relativos (% de un AG con respecto al total de AG medidos).

Consideramos que los intervalos de referencia se deberían desarrollar mediante un proceso más uniforme y estandarizado en relación a la metodología utilizada. La región geográfica, el sexo, la edad, las condiciones fisiopatológicas [189,196], como el embarazo [204], y el patrón dietético son factores que modifican los intervalos de referencia publicados y que deben estar claramente definidos y estipulados para cada población sobre la cual se quieran establecer dichos intervalos.

En cualquier caso, nuestro estudio aporta nuevos intervalos de referencia en una amplia muestra de mujeres embarazadas sanas de una región Mediterránea con características socioeconómicas, culturales y dietéticas diferentes de los datos anteriormente publicados. Además, los intervalos se han expresado de dos formas: como concentraciones absolutas y relativas debido a la poca literatura encontrada donde las concentraciones de AG se expresarán en términos absolutos en las mujeres embarazadas. La correlación entre las concentraciones de AG expresadas en valores absolutos y relativos, mostraron correlaciones bajas-moderadas. De forma similar a nuestros resultados, otros estudios ya han observado escasas correlaciones entre las concentraciones absolutas y relativas [242,264–266] en adultos y mujeres no embarazadas. Se postula que las diferencias entre los porcentajes y las concentraciones dependen de las características individuales de los AG [266] y del número de AG medidos en cada persona. En este sentido, el hecho de expresar los valores en términos relativos requiere la medición de todos los AG circulantes en el suero para poder establecer los porcentajes y esto supone un aumento considerablemente del gasto del análisis. Mientras que la medición en valores absolutos permite determinar un solo AG procurando un análisis más económico y facilitando las comparaciones entre estudios, por lo que, la recomendación para futuras investigaciones es informar las concentraciones de AG en unidades absolutas.

Debido a la falta de intervalos de referencia publicados, la comparación de nuestros resultados con los de otros estudios fue difícil. En comparación a nuestros niveles de AGMI, se observaron concentraciones elevadas en un estudio procedente del Norte de España [197], concentraciones bajas en dos estudios de los Países Bajos [31,198] y concentraciones similares en Alemania [184] y el Reino Unido [200], pese a no seguir un patrón dietético similar al de la zona del Mediterráneo. Los valores de DHGLA y AA fueron más altos en los Países Bajos [31,198] que en otros países. Generalmente, la producción de mediadores inflamatorios como el AA está asociada al curso normal del embarazo. Sin embargo, los niveles anormalmente elevados se han relacionado con complicaciones durante el embarazo, como la preeclampsia, el parto prematuro, retraso del crecimiento fetal, etc. especialmente en mujeres con factores de riesgo como el sobrepeso y la obesidad [263]. La mayoría de estas complicaciones ocurren durante el T3, sin embargo, Otto *et al.* [198] midieron los niveles de AG durante T1, momento en el cual los efectos del AA pueden ser menos relevantes o no se han descrito. También hay ciertos factores maternos como la obesidad que predisponen a sufrir un mayor número de complicaciones y el estudio de Vlaardingerbroek. *et al.* [31] no informó el IMC en su población de mujeres

embarazadas. Además de lo anterior, las concentraciones de DHA de los Países Bajos fueron más elevadas que las indicadas en los demás estudios. Las posibles explicaciones del aumento de DHA en los Países Bajos podrían ser la elevada ingesta de suplementos de AGPI n-3 o el mayor consumo de pescado y marisco per cápita [204]. Por último, las diferencias en los criterios de selección de las mujeres embarazadas, el tamaño muestral reclutado y la metodología para la determinación de los AG, podrían explicar las diferencias encontradas con estos autores [31,184,197,198,200].

Cabe señalar que las características de la población a estudio (edad, sexo, IMC, dieta, estilo de vida, nivel educativo y socioeconómico, origen geográfico o étnico, e incluso factores genéticos [213,267]) pueden afectar a las concentraciones séricas de los AG y, por tanto, al establecimiento de los intervalos de referencia durante en el embarazo. Es crucial definir correctamente los criterios de selección de la población de referencia y seguir directrices validadas dentro del ámbito internacional [187] para establecer los intervalos de referencia acordes a dicha población. En realidad, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia debido a la elevada variabilidad intra e interindividual presente en un población de una determinada zona geográfica con respecto a otra población de una zona próxima [187]. En todo caso, los intervalos que se han establecido en este proyecto han permitido calcular los percentiles absolutos (y relativos) de un amplio perfil de AG para el 95% de la población de mujeres embarazadas sanas que se incluyeron en el estudio. Estos intervalos podrán ayudar a evaluar el estado de los AG y la identificación de las mujeres con riesgo de déficit (<percentil 2,5%) o sobreexposición (>percentil 97,5%) a un AG determinado.

3. ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA DURANTE LA GESTACIÓN

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), incluidos el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido butírico e isobutírico, son metabolitos producidos a nivel intestinal (principalmente en el colon) por la fermentación bacteriana de los componentes de los alimentos, mayoritariamente, hidratos de carbono y fibra. En menor medida, se ingieren directamente de los alimentos o se producen de forma endógena a través de procesos metabólicos [88]. Además de actuar como sustratos locales para la producción de energía en la mucosa intestinal, los AGCC son transportados al torrente sanguíneo donde regulan numerosas vías metabólicas a través de la activación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) [79,268], como GPR41, GPR43 y GPR109A, los cuales se expresan en una gran variedad de tejidos como el hígado, el tejido adiposo, el músculo esquelético y el cerebro.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo a nivel internacional que ha explorado las concentraciones séricas de AG de cadena corta a lo largo del embarazo, valorando la influencia de los factores maternos sobre dichas concentraciones y su evolución durante la gestación.

3.1. Factores maternos relacionados

Uno de los factores maternos con mayor influencia sobre las concentraciones de AGCC, es la composición de la dieta. Muchos autores afirman que las concentraciones de AGCC aumentan cuando se sigue una dieta rica en fibra, mientras que se reducen con una dieta restringida en fibra o con alto contenido en grasas [89,212]. Sin embargo, estos hallazgos no están respaldados por nuestros resultados, ni por una reciente revisión sistemática de 44 estudios sobre el impacto de la fibra dietética en la producción de AGCC, que mostró que la mayoría de los estudios (un total de 26) no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de AGCC con respecto a la ingesta de fibra, mientras que los demás (un total de 18) informaron de diferencias significativas para uno o algunos AGCC, aunque diferían en el tipo de AGCC [77]. En nuestro estudio, solo se detectaron diferencias significativas en el caso del ácido butírico, el cual aumentó en el T3 en comparación con el T1 cuando la ingesta de fibra era <14 g/d (1er y 2º tercil) y cuando la ingesta de proteínas era <61 g/d (1º y 2º tercil). De hecho, algunos autores han observado que la concentración de AGCC parece estar influenciada por la dosis, el tipo y la estructura de las fibras alimentarias [77]. Normalmente, las bacterias intestinales dependen de los hidratos de carbono y de la fibra para obtener energía y utilizan las proteínas como fuente de energía cuando los primeros son escasos [269]. En este estudio, sólo las mujeres que mantienen una dieta de calidad moderada-alta aumentaron sus concentraciones de butirato en el T3 en comparación con el T1. Hay que tener en cuenta que, en nuestra cohorte, los valores de referencia proporcionados para los AGCC en suero son independientes de la dieta y de la ingesta de fibra.

En cuanto a otros factores maternos, hemos observado que el consumo de alcohol, una edad más joven, tener una clase social más baja y practicar una actividad física elevada durante el embarazo, reducen las concentraciones de ácido acético o de ácido isobutírico en T3 en comparación con T1. En general, la actividad física aumenta las bacterias tipo *Faecalibacterium* y modifica la composición microbiana [269]. De hecho, los atletas producen abundantes concentraciones de butirato fecal [270]. Sin embargo, en nuestra cohorte se observó un aumento en la concentración de butirato en aquellas gestantes que practicaban una actividad física baja-moderada en T3 en comparación con T1. Cabe señalar que sólo el 4,2% de nuestras embarazadas fueron muy activas físicamente y, por lo tanto, se necesitaría un mayor número de mujeres para establecer la tendencia del ácido butírico en estas condiciones físicas.

En cuanto al tabaco, las mujeres fumadoras tendieron a presentar valores medios más bajos para todos los AGCC en comparación con las no fumadoras y, en el caso del ácido butírico, la disminución fue significativa. Esta diferencia se observó a lo largo de todo el embarazo, pero fue más significativa durante el T3. Uno de los mecanismos de absorción de los AGCC a través de la barrera intestinal incluye transportadores específicos como el transportador monocarboxilato que también puede utilizar el ácido nicotínico como sustrato [75]. En consecuencia, el transporte de AGCC podría verse reducido por la presencia del ácido nicotínico, que actúa como un inhibidor metabólico de los AGCC.

Con respecto al IMC, el propionato fue mayor en las mujeres obesas en comparación con las mujeres con un peso normal. Tanto en estudios en humanos como en estudios experimentales

en ratones, los efectos clínicos del ácido propiónico manifiestan una reducción del almacenamiento de grasa, previenen de la resistencia a la insulina y poseen una actividad antiinflamatoria [72,271]. Priyadarshini *et al.* [209], observaron que el propionato era beneficioso contra el desarrollo de la obesidad en las mujeres embarazadas.

3.2. Concentraciones séricas de los ácidos grasos de cadena corta

Investigaciones recientes han demostrado que la composición de la microbiota intestinal cambia significativamente de T1 a T3 [212] y, por tanto, puede afectar a la producción de AGCC. La mayor concentración de AGCC se encuentra en el lumen del colon, donde son fácilmente absorbidos por los colonocitos en función del gradiente de concentración. Si no son metabolizados por los colonocitos, los AGCC atraviesan la pared intestinal y son absorbidos a través del sistema porta [207,272]. Algunos autores sugieren que el hígado metaboliza el propionato y el butirato, disminuyendo así la liberación de estos dos AGCC en la circulación sistémica. Sin embargo, la mayoría del acetato escapa del metabolismo hepático y, por esa razón, es el AGCC más abundante en la circulación periférica [75,207]. Una vez alcanza la circulación periférica, el acetato será metabolizado por los tejidos periféricos [76]. En relación con las concentraciones séricas de AGCC, nuestros resultados apoyan el hecho de que el acetato es el AGCC mayoritario, tal y como indican la HMD (*Human Metabolome Database: <http://www.hmdb.ca/>*) y otros autores [72]. Sin embargo, ningún estudio hasta la fecha ha determinado el estado de los AGCC maternos en el tercer trimestre del embarazo y, por lo tanto, su evolución durante el embarazo. En general, nuestros resultados mostraron que las concentraciones de AGCC permanecieron relativamente constantes a lo largo del embarazo, con ligeras variaciones (disminución no significativa) para el ácido acético y el ácido isobutírico, mientras que hubo un aumento significativo en el ácido butírico del T1 al T3. El ácido butírico aumentó significativamente con todos los factores maternos estudiados y en casi todas las categorías de cada factor desde el principio hasta el final del embarazo. Este cambio es importante porque el butirato se ha descrito como un agente antiinflamatorio [75,88] que aumenta para contrarrestar el mayor grado de inflamación que se produce al final del embarazo en comparación con el T1 [193]. Este hecho podría estar relacionado con el cambio en la microbiota intestinal durante el embarazo, que se describe como un aumento de Actinobacteria y Proteobacteria y una reducción de Faecalibacterium, lo que induce una mayor inflamación intestinal, un mayor almacenamiento de energía (con aumento del peso materno) y una tendencia a un estado de hiperglucemia [193,211,212]. Los cambios en la microbiota intestinal durante T3 son muy similares a los que se producen en pacientes con ciertos síndromes metabólicos inflamatorios como la obesidad o la diabetes [193,209,212]. Sin embargo, a pesar de la disminución de Faecalibacterium (bacterias productoras de ácido butírico) durante T3 descrito por algunos autores [193,212], en nuestra cohorte se detectó un ligero aumento de las concentraciones de butirato (del 1,5% al 1,7%). Por lo tanto, la variación en las concentraciones de butirato durante el embarazo no parece estar relacionada con los cambios descritos en la microbiota intestinal hasta la fecha, pero podría deberse a otros factores como la concentración de bacterias presentes en el colon, el tipo de sustrato fermentado, el tiempo de tránsito

intestinal de los alimentos [72], la genética del huésped y los factores del estilo de vida [269], entre otros. Sin embargo, nuestros resultados mostraron un aumento de las concentraciones de ácido butírico de T1 a T3 en todas las categorías de los factores estudiados, por lo que parece que el aumento de las cocentraciones de ácido butírico es independiente de estos factores maternos evaluados. Se necesitan más estudios para entender los mecanismos subyacentes de estos cambios. En contraste con el ácido butírico, sólo algunas características ambientales evaluadas en nuestra muestra disminuyeron las concentraciones de acetato (edad más joven y consumo de alcohol) e isobutirato (clase social baja, ganancia de peso gestacional adecuada y elevada actividad física) en T3.

3.3. Intervalos de referencia séricos de los ácidos grasos de cadena corta

El presente estudio describe los intervalos de referencia séricos (percentiles 2,5-97,5) para los ácidos acético, propiónico, isobutírico y butírico cuyos intervalos fueron 16,4-103,8 $\mu\text{mol/L}$, 2,1-5,8 $\mu\text{mol/L}$, 0,16-1,01 $\mu\text{mol/L}$ y 0,32-1,67 $\mu\text{mol/L}$ en el primer trimestre del embarazo, respectivamente. En el tercer trimestre, los percentiles de los intervalos de referencia fueron cuantitativamente similares a los del primer trimestre, excepto para el butirato, cuyas concentraciones aumentaron significativamente al final del embarazo (0,37-2,09 $\mu\text{mol/L}$).

A pesar de la importancia de preservar un estado saludable durante el embarazo, no existen intervalos de referencia fiables que representen a mujeres embarazadas sanas, por lo que no es posible comparar nuestros resultados. Según la literatura, se dispone de algunos estudios realizados en la base de datos HMD (<http://www.hmdb.ca/> - página consultada el 25 de octubre de 2022) que recopila la concentración media de AGCC en muestras séricas de adultos (>18 años de edad) y, también se dispone del estudio de Tian, Z. *et al.* [208]. En ambos recursos, se observa que los valores medios de ácido acético (41,9-69,1 mol/L), ácido propiónico (1,1-2,84 mol/L) y ácido butírico (0,3-2,7 mol/L) oscilaron considerablemente (<http://www.hmdb.ca/> y [208]). En cuanto al ácido butírico (2,3 mol/L) solo hay un estudio reportado en la web HMD cuyo acceso no está disponible actualmente. Aunque la bibliografía encontrada es muy escasa, los valores publicados en adultos son similares a los valores medios de ácido acético (49,0 mol/L) y ácido butírico (0,79 mol/L) detectados en nuestra cohorte de mujeres embarazadas sanas. No obstante, en nuestro estudio se obtuvieron valores más altos para el ácido propiónico (3,54 mol/L) y valores más bajos para el isobutírico (0,47 mol/L) en comparación a la bibliografía (<http://www.hmdb.ca/> y [208]). Las diferencias en estos valores pueden atribuirse a varias causas. Un punto a considerar es que la metodología utilizada en estos estudios previos difiere de un estudio a otro, por lo que las comparaciones entre ellos son difíciles. Además, los estudios analizados (<http://www.hmdb.ca/> y [206–208]) tienen un tamaño muestral muy pequeño y, por lo tanto, la presencia de valores extremos interindividuales pueden modificar notablemente la media y no pueden considerarse como valores poblacionales.

En relación a las mujeres embarazadas, solo dos estudios con un pequeño tamaño muestral determinaron las concentraciones medias de AGCC durante el T1, pero sus valores medios difieren de nuestros resultados debido principalmente a las características del diseño de ambos

estudios. En primer lugar, Priyadarshini *et al.* [209] analizaron los valores medios del ácido acético (25.6-26.9 mol/L), ácido propiónico (1.8-2.0 mol/L) y ácido butírico (0,5-0,9 mol/L) en mujeres embarazadas obesas (n = 10) frente a mujeres con un peso normal (n = 10) en T1 mediante cromatografía de gases. En segundo lugar, Bahado-Singh *et al.* [210] informaron los valores medios de ácido acético (28,2-22,9 mol/L) e isobutírico (6,7-5,6 mol/L) en mujeres británicas con aneuploidías fetales (n = 30) frente a mujeres sin alteraciones cromosómicas (n = 114) durante T1 empleando resonancia magnética nuclear (RMN). Como se ha comentado con anterioridad, las concentraciones séricas de AGCC mantienen una estrecha relación con la microbiota intestinal [71,72,82]. En T1, se genera un estado de baja inflamación a nivel de la superficie de la mucosa intestinal, caracterizado por un aumento de Ruminococcus y Faecalibacterium [89,93,194], similar al observado en mujeres sanas no embarazadas [89,212]. Por lo tanto, el estado basal de los AGCC durante T1 debería parecerse a los publicados en adultos sanos (<http://www.hmdb.ca/> y [208]).

4. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El último punto a considerar de esta discusión, son las fortalezas y limitaciones de nuestro estudio.

En cuanto a las fortalezas debemos resaltar el elevado número de participantes y el tipo de diseño del estudio que han permitido realizar una valoración extensa del estado de los AG durante el transcurso del embarazo. Además, todos los procedimientos de recogida de datos y análisis de muestras fueron objeto de un seguimiento exhaustivo: se recolectaron por los mismos investigadores capacitados, y el análisis bioquímico de los AG se realizó en el mismo laboratorio de investigación para minimizar posibles sesgos. Además, otro de los puntos fuertes de este estudio son los valores propuestos de las concentraciones e intervalos de referencia para los AG, que pueden servir como biomarcadores del consumo dietético (al derivar los AG predominantemente de la dieta). Con estos valores se pretende proporcionar información objetiva sobre la ingesta de AG y lípidos de la dieta sin que se produzcan sesgos procedentes de interrogatorios o cuestionarios de consumo por parte de los pacientes.

En cuanto a las limitaciones del estudio, relacionadas con los factores maternos se debe comentar que, en primer lugar, no pudimos evaluar determinados factores ambientales y genéticos que podrían influir en las concentraciones séricas de los AG durante el embarazo. Por ejemplo, genes que codifican proteínas implicadas en la captación, el metabolismo, el transporte y la síntesis de AG, especialmente, la familia de genes de la desaturasa de ácidos grasos (FADS) que están relacionados con la síntesis de AGPI n-3 y n-6 [213,273]. En segundo lugar, se tienen que realizar más estudios para determinar el grado de influencia de los factores maternos sobre las concentraciones de AG, especialmente sobre el DHA por su papel en el crecimiento y desarrollo fetal.

Relacionado con las concentraciones de los AG, en primer lugar, las determinaciones de los AG, tanto de cadena corta como de cadena media y larga, no se analizaron en el segundo trimestre del embarazo y habría sido interesante disponer de esos valores para un seguimiento de todos

los trimestres de gestación. En segundo lugar, de los 37 ácidos grasos de cadena media y larga que se midieron, no todos se pudieron detectar en las muestras de suero. Uno de ellos fue el ALA, uno de los principales AGPI n-3, lo que podría explicar por qué los niveles relativos de AGPI n-3 en nuestro estudio fueron inferiores a los de otros países. En tercer lugar, también resultó difícil establecer una comparación de las concentraciones de AG (expresadas en términos relativos) con las de otros países porque el perfil o número de AG totales medidos variaba según los estudios, incluso en estudios procedentes de un mismo país. En cuarto lugar, se debe considerar que en nuestro estudio se midieron los AG totales circulantes en suero y estos valores pueden diferir de los AG medidos en la fracción de TAG, fosfolípidos o ésteres de colesterol circulantes en suero.

Relacionado con la elaboración de los intervalos de referencia de los AG, aunque se siguieron las directrices recomendadas por el CLSI, nuestros resultados no pueden extenderse a todas las poblaciones de embarazadas puesto que determinadas características como el origen étnico, los hábitos nutricionales y el estilo de vida pueden influir notablemente en las concentraciones de AG.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

PERSPECTIVAS DE FUTURO

El proyecto ECLIPSES-AG es un estudio derivado del proyecto ECLIPSES-NEN, el cual ha estudiado el estado de salud prenatal de la madre desde diferentes ámbitos, como el nutricional, el psicológico y el medioambiental (**Figura 17**). El seguimiento de la cohorte ECLIPSES-NEN ha valorado el estado de salud de los hijos de las gestantes desde el nacimiento hasta los 4 años de edad, permitiendo estudiar la influencia previa del estado de salud de la mujer gestante sobre su descendencia.

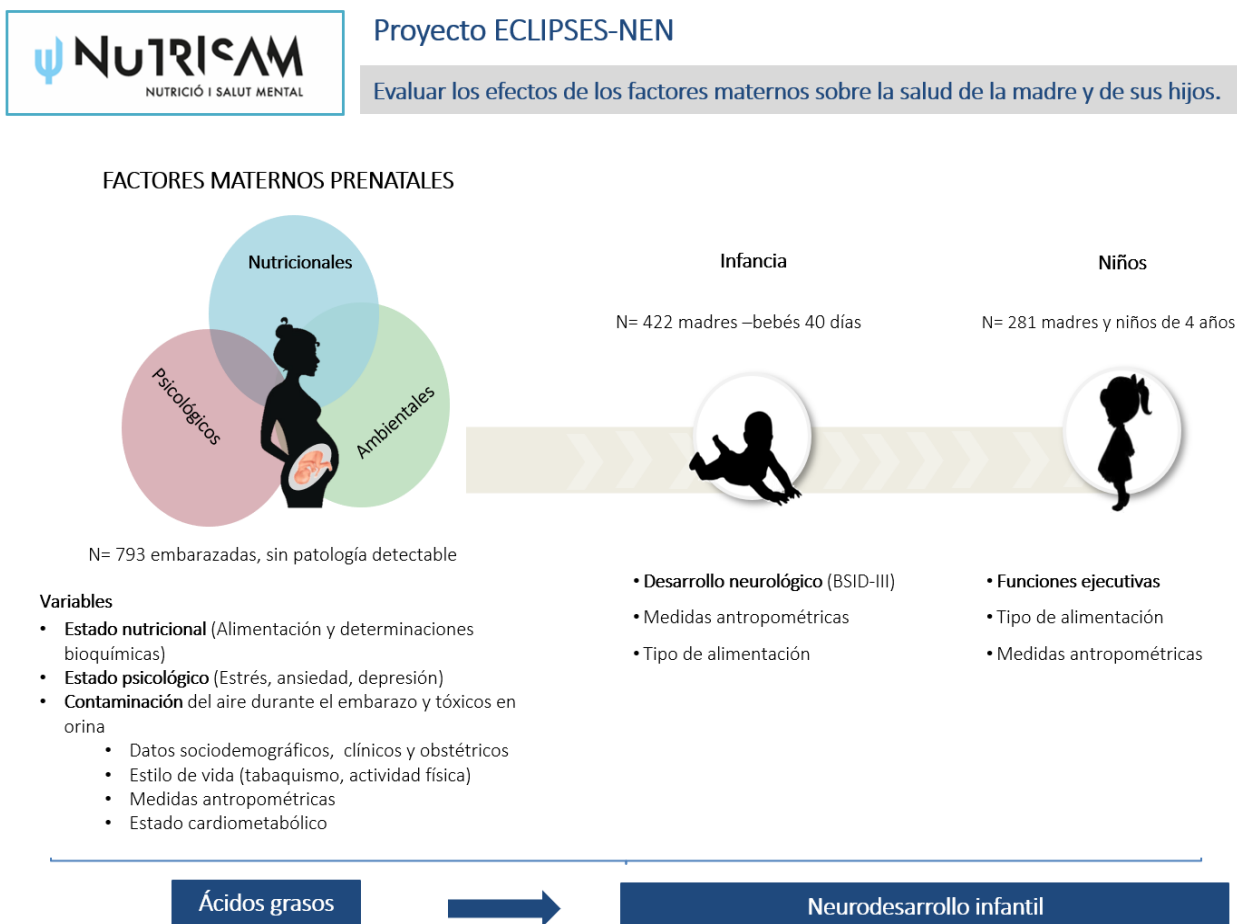


Figura 17. Nuevas perspectivas de futuro: Proyecto ECLIPSES-NEN.

Con respecto a los ácidos grasos, nuestro plan de futuro es analizar la influencia del estado nutricional de los ácidos grasos maternos sobre el desarrollo físico y neuroconductual de sus hijos en edades tempranas.

Además, se pretende investigar sobre la relación indirecta entre las concentraciones de ácidos grasos en suero y la microbiota intestinal durante el embarazo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El proyecto ECLIPSES-AG estudia el estado nutricional de los ácidos grasos en una amplia población de mujeres embarazadas sanas de una región Mediterránea del sur de Cataluña. De forma pionera, a nivel internacional, se han analizado los ácidos grasos desde varias perspectivas, describiendo como punto clave, las concentraciones séricas desde el inicio hasta el final de la gestación; estimando la influencia de los factores maternos sobre estas concentraciones; y estableciendo, por primera vez, los intervalos de referencia del conjunto de ácidos grasos de cadena corta, media y larga en la mujer gestante.

Este estudio, ha permitido realizar las siguientes conclusiones:

1. Se ha identificado la influencia de los factores maternos sobre las concentraciones de los ácidos grasos en las gestantes de nuestro entorno. A mayor edad, mayor nivel educativo y mayor consumo de pescado, se incrementan las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados n-3 (EPA y DHA), mientras que el hábito tabáquico reduce la concentración de DHA. El exceso de peso predijo valores más elevados en los cocientes n-6/n-3 y AA/EPA. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación relevante con los ácidos grasos saturados y monoinsaturados.
2. Se han descrito las concentraciones séricas de una amplia gama de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, expresándolas en valores absolutos y en valores relativos respecto al total de los ácidos grasos. Se observan correlaciones moderadas entre ambas formas de expresión, siendo más recomendable emplear valores absolutos en la práctica clínica.
3. La evolución de las concentraciones séricas de los ácidos grasos desde el inicio hasta el final de la gestación es variable. Los saturados, monoinsaturados y poliinsaturados n-6 aumentan durante el embarazo en relación a posibles mecanismos metabólicos específicos, no vinculados con el consumo alimentario. Sin embargo, la disminución de las concentraciones séricas de AA y EPA y el mantenimiento de DHA al final de la gestación, indican un posible riesgo de deficiencia en la mujer embarazada.
4. Referente a los ácidos grasos de cadena corta, los factores maternos tienen poca influencia sobre sus concentraciones, aunque aumentan en presencia del tabaquismo, actividad física intensa y obesidad al inicio del embarazo. Sus concentraciones séricas, como marcadores indirectos de la microbiota intestinal, se mantuvieron notablemente estables durante el embarazo, a excepción del butirato, que aumentó al final de la gestación.
5. Se han establecido los intervalos de referencia biológicos del conjunto de ácidos grasos en suero durante la gestación, tanto en los de cadena media y larga como en los de cadena corta. La extensa muestra de mujeres embarazadas sanas del proyecto ECLIPSES-AG ha permitido establecer por primera vez unos intervalos de referencia para las gestantes. Estos

Conclusiones

intervalos de referencia son una herramienta eficiente en la valoración del estado nutricional de los ácidos grasos en esta población, tanto a nivel clínico como epidemiológico.

Debido a la gran importancia que el estado nutricional de los ácidos grasos tiene sobre la salud materna y la de su descendencia, creemos que nuestra contribución puntual al estado del conocimiento de los ácidos grasos debe ser ampliada con nuevas investigaciones, que permitan establecer estrategias efectivas de prevención y control en el seguimiento del embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.C. Rustan, C.A. Drevon, Fatty Acids: Structures and Properties, en: *Encycl. Life Sci., In eLS*, (E, Wiley, 2005. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>.
- [2] J.F.C. Glatz, J.J.F.P. Luiken, A. Bonen, Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 367-417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *The Lipid Bilayer*, en: *Mol. Biol. Cell.*, 4th editio, Garland Science, New York, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>.
- [4] Á. Gil Hernández, *Tratado de nutrición. Tomo 1, Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*, 2.ª ed., España, 2010.
- [5] E. Tvrzicka, L.S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions, *Biomed. Pap.* 155 (2011) 117-130. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.038>.
- [6] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT), *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de expertos*, 2012. <http://www.fao.org/3/i1953s/i1953s.pdf>.
- [7] J.D. Brunzell, A. Chait, *Lipoprotein Metabolism: Structure and Function*, eLS. (2003) 1-6. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000609>.
- [8] K. Lobb, C. Chow, *Fatty Acids Classification and Nomenclature*, en: CRC Press (Ed.), *Fat. Acids Foods their Heal. Implic.*, 3.ª ed., 2007: pp. 1-15. <https://books.google.es/books?hl=en&lr=&id=Hcl0fkcrfbEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=fatty+acid+classi#v=onepage&q=fatty+acid+classi&f=false>.
- [9] J. Verdú Mataix, *Nutrición y Alimentación*, Madrid (España), 2002.
- [10] F. Muriana, *Metabolismo de los ácidos grasos.*, en: J. Mataix, A. Gil (Eds.), *Libr. blanco los omega-3*, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2004: pp. 35-47. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=e102JgF1yOUC&oi=fnd&pg=PA35&dq=metabolismo+ácidos+grasos+&ots=KLXwaPFO3d&sig=HqEFxKfDDzjE8RQ4-P4CQMBIRaQ#v=onepage&q=metabolismo+ácidos+grasos&f=false>.
- [11] D.J. Rader, S. Kathiresan, *Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas*, en: L.J. Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (Ed.), *Harrison. Principios Med. Interna*, 20e ed., McGraw-Hill Interamericana, 2018. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2461§ionid=213019158>.
- [12] D. Lucero, A. Wolska, Z. Aligabi, S. Turecamo, A.T. Remaley, Lipoprotein Assessment in the twenty-first Century, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 51 (2022) 459-481. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2022.02.009>.
- [13] K.R. Feingold, Lipid and Lipoprotein Metabolism, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 51 (2022) 437-458. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2022.02.008>.
- [14] T. Yuan, L. Wang, J. Jin, L. Mi, J. Pang, Z. Liu, J. Gong, C. Sun, J. Li, W. Wei, Q. Jin, X. Wang, Role Medium-Chain Fatty Acids in the Lipid Metabolism of Infants, *Front. Nutr.* 9 (2022)

- 1-7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.804880>.
- [15] D.B. Jump, Mammalian Fatty Acid Elongases, *Methods Mol. Biol.* 579 (2009) 345-389. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-322-0_19.
- [16] I. Bondia Pons, Estudio del perfil de ácidos grasos en la evaluación de la dieta mediterránea como patrón de dieta saludable en población Europea, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2007. <https://www.tdx.cat/handle/10803/2434#page=1>.
- [17] L. Kathleen Mahan, J.L. Raymond, Krause. *Dietoterapia*, 14.^a ed., Elsevier Inc, Barcelona, 2017.
- [18] K. Harnack, G. Andersen, V. Somoza, Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids, *Nutr. Metab.* 6 (2009) 1-11. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-8>.
- [19] S. Huerta-Yépez, A.B. Tirado-Rodriguez, O. Hankinson, Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 73 (2016) 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2016.11.001>.
- [20] L.S. Kremmyda, E. Tvrzicka, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease, *Biomed. Pap.* 155 (2011) 195-218. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.052>.
- [21] A.M. Chisaguano Tonato, Papel de los ácidos grasos trans (AGT) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) en el desarrollo de enfermedades atópicas en la primera etapa de la vida, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2014. <http://hdl.handle.net/10803/272661>.
- [22] A.P. Simopoulos, The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Exp. Biol. Med.* 233 (2008) 674-688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
- [23] A.P. Simopoulos, G.C. Leslie, eds., *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence*, World Revi, Karger Medical and Scientific Publishers, 2003. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-01018-3>.
- [24] A. Simopoulos, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids., *Biomed Pharmacother.* 56 (2002) 365-379. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6).
- [25] R.J. Pawlosky, J.R. Hibbeln, J.A. Novotny, N. Salem, Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1257-1265. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)31576-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)31576-5).
- [26] G.C. Burdge, P.C. Calder, Dietary α -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective, *Nutr. Res. Rev.* 19 (2006) 26-52. <https://doi.org/10.1079/nrr2005113>.
- [27] P. Calder, P. Yaqoob, Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids., *Postgr. Med.* 121 (2009) 148-157. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.11.2083>.
- [28] G.C. Burdge, P.C. Calder, Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults, *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) 581-597. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005047>.

- [29] A. Hoge, V. Tabar, A.F. Donneau, N. Dardenne, S. Degée, M. Timmermans, M. Nisolle, M. Guillaume, V. Castronovo, Imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy is predictive of postpartum depression in a Belgian cohort, *Nutrients*. 11 (2019) 1-14. <https://doi.org/10.3390/nu11040876>.
- [30] A. Hoge, F. Bernardy, A.F. Donneau, N. Dardenne, S. Degée, M. Timmermans, M. Nisolle, M. Guillaume, V. Castronovo, Low omega-3 index values and monounsaturated fatty acid levels in early pregnancy: An analysis of maternal erythrocytes fatty acids, *Lipids Health Dis*. 17 (2018) 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0716-6>.
- [31] H. Vlaardingerbroek, G. Hornstra, Essential fatty acids in erythrocyte phospholipids during pregnancy and at delivery in mothers and their neonates: Comparison with plasma phospholipids, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 71 (2004) 363-374. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.07.002>.
- [32] D. Marín, A. Del Pozo, Ceramidas (I). Conceptos generales, en: *Farm. práctica. Form. Perm. en dermofarmacia. Offarm.*, 2004: pp. 173-174. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-ceramidas-i-conceptos-generales-13061224>.
- [33] C. Hackney, D. Furness, Introducing the cell: the unit of life., en: G. Orchard, B. Nation (Eds.), *Cell Struct. Funct.*, Oxford University Press, Glasgow, 2015: pp. 1-45. https://books.google.co.id/books?id=Sq1OBAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false.
- [34] I. Djuricic, P.C. Calder, Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021, *Nutrients*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13072421>.
- [35] Y. Li, M. Choi, G. Cavey, J. Daugherty, K. Suino, A. Kovach, N.C. Bingham, S.A. Kliewer, H.E. Xu, Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, *Mol. Cell*. 17 (2005) 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.002>.
- [36] K. Nagy, I. Tiuca, *Importance of Fatty Acids in Physiopathology of Human Body.*, IntechOpen, London, 2017. <https://doi.org/10.5772/67407>.
- [37] S. Basak, R. Mallick, A. Banerjee, S. Pathak, A.K. Duttaroy, Maternal supply of both arachidonic and docosahexaenoic acids is required for optimal neurodevelopment, *Nutrients*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13062061>.
- [38] S.V. Chumpen Ramirez, S-acilación de proteínas transmembrana tipo II en células de mamíferos, Universidad de Córdoba, 2016. <http://hdl.handle.net/11086/15525>.
- [39] M. Furuhashi, Fatty acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases, *J. Atheroscler. Thromb*. 26 (2019) 216-232. <https://doi.org/10.5551/JAT.48710>.
- [40] M. Furuhashi, G.S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets, *Nat Rev Drug Discov*. 7 (2008) 489. <https://doi.org/10.1038/nrd2589>.
- [41] A. Gil-Sánchez, H. Demmelmair, J.J. Parrilla, B. Koletzko, E. Larqué, B.S. Muhlhausler, J.A. Armitage, S. Gentili, Mechanisms involved in the selective transfer of long chain polyunsaturated fatty acids to the fetus, (2011). <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00057>.
- [42] D. Jump, Fatty acid regulation of gene transcription., *Crit Rev Clin Lab Sci*. 41 (2004) 41-78. <https://doi.org/10.1080/10408360490278341>.

- [43] H. Miyachi, Structural biology-based exploration of subtype-selective agonists for peroxisome proliferator-activated receptors, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22179223>.
- [44] L. Michalik, J. Auwerx, J.P. Berger, V.K. Chatterjee, C.K. Glass, F.J. Gonzalez, P.A. Grimaldi, T. Kadowaki, M.A. Lazar, S.O. Rahilly, C.N.A. Palmer, J. Plutzky, J.K. Reddy, B.M. Spiegelman, B. Staels, *International Union of Pharmacology . LXI . Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, 58 (2006) 726-741. [https://doi.org/10.1124/pr.58.4.5.\(NR1C1\)](https://doi.org/10.1124/pr.58.4.5.(NR1C1)).
- [45] K.D. Wagner, N. Wagner, Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions, *Pharmacol. Ther.* 125 (2010) 423-435. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.12.001>.
- [46] G. Medina, C. Sewter, A.J. Vidal Puig, PPARy y tiazolidinedionas, algo más que un tratamiento contra la diabetes, *Med. Clin. (Barc)*. 115 (2000) 392-397. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(00\)71569-7](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(00)71569-7).
- [47] P. Calder, Eicosanoids, *Essays Biochem.* 23 (2020) 423-441. <https://doi.org/10.1042/EBC20190083>.
- [48] A. Heller, H. Theilen, T. Koch, Fish or chips?, *News Physiol Sci.* 18 (2003) 50-54. <https://doi.org/10.1152/nips.01419.2002>.
- [49] W.W. Christi, J.L. Harwoo, Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators, *Essays Biochem.* 64 (2020) 401-421. <https://doi.org/10.1042/EBC20190082>.
- [50] H. Tapiero, G. Nguyen Ba, P. Couvreur, K.D. Tew, Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00193-2).
- [51] H. Wise, Y.H. Wong, R.L. Jones, Prostanoid signal integration and cross talk, *NeuroSignals.* 11 (2002) 20-28. <https://doi.org/10.1159/000057318>.
- [52] A. Vidakovic, V. Jaddoe, T. Voortman, H. Demmelmair, B. Koletzko, R. Gaillard, Maternal plasma polyunsaturated fatty acid levels during pregnancy and childhood lipid and insulin levels., *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 27 (2017) 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.10.001>.
- [53] S. Jochems, M. Gielen, P. Rump, G. Hornstra, M. Zeegers, Potential programming of selected cardiometabolic risk factors at childhood by maternal polyunsaturated fatty acid availability in the MEFAB cohort., *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids.* 100 (2015) 21-7. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.06.001>.
- [54] C.M. Hao, M.D. Breyer, Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney, *Kidney Int.* 71 (2007) 1105-1115. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002192>.
- [55] K. Takeuchi, K. Amagase, Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 2002-2011. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180629111227>.
- [56] J.D. Niringiyumukiza, H. Cai, W. Xiang, Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: Ovulation, fertilization, embryo development and early implantation, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16 (2018) 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0359-5>.
- [57] L. Myatt, S.J. Lye, Expression, localization and function of prostaglandin receptors in

- myometrium, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 70 (2004) 137-148. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2003.04.004>.
- [58] A.P. Simopoulos, Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases, *Biomed. Pharmacother.* 60 (2006) 502-507. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.080>.
- [59] J.A. Martínez, M. Cámara, R. Giner, E. González, E. López, J. Mañes, M.P. Portillo, M. Rafecas, E. Gutiérrez, M. García, L. Domínguez, Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) de revisión y actualización de las Recomendaciones Dietéticas para la población española, *Rev. del Com. científico.* 32 (2020) 11-58. <https://www.sennutricion.org/es/2020/10/06/informe-del-comite-cientifico-de-la-agencia-espanola-de-seguridad-alimentaria-y-nutricion-aesan-de-revision-y-actualizacion-de-las-recomendaciones-dieteticas-para-la-poblacion-espanola>.
- [60] A.P. Simopoulos, An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity, *Nutrients.* 8 (2016) 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>.
- [61] G. Marcelino, P.A. Hiane, K. de C. Freitas, L.F. Santana, A. Pott, J.R. Donadon, R. de C.A. Guimarães, Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota, *Nutrients.* 11 (2019) 4-6. <https://doi.org/10.3390/nu11081826>.
- [62] A. Mazzocchi, L. Leone, C. Agostoni, I. Pali-Schöll, The secrets of the mediterranean diet. Does [only] olive oil matter?, *Nutrients.* 11 (2019) 1-14. <https://doi.org/10.3390/nu11122941>.
- [63] P. Calder, Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health, *J Parenter Enter. Nutr.* 39 (2015) 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>.
- [64] U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services., *Dietary Guidelines for Americans, 2020-2025, 9th ed., 2020.* <https://www.dietaryguidelines.gov/>.
- [65] National Institute Of Health. Office Of Dietary Supplements, (2022). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-HealthProfessional/#en62>.
- [66] Y. Hu, F.B. Hu, J.A.E. Manson, Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants, *J. Am. Heart Assoc.* 8 (2019). <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013543>.
- [67] A. Abdelhamid, T. Brown, J. Brainard, P. Biswas, G. Thorpe, H. Moore, K. Deane, C. Summerbell, H. Worthington, F. Song, L. Hooper, Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease, *Cochrane Database Syst Rev.* 29 (2020). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003177.pub5>.
- [68] A.C. Skulas-Ray, P.W.F. Wilson, W.S. Harris, E.A. Brinton, P.M. Kris-Etherton, C.K. Richter, T.A. Jacobson, M.B. Engler, M. Miller, J.G. Robinson, C.B. Blum, D. Rodriguez-Leyva, S.D. De Ferranti, F.K. Welty, Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory From the American Heart Association, *Circulation.* 140 (2019) 673-691. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000709>.
- [69] U.S. Food and Drug Administration (FDA), Advice about Eating Fish, (2021). <https://www.fda.gov/food/consumers/advice-about-eating-fish>.
- [70] J.M. Moreno Villares, G. Oliveira Fuster, J.M. Culebras Fernández, Guías alimentarias para

- la población española (SENC, diciembre 2016); la nueva pirámide de la alimentación saludable, 33 (2016). <https://www.semg.es/index.php/consensos-guias-y-protocolos/265-guia-alimentaria-201>.
- [71] W. Ratajczak, A. Rył, A. Mizerski, K. Walczakiewicz, O. Sipak, M. Laszczyńska, Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs), *Acta Biochim Pol.* 4 (2019) 1-12. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648.
- [72] M. Ziętek, Z. Celewicz, M. Szczuko, Short-chain fatty acids, maternal microbiota and metabolism in pregnancy, *Nutrients.* 13 (2021) 1-20. <https://doi.org/10.3390/nu13041244>.
- [73] D. Ríos-Covián, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, M. Gueimonde, C.G. De los Reyes-Gavilán, N. Salazar, Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>.
- [74] E. Hijova, A. Chmelarova, Short chain fatty acids and colonic health, *Bratisl Lek List.* 108 (2007) 354-358. <http://bmj.fmed.uniba.sk/2007/10808-06.pdf>.
- [75] H. Liu, J. Wang, T. He, S. Becker, G. Zhang, D. Li, X. Ma, Butyrate: A double-edged sword for health?, *Adv. Nutr.* 9 (2018) 21-29. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx009>.
- [76] J.M.W. Wong, R. de Souza, C.W.C. Kendall, A. Emam, D.J.A. Jenkins, Colonic health: fermentation and short chain fatty acids, *J Clin Gastroenterol.* 40 (2006) 235-43. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>.
- [77] V. Vinelli, P. Biscotti, D. Martini, C. Del Bo', M. Marino, T. Meroño, O. Nikoloudaki, F.M. Calabrese, S. Turroni, V. Taverniti, A. Unión Caballero, C. Andrés-Lacueva, M. Porrini, M. Gobetti, M. De Angelis, P. Brigidi, M. Pinart, K. Nimptsch, S. Guglielmetti, P. Riso, Effects of Dietary Fibers on Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review, *Nutrients.* 14 (2022) 2559. <https://doi.org/10.3390/nu14132559>.
- [78] J. He, P. Zhang, L. Shen, L. Niu, Y. Tan, L. Chen, Y. Zhao, L. Bai, X. Hao, X. Li, S. Zhang, L. Zhu, Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms21176356>.
- [79] S. Al Mahri, S.S. Malik, M. Al Ibrahim, E. Haji, G. Dairi, S. Mohammad, Free Fatty Acid Receptors (FFARs) in Adipose: Physiological Role and Therapeutic Outlook, *Cells.* 11 (2022) 1-10. <https://doi.org/10.3390/cells11040750>.
- [80] G. Milligan, L.A. Stoddart, N.J. Smith, Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00421.x>.
- [81] A. Lympelopoulou, M.S. Suster, J.I. Borges, Short-Chain Fatty Acid Receptors and Cardiovascular Function, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23063303>.
- [82] W. Feng, J. Liu, H. Cheng, D. Zhang, Y. Tan, C. Peng, Dietary compounds in modulation of gut microbiota-derived metabolites, *Front. Nutr.* 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.939571>.
- [83] M.T. Siddiqui, G.A.M. Cresci, The Immunomodulatory Functions of Butyrate, *J. Inflamm. Res.* 14 (2021) 6025-6041. <https://doi.org/10.2147/JIR.S300989>.

- [84] Gheorghe, AS, ŞM Negru, M. Preda, R. Mihăilă, I. Komporaly, E. Dumitrescu, C. Lungulescu, L. Kajanto, B. Georgescu, E. Radu, D. Stănculeanu, Biochemical and Metabolical Pathways Associated with Microbiota-Derived Butyrate in Colorectal Cancer and Omega-3 Fatty Acids Implications: A Narrative Review., *Nutrients*. 14 (2022) 1152. <https://doi.org/10.3390/nu14061152>.
- [85] Y.P. Silva, A. Bernardi, R. Luiz Frozza, The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication, *Front Endocrinol*. 31 (2020) 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>.
- [86] Y. Lu, Y. Zhang, X. Zhao, C. Shang, M. Xiang, L. Li, X. Cui, Microbiota-derived short-chain fatty acids: Implications for cardiovascular and metabolic disease, *Front. Cardiovasc. Med*. 9 (2022) 1-17. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.900381>.
- [87] E. Boets, S. V Gomand, L. Deroover, T. Preston, K. Vermeulen, V. De Preter, H.M. Hamer, G. Van Den Mooter, L. De Vuyst, C.M. Courtin, P. Annaert, J.A. Delcour, K.A. Verbeke, J. Physiol, Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study 542 E. Boets and others, Authors. *J. Physiol. C*. 595 (2017) 541-555. <https://doi.org/10.1113/JP272613>.
- [88] R. Roy, C. Nguyen-Ngo, M. Lappas, Short-chain fatty acids as novel therapeutics for gestational diabetes, *J. Mol. Endocrinol*. 65 (2020) 21-34. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0094>.
- [89] L.G. Sparvoli, R. V. Cortez, S. Daher, M. Padilha, S.Y. Sun, M.U. Nakamura, C.R. Taddei, Women's multisite microbial modulation during pregnancy, *Microb. Pathog*. 147 (2020) 104230. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104230>.
- [90] M. Szczuko, J. Kikut, D. Maciejewska, D. Kulpa, Z. Celewicz, M. Ziętek, The associations of scfa with anthropometric parameters and carbohydrate metabolism in pregnant women, *Int. J. Mol. Sci*. 21 (2020) 1-12. <https://doi.org/10.3390/ijms21239212>.
- [91] M. Jin, D. Li, R. Ji, W. Liu, X. Xu, Y. Li, Changes in intestinal microflora in digestive tract diseases during pregnancy, *Arch. Gynecol. Obstet*. 301 (2020) 243-249. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05336-0>.
- [92] F. Altemani, H.L. Barrett, L. Gomez-Arango, P. Josh, H. David McIntyre, L.K. Callaway, M. Morrison, G.W. Tyson, M. Dekker Nitert, Pregnant women who develop preeclampsia have lower abundance of the butyrate-producer *Coprococcus* in their gut microbiota, *Pregnancy Hypertens*. 23 (2021) 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.01.002>.
- [93] S.M. Edwards, S.A. Cunningham, A.L. Dunlop, E.J. Corwin, The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy, *MCN Am. J. Matern. Nurs*. 42 (2017) 310-316. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000372>.
- [94] A. Mousa, A. Naqash, S. Lim, Macronutrient and micronutrient intake during pregnancy: An overview of recent evidence, *Nutrients*. 11 (2019) 1-20. <https://doi.org/10.3390/nu11020443>.
- [95] B. Koletzko, K.M. Godfrey, L. Poston, H. Szajewska, J.B. Van Goudoever, M. De Waard, B. Brands, R.M. Grivell, A.R. Deussen, J.M. Dodd, B. Patro-Golab, B.M. Zalewski, Nutrition during pregnancy, lactation and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: The early nutrition project recommendations, *Ann. Nutr. Metab*. 74 (2019) 93-106. <https://doi.org/10.1159/000496471>.

- [96] B. Koletzko, B. Brands, V. Grote, F.F. Kirchberg, C. Prell, P. Rzehak, O. Uhl, M. Weber, Long-Term Health Impact of Early Nutrition: The Power of Programming, *Ann. Nutr. Metab.* 70 (2017) 161-169. <https://doi.org/10.1159/000477781>.
- [97] A.K. Duttaroy, S. Basak, Maternal Fatty Acid Metabolism in Pregnancy and Its Consequences in the Feto-Placental Development, *Front. Physiol.* 12 (2022) 1-16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.787848>.
- [98] G. Moser, B. Huppertz, Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking, *Placenta.* 56 (2017) 19-26. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2017.02.007>.
- [99] S. Basak, M.K. Das, A.K. Duttaroy, Fatty acid-induced angiogenesis in first trimester placental trophoblast cells: Possible roles of cellular fatty acid-binding proteins, *Life Sci.* 93 (2013) 755-762. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2013.09.024>.
- [100] T. Chaiworapongsa, R. Romero, A. Savasan, J.P. Kusanovic, G. Ogge, E. Soto, Z. Dong, A. Tarca, B. Gaurav, S.S. Hassan, Maternal plasma concentrations of angiogenic/ anti-angiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia, *J. Matern. Neonatal Med.* 24 (2011) 1187-1207. <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.589932>.
- [101] Y. Zhang, Y. Daaka, PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cγ pathway, *Blood.* 118 (2011) 5355-5364. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-350587>.
- [102] G. Di Cianni, R. Miccoli, L. Volpe, C. Lencioni, S. Del Prato, Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes., *Diabetes Metab Res Rev.* 19 (2003) 259-70. <https://doi.org/10.1002/dmrr.390>.
- [103] A. Ornoy, Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia, *Reprod. Toxicol.* 32 (2011) 205-212. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2011.05.002>.
- [104] P.P. Devarshi, R.W. Grant, C.J. Ikonte, S. Hazels Mitmesser, Maternal Omega-3 Nutrition , Placental Transfer and, *Nutrients.* 11 (2019) 1107-1119. <https://doi.org/10.3390/nu11051107>.
- [105] American Diabetes Association, Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018, *Diabetes Care.* 41 (2018) S13-S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.
- [106] Y. Gao, T. Li, M. Han, X. Li, D. Wu, Y. Xu, Y. Zhu, Y. Liu, X. Wang, L. Wang, Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19, *J. Med. Virol.* 92 (2020) 1-6. <https://doi.org/10.1002/jmv.25770>.
- [107] B. Elshani, V. Kotori, A. Daci, Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetes, maternal and fetal insights: current use and future directions, *J. Matern. Neonatal Med.* 34 (2021) 124-136. <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1593361>.
- [108] J. Dalby Salvig, R.F. Lamont, Evidence regarding an effect of marine n-3 fatty acids on preterm birth: a systematic review and meta-analysis, (s. f.). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01171.x>.
- [109] P. Middleton, J.C. Gomersall, J.F. Gould, E. Shepherd, S.F. Olsen, M. Makrides, Omega-3 Fatty Acid Addition during Pregnancy, *Cochrane Database Syst Rev.* 11 (2018) CD003402. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003402.pub3>.

- [110] S.F. Olsen, T.I. Halldorsson, A.L. Thorne-Lyman, M. Strøm, S. Gørtz, C. Granstrøm, P.H. Nielsen, J. Wohlfahrt, J.A. Lykke, J. Langhoff-Roos, A.S. Cohen, J.D. Furtado, E.L. Giovannucci, W. Zhou, Plasma Concentrations of Long Chain N-3 Fatty Acids in Early and Mid-Pregnancy and Risk of Early Preterm Birth, *EBioMedicine*. 35 (2018) 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.07.009>.
- [111] G. Wu, B. Imhoff-Kunsch, A.W. Girard, Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 26 (2012) 4-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2012.01291.x>.
- [112] J. Golding, C. Steer, P. Emmett, J.M. Davis, J.R. Hibbeln, High levels of depressive symptoms in pregnancy with low omega-3 fatty acid intake from fish, *Epidemiology*. 20 (2009) 598-603. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31819d6a57>.
- [113] J. Dos Santos Vaz, G. Kac, P. Emmett, J.M. Davis, J. Golding, J.R. Hibbeln, Dietary Patterns, n-3 Fatty Acids Intake from Seafood and High Levels of Anxiety Symptoms during Pregnancy: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children, (s. f.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067671>.
- [114] I. Anderson, I. Ferrier, R. Baldwin, et al., Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines., *J. Psychopharmacol.* 22 (2008) 343-396. <https://doi.org/10.1177/0269881107088441>.
- [115] J. Martins, EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials., *J Am Coll Nutr.* 25 (2009) 525-542. <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719785>.
- [116] M.E. Sublette, S.P. Ellis, A.L. Geant, J.J. Mann, Meta-analysis: Effects of Eicosapentaenoic Acid in Clinical Trials in Depression, *J Clin Psychiatry.* 72 (2011) 1577-1584. <https://doi.org/10.4088/JCP.10m06634>.
- [117] B. Hallahan, T. Ryan, J.R. Hibbeln, I.T. Murray, S. Glynn, C.E. Ramsden, J.P. Sangiovanni, J.M. Davis, Efficacy of omega-3 highly unsaturated fatty acids in the treatment of depression, (s. f.). <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.160242>.
- [118] J.M. Wojcicki, M.B. Heyman, Maternal omega-3 fatty acid supplementation and risk for perinatal maternal depression, (2011). <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.521873>.
- [119] S.M. Innis, Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain, *Brain Res.* 1237 (2008) 35-43. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.08.078>.
- [120] Y. Huang, A.M. Iosif, R.L. Hansen, R.J. Schmidt, Maternal polyunsaturated fatty acids and risk for autism spectrum disorder in the MARBLES high-risk study, *Autism.* 24 (2020) 1191-1200. <https://doi.org/10.1177/1362361319877792>.
- [121] S. Basak, R. Mallick, Maternal Docosahexaenoic Acid Status during Pregnancy and Its Impact on Infant Neurodevelopment, (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12123615>.
- [122] L. Lauritzen, P. Brambilla, A. Mazzocchi, L.B.S. Harsløf, V. Ciappolino, C. Agostoni, DHA effects in brain development and function, *Nutrients.* 8 (2016) 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>.
- [123] N.M. Giusto, S.J. Pasquaré, G.A. Salvador, P.I. Castagnet, M.E. Roque, M.G. Ilincheta De Boschero, Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments, *Prog. Lipid Res.* 39 (2000) 315-391. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00009-6).

- [124] R. Uauy, D. Hoffman, P. Peirano, D. Birch, E. Birch, Essential fatty acids in visual and brain development., *Lipids*. 36 (2001) 885-895. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0798-1>.
- [125] E.A. Miles, C.E. Childs, P.C. Calder, Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and the developing immune system: A narrative review, *Nutrients*. 13 (2021) 1-21. <https://doi.org/10.3390/nu13010247>.
- [126] S.M. Innis, Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early lifem cn_318 112..123, (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00318.x>.
- [127] M.L. Mathai, M. Soueid, N. Chen, A.P. Jayasooriya, A.J. Sinclair, M.E. Wlodek, H.S. Weisinger, R.S. Weisinger, Does Perinatal-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency Increase Appetite Signaling?, s. f. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.234>.
- [128] J. Hurtado, C. Iznola, M. Peña, J. Ruíz, L. Peña-Quintana, N. Kajarabille, Y. Rodriguez-Santana, P. Sanjurjo, L. Aldámiz-Echevarría, J. Ochoa, F. Lara-Villoslada, N. Group., Effects of Maternal Ω -3 Supplementation on Fatty Acids and on Visual and Cognitive Development., *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 61 (2015) 472-480. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000864>.
- [129] J.F. Gould, L.G. Smithers, M. Makrides, The effect of maternal omega-3 (n23) LCPUFA supplementation during pregnancy on early childhood cognitive and visual development: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials 1-3, (s. f.). <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.045781>.
- [130] M. Makrides, R.A. Gibson, A.J. Mcphee, L. Yelland, J. Quinlivan, P. Ryan, Effect of DHA Supplementation During Pregnancy on Maternal Depression and Neurodevelopment of Young Children A Randomized Controlled Trial, s. f. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1507>.
- [131] S. Meldrum, J.A. Dunstan, J.K. Foster, K. Simmer, S.L. Prescott, Maternal Fish Oil Supplementation in Pregnancy: A 12 Year Follow-Up of a Randomised Controlled Trial, *Nutrients*. 7 (2015) 2061-2067. <https://doi.org/10.3390/nu7032061>.
- [132] N. Gawlik, M. Makrides, L. Kettler, L. Yelland, S. Leemaqz, J. Gould, The influence of DHA supplementation during pregnancy on language development across childhood: Follow-up of a randomised controlled trial., *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids*. 163 (2020) 102207. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102207>.
- [133] J. Dunstan, K. Simmer, G. Dixon, S. Prescott, Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial., *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 93 (2008) F45-50. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.099085>.
- [134] S.E. Carlson, J. Colombo, B.J. Gajewski, K.M. Gustafson, D. Mundy, J. Yeast, M.K. Georgieff, L.A. Markley, E.H. Kerling, J. Shaddy, DHA supplementation and pregnancy outcomes, (s. f.). <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.050021>.
- [135] J. Colombo, J. Shaddy, K. Gustafson, B.J. Gajewski, J.M. Thodosoff, E. Kerling, S.E. Carlson, The Kansas University DHA Outcomes Study (KUDOS) clinical trial: long-term behavioral follow-up of the effects of prenatal DHA supplementation, *Am J Clin Nutr*. 109 (2019) 1380-1392. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz018>.
- [136] M. Judge, O. Harel, C. Lammi-Keefe, A docosahexaenoic acid-functional food during pregnancy benefits infant visual acuity at four but not six months of age., *Lipids*. 42 (2007) 117-122. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3007-3>.

- [137] K.A. Mulder, R. Elango, S.M. Innis, Fetal DHA inadequacy and the impact on child neurodevelopment: a follow-up of a randomised trial of maternal DHA supplementation in pregnancy, *Br. J. Nutr.* 119 (2018) 271-279. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003531>.
- [138] U. Ramakrishnan, A. D. Stein, S. Parra-Cabrera, M. Wang, B. Imhoff-Kunsch, S. Juárez-Márquez, J. Rivera, R. Martorell, Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Mexico, *Food Nutr.* 31 (2010) S108-S116. <https://doi.org/10.1177/15648265100312S203>.
- [139] M.V. Escolano-Margarit, R. Ramos, J. Beyer, G. Rgyi Csá bi, M. Parrilla-Roure, F. Cruz, M. Perez-Garcia, M. Hadders-Algra, A. Gil, T. Decsi, B. V Koletzko, C. Campoy, V. Hauner Children, Prenatal DHA Status and Neurological Outcome in Children at Age 5.5 Years Are Positively Associated, *J. Nutr.* 141 (2011) 1216-1223. <https://doi.org/10.3945/jn.110.129635>.
- [140] E. Ogunidipe, N. Tusor, Y. Wang, M.R. Johnson, A.D. Edwards, M.A. Crawford, Randomized controlled trial of brain specific fatty acid supplementation in pregnant women increases brain volumes on MRI scans of their newborn infants, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 138 (2018) 6-13. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2018.09.001>.
- [141] I. Helland, L. Smith, K. Saarem, O. Saugstad, C. Drevon, Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age., *Pediatrics.* 111 (2003) e39-44. <https://doi.org/10.1542/peds.111.1.e39>.
- [142] I. Helland, L. Smith, B. Blomén, K. Saarem, O. Saugstad, C. Drevon, Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age., *Pediatrics.* 122 (2008) e472-479. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-2762>.
- [143] A. Ostadrahimi, H. Salehi-Pourmehr, S. Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S. Heidarabady, A. Farshbaf-Khalili, The effect of perinatal fish oil supplementation on neurodevelopment and growth of infants: a randomized controlled trial., *Eur J Nutr.* 57 (2018) 2387-2397. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1512-1>.
- [144] E.B. Isaacs, S. Ross, K. Kennedy, L.T. Weaver, A. Lucas, M.S. Fewtrell, 10-Year Cognition in Preterms After Random Assignment To Fatty Acid Supplementation in Infancy, *Pediatrics.* 128 (2011) 1-9. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-3153>.
- [145] M. Clandinin, J. Van Aerde, K. Merkel, C. Harris, M. Springer, J. Hansen, D. Diersen-Schade, Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid, *J Pediatr.* 146 (2005) 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.11.030>.
- [146] M. Baack, S. Puumala, S. Messier, D. Pritchett, W. Harris, Daily Enteral DHA Supplementation Alleviates Deficiency in Premature Infants., *Lipids.* 51 (2016) 423-33. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4130-4>.
- [147] P. Fang, H. Kuo, C. Huang, T. Ko, C. Chen, M. Chung, The effect of supplementation of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on visual acuity and neurodevelopment in larger preterm infants., *Chang Gung Med J.* 28 (2005) 708-715. <http://cgmj.cgu.edu.tw/2810/281005.pdf>.
- [148] F. Hanebutt, H. Demmelmair, B. Schiessl, E. Larqué, B. Koletzko, Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta., *Clin Nutr.* 27 (2008)

- 685-693. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.05.010>.
- [149] N. Wadhwani, K. Dangat, A. Joshi, S. Joshi, Maternal micronutrients and omega 3 fatty acids affect placental fatty acid desaturases and transport proteins in Wistar rats., *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids.* 88 (2013) 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.12.002>.
- [150] M.L. Jones, P.J. Mark, B.J. Waddell, Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function, *Reproduction.* 147 (2014). <https://doi.org/10.1530/REP-13-0376>.
- [151] P. Haggarty, Effect of placental function in fatty acid requirements during pregnancy, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58 (2004) 1559-1570. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602016>.
- [152] P. Haggarty, Meeting the fetal requirement for polyunsaturated fatty acids in pregnancy, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 17 (2014) 151-155. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000036>.
- [153] R.M. Lewis, C.E. Childs, P.C. Calder, New perspectives on placental fatty acid transfer, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 138 (2018) 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.10.001>.
- [154] A. Duttaroy, Transport of fatty acids across the human placenta: A review, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.11.001>.
- [155] A. Gil-Sánchez, E. Larqué, H. Demmelmair, M.I. Acien, F.L. Faber, J.J. Parrilla, B. Koletzko, Maternal-fetal in vivo transfer of [¹³C]docosahexaenoic and other fatty acids across the human placenta 12 h after maternal oral intake., (s. f.). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29589>.
- [156] E. Larqué, H. Demmelmair, B. Berger, U. Hasbargen, B. Koletzko, In vivo investigation of the placental transfer of ¹³C-labeled fatty acids in humans, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 49-55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200067-JLR200>.
- [157] A. Rani, N. Wadhwani, P. Chavan-Gautam, S. Joshi, Altered development and function of the placental regions in preeclampsia and its association with long-chain polyunsaturated fatty acids, *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 5 (2016) 582-97. <https://doi.org/10.1002/wdev.238>.
- [158] A. Ornoy, N. Ratzon, C. Greenbaum, A. Wolf, M. Dulitzky, School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment., *J Pediatr Endocrinol Metab.* 14 (2001) 681-9. <https://doi.org/10.1515/jpem.2001.14.s1.681>.
- [159] K.T. Albuquerque, F.L.C. Sardinha, M.M. Telles, R.L.H. Watanabe, C.M.O. Nascimento, M.G. Tavares do Carmo, E.B. Ribeiro, Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring, *Nutrition.* 22 (2006) 820-829. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2006.04.009>.
- [160] J.A. Morrison, C.J. Glueck, P. Wang, Dietary trans fatty acid intake is associated with increased fetal loss, *Fertil. Steril.* 90 (2008) 385-390. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.06.037>.
- [161] L.P. Pisani, C.M. Oller Do Nascimento, A.A. Bueno, C. Biz, K.T. Albuquerque, E.B. Ribeiro, L.M. Oyama, Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life, (2008). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-7-13>.

- [162] H. Çekici, Y. Akdevelioğlu, The association between trans fatty acids, infertility and fetal life: a review., *Hum Fertil (Camb)*. 22 (2019) 154-163. <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1432078>.
- [163] M. Cuervo, E. Baladia, L. Goni, M. Corbalan, M. Manera, J. Basulto, S. Perez, I. Abete, J.A. Martinez, Propuesta de Ingestas Dieteticas de Referencia (IDR) para poblacion española, *Fed. Española Soc. Nutr. Aliment. y Dietética*. (2010) (Acceso el 21 de Septiembre de 2022). https://sennutricion.org/media/Docs_Consenso/7-IDR_Poblaci__n_Espa__ola-FESNAD_2010_C5-Propuesta_IDR_FESNAD_2010.pdf.
- [164] Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Recomendaciones nutricionales para embarazadas con diabetes gestacional, (2020) (Acceso el 21 de Septiembre de 2022). https://www.seen.es/ModulGEX/workspace/publico/modulos/web/docs/apartados/2076/150221_090533_5706642613.pdf.
- [165] M. López, J. Sánchez, M. Sánchez, M. Calderay, Suplementos en embarazadas: controversias, evidencias y recomendaciones, *Sist. Nac. Salud, Minist. Sanid. (Gobierno España)*. 34 (2010) 117-128. https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/infMedic/docs/vol34n4_Suplementos.pdf.
- [166] European Food and Safe Authority, Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA), *EFSA J*. 10 (2012) 1-48. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2815>.
- [167] EFSA (European Food Safety Authority), Dietary Reference Values for nutrients Summary report, *EFSA Support. Publ.* 14 (2017). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>.
- [168] M. Klingler, B. Koletzko, Novel methodologies for assessing omega-3 fatty acid status-a systematic review, (2001). <https://doi.org/10.1017/S0007114512001468>.
- [169] L. Kohlmeier, Future of dietary exposure assessment, *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995). <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.702S>.
- [170] K.E. Bradbury, C.M. Skeaff, F.L. Crowe, T.J. Green, L. Hodson, Serum fatty acid reference ranges: Percentiles from a New Zealand national nutrition survey, *Nutrients*. 3 (2011) 152-163. <https://doi.org/10.3390/nu3010152>.
- [171] E. Bligh, W. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification., *Can J Biochem Physiol.* 37 (1959) 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [172] J. Folch, M. Lees, G. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues., *J Biol Chem. J Biol Chem.* 226 (1957) 497-509.
- [173] R.K. Saini, P. Prasad, X. Shang, Y.S. Keum, Advances in lipid extraction methods—a review, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>.
- [174] W.W. Christie, X. Han, Preparation of derivatives of fatty acids, *Lipid Anal.* (2012) 145-158. <https://doi.org/10.1533/9780857097866.145>.
- [175] W.W. Christie, X. Han, Gas chromatographic analysis of fatty acid derivatives, *Lipid Anal.* (2012) 159-180. <https://doi.org/10.1533/9780857097866.159>.
- [176] D. Wang, S. Yu, Y. Zhang, Y. Yin, Q. Cheng, S. Xie, J. Yu, H. Li, X. Cheng, L. Qiu, Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine very-long-chain fatty acids in human and to establish reference intervals for the Chinese population, *Clin. Chim. Acta.* 495 (2019) 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.04.058>.

- [177] A. Shafaei, V. Vamathevan, J. Pandohee, N.G. Lawler, D. Broadhurst, M.C. Boyce, Sensitive and quantitative determination of short-chain fatty acids in human serum using liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 6333-6342. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03589-w>.
- [178] J. Vongsvivut, M.R. Miller, D. McNaughton, P. Heraud, C.J. Barrow, Rapid Discrimination and Determination of Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Marine Oils by FTIR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis, *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 2410-2422. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1251-0>.
- [179] T.L. Amorim, L.M. Duarte, P.R. Chellini, M.A.L. de Oliveira, A validated capillary electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements, *LWT.* 114 (2019) 108380. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108380>.
- [180] S.A. Abdelmagid, S.E. Clarke, D.E. Nielsen, A. Badawi, A. El-Soheby, D.M. Mutch, D.W.L. Ma, Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy canadian adults, *PLoS One.* 10 (2015) 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>.
- [181] R.K. Sera, J.H. McBride, S.A. Higgins, D.O. Rodgerson, Evaluation of Reference Ranges for Fatty Acids in Serum, *J. Clin. Lab. Anal.* 8 (1994) 81-85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcla.1860080205>.
- [182] V. Garneau, I. Rudkowska, A.M. Paradis, G. Godin, P. Julien, L. Pérusse, M.C. Vohl, Omega-3 fatty acids status in human subjects estimated using a food frequency questionnaire and plasma phospholipids levels, *Nutr. J.* 11 (2012) 1-6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-46>.
- [183] T. Tanaka, J. Shen, G.R. Abecasis, A. Kisialiou, J.M. Ordovas, Genome-Wide Association Study of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids in the InCHIANTI Study, *PLoS Genet.* 5 (2009) 1000338. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000338>.
- [184] U. Enke, A. Jaudszus, E. Schleussner, L. Seyfarth, G. Jahreis, K. Kuhnt, Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: Special focus on individual trans fatty acids and conjugated linoleic acids, *Lipids Health Dis.* 10 (2011) 1-11. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-247>.
- [185] B. González de la Presa, F. Canalias Reverter, S. Esteve Poblador, F.J. Gella Tomás, S. Izquierdo Álvarez, R.M. López Martínez, R. Rigo Bonnin, N. Serrat Orús., Procedure for transference and review of biological reference intervals, *Rev. del Lab. Clin.* 10 (2017) 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2016.11.004>.
- [186] Asociación Española de Normalización y Certificación, Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia (ISO 15189:2012), 2013. <https://www.iso.org/standard/56115.html>.
- [187] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory., Third Edit, Wayne, PA 19087 USA, 2010. www.clsi.org.
- [188] J. Henny, A. Vassault, G. Boursier, I. Vukasovic, P. Mesko Brguljan, M. Lohmander, I. Ghita, F.A.B. Andreu, C. Kroupis, L. Sprongl, M.H.M. Thelen, F.J.L.A. Vanstapel, T. Vodnik, W. Huisman, M. Vaubourdolle, Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories, *Clin. Chem. Lab. Med.* 54 (2016) 1893-1900. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0793>.

- [189] K.T. Khaw, M.D. Friesen, E. Riboli, R. Luben, N. Wareham, Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: The EPIC-Norfolk prospective study, *PLoS Med.* 9 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001255>.
- [190] S. Lee, J. David Curb, T. Kadowaki, R.W. Evans, K. Miura, T. Takamiya, C. Shin, A. El-Saed, J. Choo, A. Fujiyoshi, T. Otake, S. Kadowaki, T. Seto, K. Masaki, D. Edmundowicz, H. Ueshima, L.H. Kuller, A. Sekikawa, Significant inverse associations of serum n-6 fatty acids with plasma plasminogen activator inhibitor-1, (s. f.). <https://doi.org/10.1017/S0007114511003199>.
- [191] C.A.C. Lust, X. Bi, C.J. Henry, D.W.L. Ma, Development of Fatty Acid Reference Ranges and Relationship with Lipid Biomarkers in Middle-Aged Healthy Singaporean Men and Women, (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13020435>.
- [192] Mayo Clinic Laboratories, Fatty Acid Profile, Serum, (s. f.) <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinic>.
- [193] M. Nuriel-Ohayon, H. Neuman, O. Koren, Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01031>.
- [194] M.J. Blaser, M.G. Dominguez-Bello, The Human Microbiome before Birth, *Cell Host Microbe.* 20 (2016) 558-560. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.014>.
- [195] A.D. Gernand, K.J. Schulze, C.P. Stewart, K.P. West, P. Christian, Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: Health effects and prevention, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (2016) 274-289. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.37>.
- [196] J.P. Zhao, E. Levy, B. Shatenstein, W.D. Fraser, P. Julien, A. Montoudis, S. Spahis, L. Xiao, A.M. Nuyt, Z.C. Luo, Longitudinal circulating concentrations of long-chain polyunsaturated fatty acids in the third trimester of pregnancy in gestational diabetes, *Diabet. Med.* 33 (2015) 939-946. <https://doi.org/10.1111/dme.12978>.
- [197] R. Montes, A.M. Chisaguano, A.I. Castellote, E. Morales, J. Sunyer, M.C. López-Sabater, Fatty-Acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort, *Eur. J. Clin. Nutr.* 67 (2013) 658-663. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.68>.
- [198] S.J. Otto, A.C. Van Houwelingen, A. Badart-Smook, G. Hornstra, Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001) 302-307. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.302>.
- [199] A.R. Magnusardottir, L. Steingrimsdottir, H. Thorgeirdottir, A. Hauksson, G. V Skuladottir, Red blood cell n-3 polyunsaturated fatty acids in first trimester of pregnancy are inversely associated with placental weight, *Acta Obs. Gynecol Scand.* 88 (2009) 91-97. <https://doi.org/10.1080/00016340802616914>.
- [200] S.J. Wheeler, L. Poston, J.E. Thomas, P.T. Seed, P.N. Baker, T.A.B. Sanders, Maternal plasma fatty acid composition and pregnancy outcome in adolescents, *Br. J. Nutr.* 105 (2011) 601-610. <https://doi.org/10.1017/S00071145110004083>.
- [201] T. Kawabata, Y. Kagawa, F. Kimura, T. Miyazawa, S. Saito, T. Arima, K. Nakai, N. Yaegashi, Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Maternal Erythrocytes of Japanese Women during Pregnancy and after Childbirth, *Nutrients.* 9 (2017) 245. <https://doi.org/10.3390/nu9030245>.
- [202] S. Saito, T. Kawabata, N. Tatsuta, F. Kimura, T. Miyazawa, S. Mizuno, H. Nishigori, T. Arima, Y. Kagawa, K. Yoshimasu, K. Tsuno, Y. Ito, M. Kamijima, K. Nakai, N. Yaegashi,

- Determinants of polyunsaturated fatty acid concentrations in erythrocytes of pregnant Japanese women from a birth cohort study: Study protocol and baseline findings of an adjunct study of the Japan environment & Children's study, *Environ. Health Prev. Med.* 22 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0636-5>.
- [203] T.J.P. Pinto, D.R. Farias, F. Rebelo, J. Lepsch, J.S. Vaz, J.D. Moreira, G.M. Cunha, G. Kac, Lower inter-partum interval and unhealthy life-style factors are inversely associated with n-3 essential fatty acids changes during pregnancy: A prospective cohort with Brazilian women, *PLoS One.* 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121151>.
- [204] P. Araujo, M. Kjellevold, I. Nerhus, L. Dahl, I. Aakre, V. Moe, L. Smith, M.W. Markhus, Fatty acid reference intervals in red blood cells among pregnant women in Norway—Cross sectional data from the 'little in Norway' cohort, *Nutrients.* 12 (2020) 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu12102950>.
- [205] T. Torii, K. Kanemitsu, T. Wada, S. Itoh, K. Kinugawa, A. Hagiwara, Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability, *Ann. Clin. Biochem.* 47 (2010) 447-452. <https://doi.org/10.1258/acb.2010.010047>.
- [206] N. Psychogios, D.D. Hau, J. Peng, A.C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam, N. Young, J. Xia, C. Knox, E. Dong, P. Huang, Z. Hollander, T.L. Pedersen, S.R. Smith, F. Bamforth, R. Greiner, B. McManus, J.W. Newman, T. Goodfriend, D.S. Wishart, The human serum metabolome, *PLoS One.* 6 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957>.
- [207] J.G. Bloemen, K. Venema, M.C. van de Poll, S.W. Olde Damink, W.A. Buurman, C.H. Dejong, Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery, *Clin. Nutr.* 28 (2009) 657-661. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.05.011>.
- [208] Z. Tian, X. Zhuang, M. Luo, W. Yin, L. Xiong, The propionic acid and butyric acid in serum but not in feces are increased in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, *BMC Gastroenterol.* 20 (2020) 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01212-3>.
- [209] M. Priyadarshini, A. Thomas, A.C. Alexandra, D.M. Scholtens, T.M.S. Wolever, J.L. Josefson, B.T. Layden, Maternal short-chain fatty acids are associated with metabolic parameters in Mothers and Newborns, *Transl Res.* 164 (2015) 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.012>.
- [210] R.O. Bahado-Singh, R. Akolekar, A. Chelliah, R. Mandal, E. Dong, M. Kruger, D.S. Wishart, K. Nicolaidis, Metabolomic analysis for first-trimester trisomy 18 detection, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 209 (2013) 65.e1-65.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.03.028>.
- [211] C.R. Taddei, R. V. Cortez, R. Mattar, M.R. Torloni, S. Daher, Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview, *Am. J. Reprod. Immunol.* 80 (2018) 1-9. <https://doi.org/10.1111/aji.12993>.
- [212] O. Koren, J.K. Goodrich, T.C. Cullender, A. Spor, K. Laitinen, H.K. Bäckhed, A. Gonzalez, J.J. Werner, L.T. Angenent, R. Knight, F. Bäckhed, E. Isolauri, S. Salminen, R.E. Ley, Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy, *150* (2013) 470-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>.
- [213] N.A. Wilson, E. Mantzioris, P.F. Middleton, B.S. Muhlhausler, Influence of sociodemographic, lifestyle and genetic characteristics on maternal DHA and other polyunsaturated fatty acid status in pregnancy: A systematic review, *Prostaglandins*

- Leukot. Essent. Fat. Acids. 152 (2020) 102037.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102037>.
- [214] B. Koletzko, E. Lattka, S. Zeilinger, T. Illig, C. Steer, Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 211-219. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006189>.
- [215] J. Gong, H. Campos, S. McGarvey, Z. Wu, R. Goldberg, A. Baylin, Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: Does it behave as a lipokine?, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 186-191. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006502>.
- [216] J. Mayneris-Perxachs, M. Guerendiain, A. Castellote, R. Estruch, M. Covas, M. Fitó, J. Salas-Salvadó, M. Martínez-González, F. Aros, R. Lamuela-Raventós, M. López-Sabater, Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease., *Clin Nutr.* 33 (2014) 90-7. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.03.001>.
- [217] C. von Schacky, Omega-3 fatty acids in pregnancy—the case for a target omega-3 index, *Nutrients.* 12 (2020) 1-12. <https://doi.org/10.3390/nu12040898>.
- [218] K. Sowell, R. Holt, J. Uriu-Adams, C. Chambers, C. Coles, J. Kable, L. Yevtushok, N. Zymak-Zakutnya, W. Wertelecki, C. Keen, CIFASD, Altered Maternal Plasma Fatty Acid Composition by Alcohol Consumption and Smoking during Pregnancy and Associations with Fetal Alcohol Spectrum Disorders., *J Am Coll Nutr.* 39 (2020) 249-260. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1737984>.
- [219] C. Agostoni, E. Riva, M. Giovannini, F. Pinto, C. Colombo, P. Risé, C. Galli, F. Marangoni, Maternal smoking habits are associated with differences in infants' long-chain polyunsaturated fatty acids in whole blood: a case-control study., *Arch Dis Child.* 93 (2008) 414-8. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.129817>.
- [220] D. Baldassarre, M. Amato, B. Frigerio, Impact of cigarette smoking on the plasma fatty acid profile and their interaction in determining the burden of subclinical atherosclerosis., *Nutrafoods.* 13 (2014) 159-167. <https://doi.org/10.1007/s13749-014-0047-9>.
- [221] S. Gellert, J.P. Schuchardt, A. Hahn, Higher omega-3 index and DHA status in pregnant women compared to lactating women - Results from a German nation-wide cross-sectional study, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 109 (2016) 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.04.002>.
- [222] K. Stark, S. Beblo, M. Murthy, J. Whitty, M. Buda-Abela, J. Janisse, H. Rockett, S. Martier, R. Sokol, J. Hannigan, N.J. Salem, Alcohol consumption in pregnant, black women is associated with decreased plasma and erythrocyte docosahexaenoic acid., *Alcohol Clin Exp Res.* 29 (2005) 130-40. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000150013.65416.06>.
- [223] EU Clinical Trials Register, Effectiveness of adaptation of the dose of iron supplementation in pregnancy on maternal-child health. Randomized clinical trial (ECLIPSES), (s. f.). <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=2012-005480-28>.
- [224] ClinicalTrials.gov, Effectiveness of Adaptation of the Dose of Iron Supplementation in Pregnancy on Maternal-child Health. (ECLIPSES), (s. f.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03196882>.

- [225] G. De Catalunya, *Classificació catalana d'ocupacions (CCO-2011)*, (2011). <https://www.idescat.cat/serveis/biblioteca/docs/cat/cco2011.pdf>.
- [226] World Health Organization (WHO)., *Obesity and overweight*, (s. f.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- [227] Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines., *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines.*, National Academies Press (US), Washington (DC), 2009. <https://doi.org/10.17226/12584>.
- [228] I. Trinidad Rodríguez, J. Fernández Ballart, G. Cucó Pastor, E. Biarnés Jordà, V. Arijá Val, *Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: Reproducibilidad y validez*, *Nutr. Hosp.* 23 (2008) 242-252. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112008000300011.
- [229] J. Mataix, L. García-Diz, M. Mañas, E. Martínez de Vitoria, J. Llopis, *Tablas de Composición de Alimentos*, 5th ed., Editorial Universidad de Granada, Granada, Spain, 2009.
- [230] K. Fagerström, *Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment.*, *Addict Behav.* 3(3-4) (1978) 235-41. [https://doi.org/10.1016/0306-4603\(78\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0306-4603(78)90024-2).
- [231] M.K. Edwards, P.D. Loprinzi, *Affective Responses to Acute Bouts of Aerobic Exercise, Mindfulness Meditation, and Combinations of Exercise and Meditation: A Randomized Controlled Intervention*, *Psychol. Rep.* 122 (2019) 465-484. <https://doi.org/10.1177/0033294118755099>.
- [232] C. Zapata Valencia, P. Granada Echeverry, J. Giraldo, *Caracterización de la población Risaraldense con relación a la práctica de la actividad física: 2006*, *Rev. Médica Risaralda.* 13 (2007) 5. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5030424.pdf>.
- [233] V. Arijá, F. Fargas, G. March, S. Abajo, J. Basora, J. Canals, B. Ribot, E. Aparicio, N. Serrat, C. Hernández-Martínez, N. Aranda, *Adapting iron dose supplementation in pregnancy for greater effectiveness on mother and child health: Protocol of the ECLIPSES randomized clinical trial*, *BMC Pregnancy Childbirth.* 14 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-33>.
- [234] F. David, B. Tienpont, M.S. Klee, P. Tripp, *Automated Sample Preparation for Profiling Fatty Acids in Blood and Plasma using the Agilent 7693.*, s. f. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4822EN.pdf>.
- [235] M. Zeng, H. Cao, *Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1083 (2018) 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.040>.
- [236] F.I. Mowbray, S.M. Fox-wasylyshyn, M.M. El-masri, *Univariate Outliers : A Conceptual Overview for the Nurse Researcher*, *Can. J. Nurs. Res.* 0 (2018) 1-7. <https://doi.org/10.1177/0844562118786647>.
- [237] D. Cousineau, S. Chartier, *Outliers detection and treatment : a review.*, *Int. J. Psychol. Res.* 3 (2011) 58-67. <https://doi.org/10.21500/20112084.844>.
- [238] E. Aparicio, C. Martín-Grau, C. Bedmar, N.S. Orus, J. Basora, *Maternal Factors Associated with Levels of Fatty Acids , Specifically n-3 PUFA during Pregnancy : ECLIPSES Study*, *Nutrients.* 13 (2021) 317. <https://doi.org/10.3390/nu13020317>.

- [239] E. Aparicio, C. Martín-Grau, C. Hernández-Martínez, N. Voltas, J. Canals, V. Arija, Changes in fatty acid levels (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) during pregnancy, *BMC Pregnancy Childbirth*. 21 (2021) 778. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04251-0>.
- [240] C. Martín-Grau, R. Deulofeu, N.S. Orus, V. Arija, Trimester-specific reference ranges for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in serum of pregnant women: A cohort study from the eclipses group, *Nutrients*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13114037>.
- [241] C. Martín-Grau, A. Díaz-López, E. Aparicio, V. Arija, Short-Chain Fatty Acid Reference Ranges in Pregnant Women from a Mediterranean Region of Northern Spain: ECLIPSES Study, *Nutrients*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/nu14183798>.
- [242] E. Kish-Trier, E.L. Schwarz, M. Pasquali, T. Yuzyuk, Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS, *Clin. Mass Spectrom.* 2 (2016) 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2016.12.001>.
- [243] M. Zeng, H. Cao, Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. B*. 1083 (2018) 137-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.040>.
- [244] M.P. Bonham, E.M. Duffy, J.M.W. Wallace, P.J. Robson, G.J. Myers, P.W. Davidson, T.W. Clarkson, C.F. Shamlaye, J.J. Strain, Habitual fish consumption does not prevent a decrease in LCPUFA status in pregnant women (the Seychelles Child Development Nutrition Study), *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids*. 78 (2008) 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2008.04.005>.
- [245] C. Gómez, L.M. Bermejo, V. Loria, Gómez, C.; Bermejo, L.M.; Loria, V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: Nutritional recommendations., *Nutr. Hosp.* 26 (2011) 323-329. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.2.5117>.
- [246] G. Burdge, α -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 7 (2004) 137-144. <https://doi.org/10.1097/00075197-200403000-00006>.
- [247] C.J.R. Hibbeln, P. Spiller, J.T. Brenna, J. Golding, B.J. Holub, W.S. Harris, P. Kris-Etherton, B. Lands, S.L. Connor, G. Myers, J.J. Strain, M.A. Crawford, S.E. Carlson, Relationships between seafood consumption during pregnancy and childhood and neurocognitive development: Two systematic reviews, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 151 (2019) 14-36. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.10.002>.
- [248] J. Steenweg-De Graaff, H. Tiemeier, A. Ghassabian, J. Rijlaarsdam, V.W.V. Jaddoe, F.C. Verhulst, S.J. Roza, Maternal Fatty Acid Status during Pregnancy and Child Autistic Traits : the Generation R Study, *Am. J. Epidemiol.* 183 (2016) 792-799. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv263>.
- [249] J. Julvez, M. Méndez, S. Fernandez-Barres, D. Romaguera, J. Vioque, S. Llop, J. Ibarluzea, M. Guxens, C. Avella-Garcia, A. Tardón, I. Riaño, A. Andiarena, O. Robinson, V. Arija, M. Esnaola, F. Ballester, J. Sunyer, Maternal consumption of seafood in pregnancy and child neuropsychological development: A longitudinal study based on a population with high consumption levels, *Am. J. Epidemiol.* 183 (2016) 169-182. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv195>.
- [250] M.W. Markhus, J.D. Rasinger, M.K. Malde, L. Frøyland, S. Skotheim, H.C. Braarud, K.M.

- Stormark, I.E. Graff, Docosaehaenoic acid status in pregnancy determines the maternal docosaehaenoic acid status 3-, 6- and 12 months postpartum. Results from a longitudinal observational study, *PLoS One*. 10 (2015) 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136409>.
- [251] Y. Li, H. tian Li, L. Trasande, H. Ge, L. xia Yu, G. sheng Xu, M. xi Bai, J. meng Liu, DHA in pregnant and lactating women from Coastland, Lakeland, and Inland areas of China: Results of a DHA Evaluation in Women (DEW) study, *Nutrients*. 7 (2015) 8723-8732. <https://doi.org/10.3390/nu7105428>.
- [252] C.L. Rodríguez-Bernal, R. Ramón, J. Quiles, M. Murcia, E.M. Navarrete-Muñoz, J. Vioque, F. Ballester, M. Rebagliato, Dietary intake in pregnant women in a Spanish Mediterranean area: As good as it is supposed to be?, *Public Health Nutr*. 16 (2013) 1379-1389. <https://doi.org/10.1017/S1368980012003643>.
- [253] M. Stråvik, K. Jonsson, O. Hartvigsson, A. Sandin, A.E. Wold, A.S. Sandberg, M. Barman, Food and nutrient intake during pregnancy in relation to maternal characteristics: Results from the nice birth cohort in northern Sweden, *Nutrients*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11071680>.
- [254] C. Jardí, E. Aparicio, C. Bedmar, N. Aranda, S. Abajo, G. March, J. Basora, V. Arija, T.E. Study Group, Food Consumption during Pregnancy and Post-Partum. ECLIPSES Study, *Nutrients*. 11 (2019) 1-16. <https://doi.org/10.3390/nu11102447>.
- [255] C. Savard, S. Lemieux, É. Carbonneau, V. Provencher, C. Gagnon, J. Robitaille, A.S. Morisset, Trimester-specific assessment of diet quality in a sample of Canadian pregnant women, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijerph16030311>.
- [256] T.M. Nordgren, E. Lyden, A. Anderson-Berry, C. Hanson, Omega-3 fatty acid intake of pregnant women and women of childbearing age in the united states: Potential for deficiency?, *Nutrients*. 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/nu9030197>.
- [257] J. Lepsch, J.S. Vaz, J.D. Moreira, T.J.P. Pinto, M. Soares-Mota, G. Kac, Food frequency questionnaire as an indicator of the serum composition of essential n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in early pregnancy, according to body mass index, *J. Hum. Nutr. Diet*. 28 (2015) 85-94. <https://doi.org/10.1111/jhn.12225>.
- [258] B. Ribot, R. Isern, C. Hernández-Martínez, J. Canals, N. Aranda, V. Arija, Impacto del tabaquismo, la exposición pasiva al tabaco y el dejar de fumar sobre la salud del recién nacido., *Med Clin*. 143 (2014) 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.09.040>.
- [259] A.M. Houwelingen, G. Hornstra, Relation between birth order and the maternal and neonatal docosaehaenoic acid status., *Eur J Clin Nutr*. 51 (1997) 548-553. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600444>.
- [260] A.M. Van Houwelingen, A. Kester, A. Hasaart, T. De Jong, G. Hornstra, Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status., *Br. J. Nutr*. 74 (1995) 55-68. <https://doi.org/10.1079/BJN19950106>.
- [261] N. Wilson, E. Mantzioris, P. Middleton, B. Muhlhausler, Gestational age and maternal status of DHA and other polyunsaturated fatty acids in pregnancy: A systematic review., *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids*. 144 (2019) 16-31. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.04.006>.

- [262] J. Kikut, N. Komorniak, M. Ziętek, J. Palma, M. Szczuko, Inflammation with the participation of arachidonic (AA) and linoleic acid (LA) derivatives (HETEs and HODEs) is necessary in the course of a normal reproductive cycle and pregnancy, *J. Reprod. Immunol.* 141 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103177>.
- [263] M. Szczuko, J. Kikut, N. Komorniak, J. Bilicki, Z. Celewicz, M. Ziętek, The role of arachidonic and linoleic acid derivatives in pathological pregnancies and the human reproduction process, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21249628>.
- [264] S.A. Lagerstedt, D.R. Hinrichs, S.M. Batt, M.J. Magera, P. Rinaldo, J.P. McConnell, Quantitative determination of plasma C8-C26 total fatty acids for the biochemical diagnosis of nutritional and metabolic disorders, *Mol. Genet. Metab.* 73 (2001) 38-45. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3170>.
- [265] S. Sergeant, I. Ruczinski, P. Ivester, T.C. Lee, T.M. Morgan, B.J. Nicklas, R.A. Mathias, F.H. Chilton, Impact of methods used to express levels of circulating fatty acids on the degree and direction of associations with blood lipids in humans, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 251-261. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004341>.
- [266] R.J.T. Mocking, J. Assies, A. Lok, H.G. Ruhé, M.W.J. Koeter, I. Visser, C.L.H. Bockting, A.H. Schene, Statistical methodological issues in handling of fatty acid data: Percentage or concentration, imputation and indices, *Lipids.* 47 (2012) 541-547. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3665-2>.
- [267] Y. Hu, T. Tanaka, J. Zhu, W. Guan, J.H.Y. Wu, B.M. Psaty, B. McKnight, I.B. King, Q. Sun, M. Richard, A. Manichaikul, A.C. Frazier-Wood, E.K. Kabagambe, P.N. Hopkins, J.M. Ordovas, L. Ferrucci, S. Bandinelli, D.K. Arnett, Y.D.I. Chen, S. Liang, D.S. Siscovick, M.Y. Tsai, S.S. Rich, M. Fornage, F.B. Hu, E.B. Rimm, M.K. Jensen, R.N. Lemaitre, D. Mozaffarian, L.M. Steffen, A.P. Morris, H. Li, X. Lin, Discovery and fine-mapping of loci associated with MUFAs through trans-ethnic meta-analysis in Chinese and European populations, *J. Lipid Res.* 58 (2017) 974-981. <https://doi.org/10.1194/jlr.P071860>.
- [268] C. Voltolini, S. Battersby, S.L. Etherington, F. Petraglia, J.E. Norman, H.N. Jabbour, A novel antiinflammatory role for the short-chain fatty acids in human labor, *Endocrinology.* 153 (2012) 395-403. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1457>.
- [269] P. Grace-farfaglia, H. Frazier, M.D. Iversen, Essential Factors for a Healthy Microbiome : A Scoping Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19 (2022) 8361. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph19148361>.
- [270] C.M. Mitchell, B.M. Davy, M.W. Hulver, A.P. Neilson, B.J. Bennett, K.P. Davy, Does Exercise Alter Gut Microbial Composition? A Systematic Review, *Med. Sci. Sports Exerc.* 51 (2019) 160-167. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001760>.
- [271] H. V. Lin, A. Frassetto, E.J. Kowalik, A.R. Nawrocki, M.M. Lu, J.R. Kosinski, J.A. Hubert, D. Szeto, X. Yao, G. Forrest, D.J. Marsh, Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms, *PLoS One.* 7 (2012) 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035240>.
- [272] B.T. Layden, A.R. Angueira, M. Brodsky, V. Durai, W.L. Lowe, Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets, *Transl. Res.* 161 (2013) 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.10.007>.
- [273] S. Sergeant, C.E. Hugenschmidt, M.E. Rudock, J.T. Ziegler, P. Ivester, H.C. Ainsworth, D. Vaidya, L.D. Case, C.D. Langefeld, B.I. Freedman, D.W. Bowden, R.A. Mathias, F.H. Chilton, Differences in arachidonic acid levels and fatty acid desaturase (FADS) gene

variants in African Americans and European Americans with diabetes or the metabolic syndrome, Br. J. Nutr. 107 (2012) 547-555.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511003230>.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo.

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

INSTRUCCIONES PARA CUMPLIMENTARLO

Este cuestionario le pregunta sobre la frecuencia con la que usted consume **habitualmente** determinados alimentos.

Usted ha de apuntar el **número de veces a la semana ó al mes** que consume los alimentos enumerados en la pagina siguiente.

Algunos ejemplos para rellenar el cuestionario:

- Si consume el alimento frecuentemente, ponga en la columna de **LA SEMANA** el número de veces: **1-2-3-4-5-6** (cuando es alguna vez a la semana).
7 (cuando es diariamente)
8-9-10-11...(cuando es varias veces al dia)

Piense siempre en sumar el consumo de todas las comidas del dia (desayuno, comer, merendar, cenar, otras..). Asi,si toma todos los dias leche para desayunar y alguna vez a la semana para cenar: $7+4=11$ veces a la semana.

- Si consume el alimento con poca frecuencia, ponga en la columna del **MES** cuantas veces: **1-2-3**
- Si no lo consume nunca ó casi nunca, deje la casilla en blanco, sin poner nada.

Ejemplo: Un señor desayuna habitualmente un vaso de leche (7 veces) y madalenas (7 veces) y para cenar a veces toma leche (4 veces) y a veces toma yogourt (3 veces) de postre. Además, toma pescado algunas veces a la semana para comer (2 veces) y otras veces para cenar (4 veces). Las legumbres las consume alguna vez al mes (aproximadamente 4 veces). Si no come nunca un alimento dejarlo en blanco, sin contestar nada.

Este consumo se apuntaria de la siguiente manera:

LISTADO DE ALIMENTOS	CUANTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche	11	
Yogourt	3	
Bizcocho,madalenas.	7	
...		
Pescado	6	
...		
Legumbres		4
Queso de régimen		

Cuestionario validado. Trinidad I, Fernandez J, Cucó G, Biarnés E, Arija V. Validation of a short questionnaire on frequency of dietary intake: reproducibility and validity. Nutr Hosp. 2008;23:242-52.

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

LISTADO DE ALIMENTOS	CUANTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche		
Yogourt		
Chocolate:tableta,bombones,Kit-Kat,Mars...		
Cereales inflados de desayuno ("Corn-Flakes" "Kellog's")		
Galletas tipo "maria"		
Galletas con chocolate,crema...		
Madalenas , bizcocho		
Ensamada,Donut,Croissant		
	A LA SEMANA	AL MES
Ensalada:Lechuga,tomate,escarola....		
Judias verdes,acelgas,espinacas		
Verduras de guarnición:berengena,calabacin,champiñon..		
Patatas al horno,fritas o hervidas		
Legumbres:lentejas,garbanzos,alubias..		
Arroz blanco,paella		
Pasta:fideos,macarrones,espaguetis...		
Sopas y cremas		
	A LA SEMANA	AL MES
Huevos		
Pollo o codorniz		
Temera,cerdo,cordero (bistec,empanada)		
Carne picada: longaniza,hamburguesa		
Pescado blanco: merluza,mero..		
Pescado azul: sardinas,atún,salmón....		
Marisco:mejillones,gambas,langostinos,pulpo,calamares...		
Croquetas, empanadillas, pizza		
Pan (bocadillos,en comidas)		
	A LA SEMANA	AL MES
Jamón salado, dulce ,embutidos		
Queso blanco o fresco (Burgos,...) o bajo en calorías		
Otros quesos curados o semicurados,cremosos		
	A LA SEMANA	AL MES
Frutas citricas:Naranja,mandarina		
Otras frutas:Manzana,pera,melocotón,aibaricoque,plátano		
Frutas en conserva(en almibar)		
Zumos de fruta natural		
Zumos de fruta comercial		
Frutos secos:cacahuets,avellanas,almendras		
Postres lácteos: natillas,flan,cuajada		
Pasteles de crema y chocolate		
Bolsas de aperitivos ("chips", "chetos", "fritos"...)		
Golosinas:caramelos,gominolas...		
Helados : <i>en verano/en invierno</i>	<i>En verano/en invierno</i>	<i>En verano/en invierno</i>
	A LA SEMANA	AL MES
Bebidas azucaradas ("coca-cola", "Fanta"...)		
Bebidas bajas en calorías (coca-cola light...)		
Vino, sangria		
Cerveza		
Cerveza sin alcohol		
Bebidas destiladas: (Whisky, ginebra, conyac,...)		

Indique con una X la respuesta que usted crea mas adecuada:

- 1.- Que tipo de leche toma habitualmente?: Entera __ Semidescremada __ Descremada __
- 2.- Que tipo de yogourt toma habitualmente? a) Natural __ b) Natural descremado __
c) De sabores __ d) De sabores descremado __
e) Con trozos de frutas __ f) Con trozos de fruta descremado __
- 3.- Que tipo de pan toma habitualmente?: Blanco __ Integral __
- 4.- Se pone tomate y aceite en los bocadillos?: Siempre __ Habitualmente __ Alguna vez __ Casi nunca __
- 5.- Se pone mantequilla o margarina en las tostadas?: Siempre __ Habitualmente __ Alguna vez __ Casi nunca __
- 6.- Con que frecuencia utiliza
- Verduras frescas?: Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- Verduras congeladas?: Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- Verduras pre-cocinadas?: Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- Legumbres crudas?: Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- Legumbres precocinadas?: Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- 6.- En la mesa, se añade sal a las comidas?
- Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __
- 7.- Como definiría su apetito? Mucho __ Bastante __ Normal __ Poco __ Nada __
- 8.- Hace algún tipo de régimen dietético? No __ / Si __ Cual? _____
- Desde cuando?
- Quien se lo ha prescrito? a) Usted mismo
b) Un amigo
c) Un profesional sanitario
- 9.-Utiliza el comedor de la empresa? No __ / Sí __ Cuantas veces a la semana? _____

Anexo 2. Cuestionario de actividad física.

QÜESTIONARI D'ACTIVITAT FÍSICA PER LA MARE

Por favor conteste todas las preguntas (marque 0 en caso de no realizar la actividad correspondiente)

1a. En los últimos 7 días, ¿cuántos **días** ha realizado **actividad física vigorosa^a** como levantar pesos pesados, cavar, trabajo intenso en la construcción, clases de aeróbic o similar o bicicleta a ritmo rápido? Piense *solamente* en aquella actividad física que duró **como mínimo 10 minutos**

Días a la semana _____

1b. En total, ¿cuánto **tiempo** suele estar haciendo **actividad física vigorosa^a** en uno de estos días?

Horas _____ **Minutos** _____

2a. De nuevo, piense *sólo* en aquella actividad física que duró como **mínimo 10 minutos**. En los últimos 7 días, ¿cuántos días ha realizado **actividad física moderada^b** como transportar pesos ligeros, bicicleta a ritmo regular, dobles de tenis? No tenga en cuenta el caminar.

Días a la semana _____

2b. En total, ¿cuánto **tiempo** suele estar haciendo **actividad física moderada^b** en uno de estos días?

Horas _____ **Minutos** _____

3a. En los últimos 7 días, ¿cuántos **días ha caminado^c** **al menos 10 minutos**? Cuente si camina en su trabajo y en casa, para ir de un sitio a otro y si camina en su tiempo de ocio, como deporte, o para hacer ejercicio o para pasar el tiempo.

Días a la semana _____

3b. En total, ¿cuánto tiempo suele estar caminando en uno de estos días?

Horas _____ **Minutos** _____

4. En los últimos 7 días, ¿cuánto **tiempo** en total ha estado **sentado^d** en un día **laborable**? Incluye el tiempo sentado(a) en el trabajo, en casa, estudiando, y en su tiempo libre. Esto puede incluir tiempo sentado(a) en un escritorio, visitando amigos(as), leyendo o permanecer sentado(a) o acostado(a) mirando televisión

Horas _____ **Minutos** _____

^a Actividades **vigorosas** son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal.

^b Actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hace respirar algo más fuerte que lo normal.

Anexo 3. Publicaciones en congresos.

PUBLICACIÓN 1:

- **Tipo de publicación:** póster.
- **Congreso:** XV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en formato virtual del 7 al 13 de noviembre de 2021.

Factores maternos relacionados con los niveles séricos de ácidos grasos omega-3 durante el embarazo. Estudio ECLIPSES

Martín-Grau, C.^{1,2}, Aparicio, E.², Serrat-Orús, N.¹, Montolio Breva, S.¹, Rivera Moreno, MV.¹, Galofré Giralt, M.¹, Arija, V.².

¹Laboratorio de Análisis Clínicos del Institut Català de la Salut (ICS) Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre – Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, España.

²Departamento de Nutrición y Salud Pública. Grupo de investigación en Nutrición y Salud Mental (NUTRISAM), Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

Introducción

Una concentración óptima de ácidos grasos (AG) durante el embarazo es esencial para la salud materno-fetal. Especialmente los AG omega-3, como DHA y EPA, resultan beneficios para el correcto desarrollo cognitivo y visual del feto⁽¹⁾. El objetivo de este estudio es identificar los factores socioeconómicos y de hábitos de vida maternos que pueden influir en los niveles séricos de AG omega-3 durante la gestación.

Material y métodos

Se realizó un estudio longitudinal con 479 mujeres embarazadas. Criterios de inclusión: mayores de 18 años sin antecedentes de enfermedad grave que comprometiera el estado nutricional de la gestante. Se obtuvieron datos relacionados con la edad, índice de masa corporal (IMC <25/25-30/>30 kg/m²), nivel educativo (primaria/secundaria/universitario), consumo de tabaco, actividad física (sedentaria/activa) y consumo de alimentos (carne magra y procesados; pescado y derivados; frutas; verduras; bollería; aceite de oliva). Se recogió muestra de suero durante el primer trimestre (T1, semana 12) y tercer trimestre (T3, semana 36) de embarazo para el análisis de los AG omega-3 poliinsaturados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (7890A GC acoplado a QqQ 7000 Series®, Agilent Technologies). Para el análisis estadístico, se utilizó el programa SPSS versión 25.0 para Windows. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

El análisis de regresión lineal mostró una correlación significativa con los siguientes factores maternos: a mayor edad (>30 años) y mayor nivel educativo (universitario) de la gestante, los niveles de EPA y DHA fueron mayores en T1 y T3 ($p < 0,05$). En cuanto a la dieta, el consumo de pescado y productos derivados del mar durante la gestación, aumentaron los niveles de EPA en ambos trimestres ($p < 0,05$), no obstante, sólo se obtuvo un aumento significativo de DHA durante T1. El consumo de tabaco se asoció con concentraciones bajas de DHA en T1 ($p < 0,05$).

Conclusiones

Determinados factores maternos como un nivel educativo superior, mayor edad de la gestante, consumo de pescado y derivados y/o no fumar durante el embarazo se asociaron con mayores concentraciones de AG omega-3 en ambos trimestres del embarazo. Por consiguiente, la intervención nutricional ⁽²⁾ y los consejos para dejar de fumar dirigidos a las mujeres embarazadas, especialmente a las menores de 25 años y con bajo nivel educativo, podrían mejorar el perfil sérico de AG y beneficiar su salud ⁽³⁾. En futuros estudios se profundizará sobre los hallazgos obtenidos para intentar esclarecer su relación con la salud de la gestante y la del feto.

Bibliografía

1. Koletzko, B.; Godfrey, K.M.; Poston, L.; Szajewska, H.; Van Goudoever, J.B.; DeWaard, M.; Brands, B.; Grivell, R.M.; Deussen, A.R.; Dodd, J.M.; et al. Nutrition during pregnancy, lactation and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: The early nutrition project recommendations. *Ann. Nutr. Metab.* **2019**, *74*, 93–106.
2. Jardí, C.; Aparicio, E.; Bedmar, C.; Aranda, N.; Abajo, S.; March, G.; Basora, J.; Arija, V. Food consumption during pregnancy and post-partum. ECLIPSES Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2447.
3. Aparicio E., **Martín-Grau, C.**, Bedmar C., Serrat Orus N., Basora J., Arija V., 2021. Maternal factors associated to the levels of fatty acids and specifically n-3 PUFA during pregnancy. ECLIPSES study. *Nutrients*, *13*, 317: 1-19.



FACTORES MATERNOS RELACIONADOS CON LOS NIVELES SÉRICOS DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 DURANTE EL EMBARAZO. ESTUDIO ECLIPSES.



Martín-Grau, C.^{1,2}, Aparicio, E.², Serrat-Orús, N.¹, Montolio Brea, S.¹, Rivera Moreno, MV.¹, Galofré Giral, M.¹, Arijia, V.².

¹Laboratorio de Análisis Clínicos del Institut Català de la Salut (ICS) Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre – Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, España.

²Departamento de Nutrición y Salud Pública. Grupo de Investigación en Nutrición y Salud Mental (NUTRISAM), Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

1. INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS:

Una concentración óptima de ácidos grasos (AGs) durante el embarazo es esencial para la salud materno-fetal. Especialmente los AGs omega-3, como DHA y EPA, resultan beneficios para el correcto desarrollo cognitivo y visual del feto⁽¹⁾. El objetivo de este estudio es identificar los factores socioeconómicos y de hábitos de vida maternos que pueden influir en los niveles séricos de AGs omega-3 durante la gestación.

3. MATERIAL y MÉTODOS

Se realizó un estudio longitudinal con 479 mujeres embarazadas. Criterios de inclusión: mayores de 18 años sin antecedentes de enfermedad grave que comprometiera el estado nutricional de la gestante. Se obtuvieron datos relacionados con la edad, índice de masa corporal (IMC <25/25-30/>30 kg/m²), nivel educativo (primaria/secundaria/universitario), consumo de tabaco, actividad física (sedentaria/activa) y consumo de alimentos (carne magra y procesados, pescado y derivados; frutas; verduras; bollería; aceite de oliva). Se recogió muestra de suero durante el primer trimestre (T1, semana 12) y tercer trimestre (T3, semana 36) de embarazo para el análisis de los AGs omega-3 poliinsaturados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (7890A GC acoplada a QqQ 7000 Series®, Agilent Technologies). Para el análisis estadístico, se utilizó el programa SPSS versión 25.0 para Windows. p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 1: Regresión múltiple lineal de los factores maternos relacionados con el perfil sérico de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) durante el primer y tercer trimestre de gestación.

	Perfil sérico de AGs durante primer trimestre			Perfil sérico de AGs durante el tercer trimestre		
	B	ES	P	B	ES	P
Eicosapentaenoico (EPA)						
Constante	25.13	7.86	0.002	16.46	6.84	0.017
Nivel educativo						
Primaria	Ref	-	-	Ref	-	-
Secundaria	7.65	3.32	0.022	0.49	2.62	0.851
Universitario	9.69	3.53	0.006	6.87	2.83	0.016
Grupo de Edad						
<25 años	Ref	-	-	Ref	-	-
25-30 años	3.75	4.38	0.392	6.79	3.24	0.038
≥30 años	9.93	4.22	0.019	8.80	3.11	0.005
IMC (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥25 kg/m ²)	-1.21	2.80	0.665	0.82	2.60	0.751
Actividad física (0: sedentaria, 1: activa)	-9.58	4.51	0.035	-2.02	2.51	0.421
Consumo de tabaco (0: no fumadora, 1: fumadora)	-6.61	3.72	0.076	2.85	2.70	0.292
Consumo de alcohol (0: no, 1: sí)	-0.86	4.67	0.854	0.61	3.79	0.871
Consumo de pescado y derivados (g/día)	0.15	0.04	0.001	0.14	0.40	<0.001
	R ² _{EXPL} =10.3	F _{18,328} =3.21	P<0.001	R ² _{EXPL} =8.8	F _{18,251} =2.25	P=0.002
Docosahexaenoico (DHA)						
Constante	212.64	22.29	<0.001	241.16	30.48	<0.001
Nivel educativo						
Primaria	Ref	-	-	Ref	-	-
Secundaria	10.29	9.50	0.280	-2.09	11.06	0.850
Universitario	22.45	10.01	0.026	11.54	12.04	0.339
Grupo de Edad						
<25 años	Ref	-	-	Ref	-	-
25-30 años	19.46	12.53	0.121	29.46	13.73	0.033
≥30 años	28.01	12.07	0.021	41.26	13.23	0.002
IMC (0: < 25 kg/m ² , 1: ≥25 kg/m ²)	11.37	7.97	0.154	-4.65	10.77	0.666
Actividad física (0: sedentaria, 1: activa)	-20.06	13.10	0.127	-10.98	11.78	0.352
Consumo de tabaco (0: no fumadora, 1: fumadora)	-39.93	10.65	<0.001	-2.06	11.43	0.857
Consumo de alcohol (0: no, 1: sí)	-18.39	13.34	0.169	-5.11	16.08	0.751
Consumo de pescado y derivados (g/día)	0.34	0.13	0.011	0.223	0.172	0.195
	R ² _{EXPL} =10.20	F _{18,334} =3.22	P<0.001	R ² _{EXPL} =3.6	F _{18,258} =1.52	P=0.084

B, coeficiente no estandarizado; ES, error estandarizado; Ref, referencia categoría de referencia; P, nivel de significancia estadística p> 0.05.

BIBLIOGRAFÍA:

- Koletzko, B.; Godfrey, K.M.; Poston, L.; Szajewska, H.; Van Goudoever, J.B.; DeWaard, M.; Brands, B.; Grivell, R.M.; Deussen, A.R.; Dodd, J.M.; et al. Nutrition during pregnancy, lactation and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: The early nutrition project recommendations. Ann. Nutr. Metab. 2019, 74, 93–106.
- Jardi, C.; Aparicio, E.; Bedmar, C.; Aranda, N.; Abajo, S.; March, G.; Basora, J.; Arijia, V. Food consumption during pregnancy and post-partum. ECLIPSES Study. Nutrients 2019, 11, 2447.
- Aparicio E., Martín-Grau, C., Bedmar C., Serrat Orus N., Basora J., Arijia V., 2021. Maternal factors associated to the levels of fatty acids and specifically n-3 PUFA during pregnancy. ECLIPSES study. Nutrients, 13, 317: 1-19.

4. RESULTADOS

El análisis de regresión lineal (tabla 1) mostró una correlación significativa con los siguientes factores maternos: a mayor edad (>30 años) y mayor nivel educativo (universitario) de la gestante, los niveles de EPA y DHA fueron mayores en T1 y T3 (p<0,05). En cuanto a la dieta, el consumo de pescado y productos derivados del mar durante la gestación, aumentaron los niveles de EPA en ambos trimestres (p<0,05), no obstante, sólo se obtuvo un aumento significativo de DHA durante T1. El consumo de tabaco se asoció con concentraciones bajas de DHA en T1 (p<0,05).

5. CONCLUSIONES

Determinados factores maternos como un nivel educativo superior, mayor edad de la gestante, consumo de pescado y derivados y/o no fumar durante el embarazo se asociaron con mayores concentraciones de AGs omega-3 en ambos trimestres del embarazo. Por consiguiente, la intervención nutricional⁽²⁾ y los consejos para dejar de fumar dirigidos a las mujeres embarazadas, especialmente a las menores de 25 años y con bajo nivel educativo, podrían mejorar el perfil sérico de AGs y beneficiar su salud⁽³⁾. En futuros estudios se profundizará sobre los hallazgos obtenidos para intentar esclarecer su relación con la salud de la gestante y la del feto.

