

Evaluación del efecto del consumo de salmón sobre el estado del ácidos grasos omega-3, estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante el embarazo

Cruz Erika García Rodríguez



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cruz Erika García Rodríguez
D.L.: GR 1900-2012
ISBN: 978-84-9028-058-4

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE SALMÓN SOBRE EL
ESTADO DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, ESTRÉS OXIDATIVO, SISTEMA DE
DEFENSA ANTIOXIDANTE Y BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y DE
HOMEOSTASIS VASCULAR DURANTE EL EMBARAZO**

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Granada presentada por:

Cruz Erika García Rodríguez

Bajo la dirección de los doctores:

Ángel Gil Hernández

Maria D. Mesa García

Concepción M. Aguilera García

Granada, 23 de Enero de 2012

D. Ángel Gil Hernández, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Dña. María D. Mesa García, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Dña. Concepción M. Aguilera García, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Informan:

Que el trabajo titulado “**Evaluación del efecto del consumo de salmón sobre el estado de ácidos grasos omega-3, estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante el embarazo**” ha sido realizado por Cruz Erika García Rodríguez bajo su dirección, y que reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el 23 de Enero de 2012.

Dr. Ángel Gil Hernández

Dra. María D. Mesa García

Dra. Concepción M. Aguilera García

D. Alberto Vargas Morales, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Informa:

Que el trabajo titulado **“Evaluación del efecto del consumo de salmón sobre el estado de ácidos grasos omega-3, estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante el embarazo”** ha sido realizado por Cruz Erika García Rodríguez en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, donde están ubicados los laboratorios del grupo de investigación CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicaciones terapéuticas, perteneciente a este Departamento.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el 23 de Enero de 2012

Dr. Alberto Vargas Morales

Este trabajo ha sido financiado por el VI Programa Marco de la Unión Europea (UE), denominado “Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers” (AQUAMAX).



Además, durante la realización de esta tesis, la Lda. Cruz Erika García Rodríguez ha sido beneficiaria de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU), otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España.



Agradecimientos

Quiero agradecer la realización del presente trabajo de investigación a su entidad financiadora, así como al personal del *Princess Anne Hospital de Southampton* por su apoyo técnico, fundamental en la recolección y el análisis de las muestras.

Debo también agradecer la participación de las voluntarias, sin las cuales este estudio no podría haberse llevado a cabo.

A Ángel, Chiqui y MD, les quiero agradecer todo lo aprendido durante estos cuatro años, su trabajo, experiencia e interés en todo momento.

A Samar y Johanna, por permitirme trabajar en su grupo de investigación durante mi estancia en Uppsala y a mi “familia sueca”, por estar ahí durante este periodo.

Por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento y simpatía a todos mis compañeros y amigos, siempre por su incondicional apoyo y ayuda y, por supuesto, a mi familia.

Abreviaturas

A

AA	Ácido araquidónico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AG	Ácido graso
AGDI	Ácido graso diinsaturado
AGE	Ácido graso esencial
AGL	Ácido graso libre
AGI	Ácido graso insaturado
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGPI-CL	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
AGS	Ácido graso saturado
ALA	Ácido α -linolénico
ANOVA	Análisis de la varianza
AQUAMAX	Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers

B

β -O	Beta-oxidación
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BMI	Índice de masa corporal

C

CAT	Catalasa
CoQ	Coenzima Q/ubiquinol
COX	Cicloxigenasa
Cu	Cobre
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y cinc

D

Δ_5	Δ_5 desaturasa
------------	-----------------------

$\Delta 6$	$\Delta 6$ desaturasa
DHA	Ácido docosaheptaenoico
Di-homo- γ -LA	Di-homo- γ -linolénico
DTT	DL-ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenoico

E

E	Elongasa
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Análisis inmunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Especie reactiva de oxígeno

F

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FFQ	Cuestionario de frecuencia de alimentos

G

GR	Glutación reductasa
GPx	Glutación peroxidasa
GS·	Radical tiilo
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado

H

Hb	Hemoglobina
HDL	Colesterol de lipoproteína de alta densidad
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HETE	Hidróxido del ácido eicosatetraenoico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
4-HNE	4-Hidroxinonenal

HOMA-IR	Modelo de evaluación homeostático
5-HPETE	5-Hidroperóxido del ácido eicosatetraenoico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-EC	HPLC acoplado a un detector electroquímico

I

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
II	Índice de insaturación
IL	Interleuquina
8-Iso-PGF ₂ α	8-iso-prostaglandina F ₂ α

L

λ	Longitud de onda
LA	Ácido linoleico
LDLc	Colesterol de lipoproteína de baja densidad
LOX	Lipoxigenasa
LPO	Peróxidos lipídicos
LT	Leucotrieno
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄

M

MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteasa de la matriz
Mn	Manganeso
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MPA	Ácido metafosfórico

N

NADP ⁺	Nicotinamida adenindinucleótido-fosfato
-------------------	---

NADPH	Nicotinamida adeninucleótido-fosfato reducido
NGF	Factor de crecimiento nervioso

O

O ₂	Oxígeno
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH·	Radical hidroxilo
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina
OPA	Ortoftalaldehído

P

PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBS	Tampón salino fosfatado
PC	Fosfatidilcolina
PCB	Policlorobifenilos similares a las dioxinas
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α

R

RBC	Eritrocitos/glóbulos rojos
-----	----------------------------

S

SAPE	Streptavidina-ficoeritrina
Se	Selenio
Se-GPx	Glutación peroxidasa dependiente de selenio
SEM	Error estándar de la media
SiPS	The Salmon in Pregnancy Study
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales

T

TAG	Triacilglicerol
t-BOOH	Hidroperóxido tert-butílico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
tPAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno total-1
TX	Tromboxano
U	
UV	Ultravioleta
V	
V	Voltios
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
W	
WHO	Organización Mundial de la Salud
Z	
Zn	Cinc

Índice

RESUMEN	1
ARTÍCULOS	17
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	21
INTRODUCCIÓN	27
Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados durante la gestación	29
<i>Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la nutrición humana.....</i>	<i>29</i>
<i>Papel de la madre en el aporte de ácidos grasos poliinsaturados al feto durante la gestación</i>	<i>31</i>
<i>Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 durante la gestación.....</i>	<i>32</i>
Estrés oxidativo asociado a la gestación	34
<i>Radicales libres</i>	<i>34</i>
<i>Cuantificación del estrés oxidativo</i>	<i>34</i>
Peróxidos lipídicos	35
Isoprostanos	35
8-Hidroxi-2' desoxiguanosina.....	36
Mecanismos antioxidantes	37
<i>Mecanismos enzimáticos.....</i>	<i>37</i>
<i>Mecanismos no enzimáticos</i>	<i>39</i>
Glutación	39
Vitaminas	39
Ubiquinol	40
Oligoelementos	40
Estrés oxidativo y embarazo.....	40
Perfil de adipoquinas y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante la gestación	42
Cambios metabólicos durante el embarazo	42
Adipoquinas	44
Biomarcadores de inflamación	45
Biomarcadores de homeostasis vascular	46
Ácidos grasos e inflamación	47

SUJETOS Y METODOLOGÍA	55
Sujetos	55
Diseño experimental	57
Consideraciones éticas	57
Datos de la dieta	57
<i>Salmón hecho a medida</i>	57
Recolección de datos y muestras	59
Determinación del perfil de ácidos grasos del plasma	61
Determinación del perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos	61
Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	63
<i>Isoprostanos en orina</i>	63
<i>Peróxidos lipídicos plasmáticos</i>	63
<i>8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en orina</i>	64
<i>Creatinina en orina</i>	64
Evaluación del sistema de defensa antioxidante	64
<i>Actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante</i> <i>en eritrocitos</i>	65
<i>Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos</i>	67
<i>Concentración de vitaminas</i>	68
Análisis bioquímicos	69
Determinación de adipoquinas y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular	69
Análisis estadísticos	71
RESULTADOS	73
Características generales de las mujeres embarazadas y de sus hijos.....	75
Características del embarazo	75
Ingestas de pescado, EPA y DHA	76
EPA y DHA en plasma materno y de cordón	78
Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos	79
Ácidos grasos en membranas de eritrocitos maternos y de sangre de cordón	81
<i>Correlación entre los ácidos grasos de las membranas de eritrocitos</i> <i>maternos y de sangre de cordón</i>	81
Biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y orina maternos	84
Sistema de defensa antioxidante	86

Sistema de defensa antioxidante materno	86
<i>Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos maternos</i>	<i>86</i>
<i>Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos maternos</i>	<i>87</i>
<i>Concentración de vitaminas y otros factores liposolubles en plasma materno</i>	<i>90</i>
Relaciones entre el sistema de defensa antioxidante materno y de cordón	90
<i>Actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante en eritrocitos maternos y de cordón.....</i>	<i>90</i>
<i>Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos maternos y de cordón.....</i>	<i>90</i>
Correlaciones madre-hijo del sistema de defensa antioxidante enzimático, selenio y glutatión.....	92
<i>Concentración de vitaminas y otros factores liposolubles en plasma materno y de cordón.....</i>	<i>92</i>
Correlaciones madre-hijo de vitaminas y otros factores liposolubles	92
Biomarcadores plasmáticos del metabolismo glucídico y lipídico	93
<i>Plasma materno</i>	<i>93</i>
<i>Plasma materno a las 38 semanas de gestación y de cordón</i>	<i>95</i>
<i>Correlaciones madre-hijo de los parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico y lipídico</i>	<i>97</i>
Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular	97
<i>Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular en plasma materno</i>	<i>98</i>
<i>Adipoquinas</i>	<i>98</i>
<i>Biomarcadores de inflamación</i>	<i>98</i>
<i>Biomarcadores de homeostasis vascular</i>	<i>100</i>
<i>Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular en plasma materno y de cordón.....</i>	<i>102</i>
<i>Adipoquinas</i>	<i>102</i>
<i>Biomarcadores de inflamación</i>	<i>102</i>
Correlaciones madre-hijo de los biomarcadores de inflamación en plasma	103
<i>Biomarcadores de homeostasis vascular</i>	<i>104</i>
Correlaciones madre-hijo de los biomarcadores de homeostasis	

vascular en plasma	103
DISCUSIÓN	107
Características generales del estudio	109
Influencia de la ingesta de salmón sobre el nivel de EPA y DHA durante el embarazo.....	110
Influencia de la ingesta de salmón sobre los niveles de diversos biomarcadores de estrés oxidativo durante el embarazo	114
Influencia de la ingesta de salmón sobre el sistema de defensa antioxidante durante el embarazo	118
Influencia de la ingesta de salmón sobre las relaciones madre-hijo del sistema de defensa antioxidante.....	121
Influencia de la ingesta de salmón sobre las concentraciones plasmáticas de adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante el embarazo.....	123
Influencia de la ingesta de salmón sobre las relaciones madre-hijo de adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular	129
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXOS	159
Índice de Tablas.....	161
Índice de Figuras.....	165
PUBLICACIONES.....	167

Summary

Summary

The present Ph.D. thesis is based on “The Salmon in Pregnancy Study” (SiPS) programme, which is part of the EU Project “Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers” (AQUAMAX). SiPS is the first intervention trial with oily fish (farmed salmon raised using dietary ingredients selected to contain low levels of contaminants), rich in long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids (LC *n*-3 PUFA), during pregnancy, and focuses on pregnant women whose offspring are at high risk of developing atopic diseases. Since sensitization to allergens occurs early in life (Adkins *et al.*, 2004), maternal diet during pregnancy is an important factor, with the potential to influence development of immune responses that predispose to atopy (Prescott *et al.*, 1998). Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 *n*-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 *n*-3), found in oily fish in relatively high amounts, are two biologically active LC *n*-3 PUFA with multiple well-defined anti-inflammatory effects, and are promising candidates for atopic disease prevention (Purasiri *et al.*, 1997; Calder *et al.*, 2000). There is evidence that early fish and LC *n*-3 PUFA exposure lowers the risk of immune dysfunctions like sensitization to allergens (atopy), and allergy and asthma in infancy (Calder *et al.*, 2010; Kremmyda *et al.*, 2011). Thus, increased fish intake during pregnancy could lead to a better health outcome in offspring at risk of developing atopic diseases.

Detailed information on the SiPS and the present Ph.D. work can be found in the following related papers, included in the Annex section:

- **Paper I**

Miles EA, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Frøyland L, Helmersson J, Basu S, **García-Rodríguez CE**, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study-study design, subject characteristics, maternal fish and marine *n*-3 fatty acid intake, and marine *n*-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.

- **Paper II**

García-Rodríguez CE, Helmersson-Karlqvist J, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A, Basu S. Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women? The Salmon in Pregnancy Study. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(11): 2819-2923.

- **Paper III**

García-Rodríguez CE, Mesa MD, Olza J, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Noakes PS, Miles EA, Ramirez-Tortosa MC, Liaset B, Frøyland L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Aguilera CM, Helmersson-Karlqvist J, Godfrey KM, Calder PC, Basu S, Gil A. Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women? *Antioxid Redox Signal* 2012, *in press*.

- **Paper IV**

García-Rodríguez CE, Olza J, Aguilera CM, Mesa MD, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Noakes PS, Miles EA, Godfrey KM, Calder PC, Gil A. Effect of marine *n-3* fatty acids consumption on plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers during gestation: The Salmon in Pregnancy Study (submitted to *J Nutr*).

The two main objectives of this thesis were:

- to conduct a dietary intervention study in “at risk” pregnant women using minimally contaminated salmon rich in LC *n-3* PUFA, and
- to determine the effects of consuming such fish during pregnancy on maternal and fetal (*i.e.* cord blood) *n-3* fatty acid status, oxidative stress, antioxidant defense system and plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers.

More specific aims of this study were:

- to describe the design of the SiPS, the characteristics of the included women, the composition of the salmon used in the intervention, the outcomes that will be reported from the study and the intake of fish, the status of EPA and DHA in

maternal plasma and in umbilical cord plasma and selected pregnancy outcomes in the two groups (Paper I).

- to study the impact of increased salmon consumption on the fatty acid profile of erythrocytes in pregnant women from week 20 of pregnancy until delivery, and in pair-matched maternal and cord blood.
- to study whether increased oily fish intake in pregnancy increases oxidative stress, as indicated by increased concentrations of 8-iso-prostaglandin (PG) F_{2α} and 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG) in urine, and of lipid peroxides (LPO) in plasma (Paper II).
- to compare the antioxidant defense system in blood plasma and erythrocytes of women with and without increased salmon consumption from week 20 of pregnancy until they gave birth (Paper III).
- to compare plasma adipokines, and inflammatory and vascular homeostasis biomarker status of women, with and without increased salmon consumption, from week 20 of pregnancy until they gave birth (Paper IV), and
- to compare the antioxidant defense system in plasma and erythrocytes and also the plasma adipokines and inflammatory and vascular homeostasis biomarkers status, in pair-matched maternal and cord blood.

Effect of increased intake of salmon on status of EPA and DHA during pregnancy

Provision of essential fatty acids (EFAs) in adequate quantities is fundamental for the development of the placenta, the fetus, and ultimately, for the outcome of pregnancy. It is recognized that provision of DHA to the fetus and neonate is important for growth and development, especially of the visual and central nervous systems (8, 48, Innis *et al.*, 2008). EPA and DHA may also be important for optimal development and functioning of the vascular, cardiac, and immune systems (Calder *et al.*, 2006a, 2010; Kremmyda *et al.*, 2011; Prescott *et al.*, 2007). Although the fetus and the newborn are able to synthesize LC PUFAs from precursors, the processing rate of elongation and desaturation seems to be insufficient to supply the required amount of these fatty acids (Makrides *et al.*, 1995; Martinez, 1992), being the mother who supplies the LC PUFAs needed during pregnancy, and even after birth.

This makes the diet of pregnant women of essential importance to provide sufficient EFAs for the growing and developing fetus and infant (Connor *et al.*, 1996;

Dunstan *et al.*, 2004). Seafood, especially oily fish, are rich sources of the LC $n-3$ PUFAs EPA and DHA. Examples of oily fish are salmon, sardines, pilchards, mackerel, herring, trout, and fresh tuna. The average content of EPA plus DHA in an adult portion of oily fish is between 1 and 3.5 g, depending mainly upon the type of fish (8, 48). The guideline range for oily fish intake among pregnant women is one or two portions per week, the upper limit imposed because of concern about contaminants in some species of fish (48). The European Food Safety Authority recently recommended the consumption of 250 mg/day of EPA plus DHA for healthy adults with an additional 100 to 200 mg/day of DHA for pregnant women (22). The salmon used was produced specifically for use in this study by aquaculture, and provided 1.8 g EPA plus DHA, 2.08 g LC $n-3$ PUFA and 3.56 g total $n-3$ PUFA per portion. Importantly the ingredients used for the salmon feed were selected to be low in contaminants, so that as well as being rich in LC $n-3$ PUFA, the salmon used here was very low in the full range of possible contaminants (Paper I). Further, using the data available from the food frequency questionnaires (FFQs) and the fish diaries, intake of EPA plus DHA was about 20-fold higher in the salmon group than in the control group during intervention (Paper I). It is evident from these data that consumption of two portions of oily fish per week, with the EPA and DHA content of the salmon used here, will allow pregnant women to achieve the current recommendations for intake of LC $n-3$ PUFA (22, 48).

The decline in the percentage of EPA and DHA in plasma over the course of pregnancy in the control group is entirely consistent with data reported previously (Al *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 1997; De Vriese *et al.*, 2003). In contrast to the observations in the control group, not only did EPA and DHA not decline in plasma in the salmon group, they increased (Paper I). Plasma from umbilical cord blood showed higher EPA and DHA in the salmon group, indicating enhanced transfer of these functionally important fatty acids to the fetus, presumably as result of the higher concentration in the maternal circulation. In line with this, total LC $n-3$ PUFAs in red blood cells (RBCs) were also higher in umbilical cord blood after salmon supplementation. The higher percentage of EPA and DHA in the fetal circulation in the salmon group may result in better visual, neural and immune development in those infants. Moreover, the higher arachidonic acid (AA, 20:4 $n-6$) and DHA percentages found in RBCs might point to a higher mobilization of these fatty acids, which are necessary for fetal brain and body growth, in the third trimester of pregnancy (Martínez, 1992; Makrides *et al.*, 1995; Uauy *et al.*, 2001).

Despite the improved maternal DHA and AA status detected in RBCs in the present study may have been a result of LC *n*-3 PUFA supplementation, both control and salmon-supplemented groups showed a similar increase. In the SiPS, the LC *n*-3 PUFA provided from salmon resulted in an equivalent daily intake of about 500 mg EPA plus DHA/day. Others who have examined the impact of DHA supplementation also demonstrated no effect on DHA concentration (Sanjurjo *et al.*, 2004; Smuts *et al.*, 2003). However, provision with higher amounts of these fatty acids, may be reflected in LC *n*-3 PUFA concentration (Helland *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2000; Dunstan *et al.*, 2004). Thus, our finding is in line with what has previously been reported.

Although possible protective effects of early LC *n*-3 PUFA exposure have been examined in supplementation studies with fish oil (Dunstan *et al.*, 2003a, 2003b; Denburg *et al.*, 2005), as far as we are aware, there are no published intervention trials with fish during pregnancy. We do not know the optimal dose of LC *n*-3 PUFAs for the fetus and the neonate, but it is possible that the regular diet does not provide the number of EFAs molecules required for optimal development of several structures in the central nervous system (Al *et al.*, 1990, 1995). Thus, higher consumption of fish, especially oily fish, in pregnancy, may linked to better health outcomes in the offspring in infancy and childhood, and the protective effect of oily fish is linked to the nutrients that it contains, particularly LC *n*-3 PUFA (48).

Influence of increased salmon intake on oxidative stress during gestation

LC *n*-3 PUFAs contained in oily fish, may be prone to lipid peroxidation by reactive oxygen species (ROS) because of the chemical reactivity of their multiple double bonds. The extent of lipid peroxidation can be estimated by the amount of several markers including LPO or F₂-isoprostanes (Roberts *et al.*, 2000; Little *et al.*, 1999). Another interesting marker of oxidative stress is 8-OHdG, proved useful to study oxidative DNA damage (Cooke *et al.*, 2001). Several studies have shown that LC *n*-3 PUFA supplementation may reduce or maintain, rather than enhance, levels of oxidative stress *in vivo* (Barbosa *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2003; Shoji *et al.*, 2006). Accordingly, our results showed that urinary F₂-isoprostanes, urinary 8-OHdG and plasma LPO concentrations did not change from week 20 to week 38 of pregnancy and were not altered by increased consumption of salmon (Paper II). Together with LC *n*-3 PUFA, oily fish supplies antioxidants, which may contribute to prevent increased oxidative stress after increased oily fish consumption. However, some other studies (Filaire *et al.*, 2010; 2011) have

indicated that supplementation with LC *n*-3 PUFA enhanced oxidative stress. Therefore, the influence of LC *n*-3 PUFA supplementation on the oxidative stress is still controversial.

Effect of increased salmon intake on the antioxidant defense system during gestation

Normal pregnancy is accompanied by a high metabolic demand and elevated requirements for tissue oxygen, which results in increased oxidative stress, but there is also a concomitant increase in antioxidant defenses that compensate for the increased oxidative stress (Poranen *et al.*, 1996; Knapen *et al.*, 1999). The capacity of the antioxidant defense system to avoid ROS-induced damage of cellular components is determined by a dynamic interaction between individual components, which include mostly vitamins and several antioxidant enzymes (Al-Gubory *et al.*, 2010). Plasma vitamin levels decreased in late pregnancy that might be an indication of a higher level of oxidative stress towards the end of gestation. The enhanced maternal GPx and GR activities and also increased selenium and glutathione concentrations observed in our study population during pregnancy, suggests a response of antioxidant defenses to pregnancy-induced increases in oxidative stress. In addition, GPx activity was lower and GSSG levels were higher in cord blood; nonetheless, these results were similar in both studied groups (Paper III).

During the gestational period, maternal factors can contribute to an imbalance between pro-oxidant and antioxidant forces so providing an environment for free radical generation (Shoji *et al.*, 2007). If oxidative stress is a risk of pregnancy, then the mother's diet (specifically, the intakes of antioxidants, PUFAs and other unknown beneficial radical scavenging compounds) may play a role in modifying that process (Turpeinen *et al.*, 1998). In the present thesis, higher selenium and retinol concentration were observed not only in maternal blood (Paper III), but also in cord blood, reflecting an effect of salmon intake (Strobel *et al.*, 2007; Tara *et al.*, 2010). Nevertheless, we did not find differences in the enzymatic antioxidant defense system between both salmon and control groups (Paper III), despite some previous studies showing activation of these protective systems by LC *n*-3 PUFAs (Arab *et al.*, 2006).

Influence of increased consumption of salmon on plasma adipokines, and inflammatory and vascular homeostasis biomarker status of women during gestation

Increased consumption of LC *n*-3 PUFA such as EPA and DHA, results in increased proportions of those fatty acids in cell phospholipids (Yaquob *et al.*, 2000; Healy *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 2006). The incorporation of EPA and DHA into human inflammatory cells occurs in a dose-response fashion and is partly at the expense of AA. Since there is less substrate available for synthesis of eicosanoids from AA, fish oil supplementation of the human diet has been shown to result in decreased production of AA-derived eicosanoids by inflammatory cells (Calder *et al.*, 2006b). EPA is also able to act as a substrate for cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) enzymes, giving rise to eicosanoids with a slightly different structure to those formed from AA. The functional significance of this is that the mediators formed from EPA are believed to be less potent than those formed from AA (Calder *et al.*, 2006b, 2010).

Furthermore, pregnant state is exceptional in many ways; there are important metabolic changes and many physiological functions, including the immune system, need to be adjusted to that new situation. These changes impact substantially not only on carbohydrate and lipid metabolic pathways but also on vascular functions. Early gestation can be viewed as an anabolic state in the mother with an increase in maternal fat stores and small increases in insulin sensitivity. Hence, nutrients are stored in early pregnancy to meet the fetoplacental and maternal demands of late gestation and lactation. In contrast, late pregnancy is better characterized as a catabolic state with decreased insulin sensitivity (increased insulin resistance), which results in increases in maternal glucose and free fatty acid concentrations, allowing greater substrate availability for fetal growth (Butte, 2000; Lain *et al.*, 2007). In line with this, we observed an increase in plasma TAG and LDLc during pregnancy in both groups of pregnant women. Despite not significantly, TAG levels in late pregnancy were lower after salmon supplementation. Additionally, HDLc significantly decreased on week 34 of pregnancy in contrast to insulin and HOMA-IR increases on same week of gestation (Paper IV). Further, maternal salmon supplementation did not adversely affect these parameters in cord blood. Thus, the nutritional intervention of LC *n*-3 PUFA from salmon might offset the physiological changes that occur during pregnancy and, because of LC *n*-3 PUFAs properties, common features accompanying healthy pregnancy may be improved by oily fish intake (Puglisi *et al.*, 2010).

In addition, fat not only stores maternal calories for the increased energy demands of late pregnancy but also is an active metabolic tissue playing a key role in an individual's metabolism (Catalano *et al.*, 2007). Adipocytes and their stroma are a rich source of cytokines and inflammatory mediators that can both increase (TNF- α) or decrease insulin resistance (adiponectin) (Briana *et al.*, 2009). Furthermore, increased insulin resistance and changes in lipid profile during pregnancy may have a role in endothelial dysfunction (Paradisi *et al.*, 2002). Adipokines, cytokines and vascular homeostasis biomarkers analyzed in both mothers and cord blood from newborns showed similar levels after oily fish supplementation (Paper IV); nonetheless, their role in modulating the metabolic changes in pregnancy is incompletely understood at present.

CONCLUSIONS

- Pregnant women, who do not regularly eat oily fish, when consuming two portions of salmon per week, increase their intake of EPA and DHA, achieving the recommended minimum intake, and they increase their maternal and fetus' status of EPA and DHA.
- The intake of two portions of salmon per week during pregnancy does not increase oxidative stress, as judged by the markers of oxidative damage to lipids and DNA measured herein.
- Consumption of two portions of salmon per week increases concentrations of selenium and retinol in pregnant women, with a concomitant increase in GPx activity throughout pregnancy. This enhancement in antioxidant defenses might be helpful to prevent and/or reduce additional oxidative stress during pregnancy.
- Carbohydrate and lipid metabolism, along with plasma adipokines, proinflammatory cytokines and vascular homeostasis biomarkers are not adversely affected after increased consumption of two portions of salmon per week in the pregnant state.
- Consumption of two portions of farmed salmon per week by pregnant women does not adversely affect the antioxidant defense system, carbohydrate and lipid

metabolism, adipokines, cytokines or vascular homeostasis biomarkers status of their offspring.

REFERENCES

1. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7): 533-564.
2. Al MD, Hornstra G, van der Schouw YT, Bulstra-Ramakers MT, Huisjes HJ. Biochemical EFA status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Hum Dev* 1990; 24(3): 239-248.
3. Al MD, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, de Jong AE, Hornstra G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Br J Nutr* 1995; 74(1):55-68.
4. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(10): 1634-1650.
5. Arab K, Rossary A, Flourie F, Tourneur Y, Steghens JP. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gammaglutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr*. 2006 ; 95(1): 18-26.
6. Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition*, 2003; 19(10): 837-842.
7. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci* 2009; 16(10): 921-937.
8. British Nutrition Foundation. Briefing paper: n-3 fatty acids and health. London: British Nutrition Foundation, 1999.
9. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5 Suppl): 1256S-1261S.
10. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(6 Suppl): 1505S-1519S (b).
11. Calder PC, Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Miles EA. Is there a role for fatty acids in early life programming of the immune system? *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3): 373-380.
12. Calder PC, Miles EA. Fatty acids and atopic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11 Suppl 13: 29-36.
13. Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, et al. Workshop Report: Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *Br J Nutr* 2006; 96:774-90.
14. Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; 109(2): 419-433 (a)

15. Connor WE, Lowensohn R, Hatcher L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* 1996; 31(Suppl): S183-S187.
16. Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(12): 1601-1604.
17. De Vriese SR, Dhont M, Christophe AB. FA composition of cholesteryl esters and phospholipids in maternal plasma during pregnancy and at delivery and in cord plasma at birth. *Lipids* 2003; 38(1): 1-7.
18. Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM, et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy. *Ped Res* 2005; 57(2): 276-281.
19. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Holt PG, Calder PC, Taylor AL, Prescott SL. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on maternal and fetal erythrocyte fatty acid composition. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(3): 429-437.
20. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: A randomized, controlled trial. *J Aller Clin Immunol* 2003; 112(6): 1178-1184 (a).
21. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(4):442-448 (b).
22. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 2010; 8(3): 1461.
23. Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, Gobert M, Durand D. Effect of 6 weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2010; 20(6): 496-506.
24. Filaire E, Massart A, Rouveix M, Portier H, Rosado F, Durand D. Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids and antioxidant mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(8): 1829-1839.
25. García-Rodríguez CE, Helmersson-Karlqvist J, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A, Basu S. Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women? The Salmon in Pregnancy Study. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(11): 2819-2923.
26. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 2000; 35(7): 763-768.

27. Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T, Drevon CA. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics* 2001; 108(5): E82.
28. Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 2008; 1237: 35-43.
29. Knäpen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP. Glutathione and glutathione related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 82(2): 171-184.
30. Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Diaper ND, Miles EA, Calder PC. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega 3-fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41(1): 36-66.
31. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50(4): 938-948.
32. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; 27(1): 114-120.
33. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 1999; 13(5): 347-352.
34. Makrides M, Neumann M, Simmer K, Pater J, Gibson R. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *Lancet* 1995; 345(8963): 1463-1468.
35. Martínez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 1992; 120(4 Pt 2): S129-S138.
36. Miles EA, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, Garcia E, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.
37. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(7): 772-781.
38. Otto SJ, Houwelingen AC, Antal M, Manninen A, Godfrey K, López-Jaramillo P, Hornstra G. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51(4): 232-242.
39. Otto SJ, van Houwelingen AC, Hornstra G. The effect of supplementation with docosahexaenoic and arachidonic acid derived from single cell oils on plasma and erythrocyte fatty acids of pregnant women in the second trimester. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63(5): 323-328.

40. Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Cavolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy: association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2002; 25(3): 560-564.
41. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996; 17(7): 401-405.
42. Prescott SL, Dunstan JA. Prenatal fatty acid status and immune development: The pathways and the evidence. *Lipids* 2007; 42(9): 801-810.
43. Prescott SL, Macambas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160(10): 4730-4737.
44. Purasiri P, Mckechnie A, Heys SD, Eremin O. Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology* 1997; 92(2): 166-172.
45. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KW, Calder PC. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(2): 331-342.
46. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4): 505-513.
47. Sanjurjo P, Ruiz-Sanz JI, Jimeno P, Aldamiz-Echevarría L, Aquino L, Matorras R, Esteban J, Banqué M. Supplementation with docosahexaenoic acid in the last trimester of pregnancy: maternal-fetal biochemical findings. *J Perinat Med* 2004; 32(2): 132-136.
48. Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. London: The Stationary Office, 2004.
49. Shoji H, Franke C, Campoy C, Rivero M, Demmelmair H, Koletzko B. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid supplementation on oxidative stress levels during pregnancy. *Free Radic Res* 2006; 40(4): 379-384.
50. Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(3): 324-328.
51. Smuts CM, Borod E, Peeples J, Carlson SE. High-DNA eggs: feasibility as a means to enhance circulating DHA in mother and infant. *Lipids* 2003; 38(4): 407-414.
52. Strobel M, Tinz J, Biesalski HK. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr* 2007; 46 Suppl 1: 11-20.
53. Tara F, Maamouri G, Rayman MP, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, Yazarlu O, Ouladan S, Tavallaie S, Azimi-Nezhad M, Shakeri MT, Boskabadi H, Oladi M, Sangani MT, Razavi BS, Ferns G. Selenium supplementation and the incidence of preeclampsia in

- pregnant Iranian women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010; 49(2): 181-187.
54. Turpeinen AM, Basu S, Mutanen M. A high linoleic acid diet increases oxidative stress in vivo and affects nitric oxide metabolism in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59(3): 229-233.
 55. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 2001; 36(9): 885-895.
 56. Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(3): 260-274.

Artículos

Artículos

Esta tesis ha sido escrita en la modalidad de compendio de artículos y consta de las siguientes publicaciones:

- I. Miles EA, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, **García-Rodríguez CE**, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study-study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.
- II. **García-Rodríguez CE**, Helmersson-Karlqvist J, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda S, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A, Basu S. Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women?-The Salmon in Pregnancy Study. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(11): 2819-2823.
- III. **García-Rodríguez CE**, Mesa MD, Olza J, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Noakes PS, Miles EA, Ramírez-Tortosa MC, Liaset B, Frøyland L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Aguilera CM, Helmersson-Karlqvist J, Godfrey KM, Calder PC, Basu S, Gil A. Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women? *Antioxid Redox Signal*, aceptado para su publicación.
- IV. **García-Rodríguez CE**, Olza J, Aguilera CM, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A. Effect of salmon consumption on plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers during gestation (enviado a J Nutr).

Justificación y Objetivos

Justificación y Objetivos

Numerosos estudios revelan que el pescado, especialmente de tipo graso, presenta una amplia gama de beneficios sobre la salud, siendo de especial relevancia aquéllos asociados con su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga $n-3$ (AGPI-CL $n-3$). Así, en mujeres embarazadas, el aporte de ácidos grasos esenciales (AGE) en cantidades adecuadas es fundamental para el desarrollo de la placenta, del feto y, en última instancia, para el resultado exitoso del embarazo. En concreto, el aporte de ácido docosahexaenoico (DHA) al feto y al neonato es especialmente importante para el crecimiento y desarrollo de los sistemas nervioso central y visual. Igualmente, tanto el DHA como el ácido eicosapentaenoico (EPA) son necesarios para un desarrollo óptimo y un adecuado funcionamiento de los sistemas inmunitario, cardíaco y vascular. Esto hace que la dieta de las mujeres embarazadas sea de vital importancia para proporcionar suficientes AGE, tanto al feto como al niño, para un crecimiento y desarrollo óptimos. A pesar de que el pescado y, sobre todo, el pescado graso, es una fuente rica en AGPI-CL $n-3$, también es posible que acumule contaminantes en sus tejidos que podrían ser perjudiciales. Por esta razón, a menudo se recomienda a las mujeres gestantes reducir o evitar su consumo durante este periodo, lo que podría resultar en un aporte inadecuado de estos AGE al feto en desarrollo.

Los AGPI-CL $n-3$ contenidos en el pescado graso, además, son susceptibles a la oxidación por acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a que presentan múltiples dobles enlaces en su estructura. Ésto, unido al hecho de que el embarazo normal va acompañado de una elevada demanda metabólica y un incremento de las necesidades de oxígeno, puede resultar en un aumento del estrés oxidativo. No obstante, el organismo también es una importante fuente de moléculas antioxidantes, que pueden ayudar a controlar el estrés oxidativo, como las enzimas antioxidantes y las vitaminas de la dieta. Un desequilibrio entre ambos procesos se considera responsable de la iniciación o del desarrollo de patologías que afectan a la reproducción. Por consiguiente, es importante que la madre posea un adecuado estado de antioxidantes, antes del embarazo y durante el mismo, ya que podría ayudar a controlar y prevenir estos procesos inducidos por el estrés oxidativo.

Durante el embarazo, muchas funciones fisiológicas se ven modificadas para adaptarse a la nueva situación y permitir un crecimiento y desarrollo adecuados del feto. En general, tiene lugar una movilización de las reservas energéticas y cambios en la sensibilidad a la insulina, que se traducen en una mayor disponibilidad de sustratos, lo que facilitará el desarrollo fetal. Por otro lado, el tejido adiposo no sólo almacena nutrientes, sino que también constituye una importante fuente de citoquinas y mediadores de la inflamación, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , que puede aumentar la resistencia a la insulina, o la adiponectina, que puede disminuirla. Igualmente, estos cambios también pueden alterar la función vascular. Por todo ello, el embarazo puede ser entendido como un estado de inflamación sistémica leve y controlada que puede desencadenar enfermedades si no se consigue mantener el equilibrio. Además, los AGPI-CL $n-3$ también producen una amplia variedad de productos oxidados que actúan como mediadores y reguladores claves en el proceso inflamatorio, denominados eicosanoides. La alimentación habitual en el mundo occidental, a base de vegetales y animales terrestres, lleva a la preponderancia de los eicosanoides derivados del AA mientras que un elevado consumo de pescado, rico en AGPI $n-3$ como el EPA y el DHA, da lugar a un aumento de las proporciones de estos AG, quedando parcialmente reemplazado el AA. La importancia de este hecho radica en que a los eicosanoides derivados del AA se les ha atribuido un carácter proinflamatorio, en comparación con los eicosanoides derivados del EPA, que tienen menor poder inflamatorio o, incluso, anti-inflamatorio. La ingesta de AGPI-CL $n-3$ se ha relacionado con una mejoría en enfermedades inflamatorias como la artritis, diabetes, obesidad y enfermedad cardiovascular y, por tanto, también podría mejorar el estado de inflamación fisiológica característica del embarazo.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, los **objetivos generales** de este trabajo de investigación han sido:

- Conducir un estudio de intervención en mujeres embarazadas, usando un salmón rico en APGI-CL $n-3$ y mínimamente contaminado y,
- Determinar los efectos que el consumo de ese pescado tiene durante el embarazo sobre el estado de ácidos grasos $n-3$, tanto en la madre como en el feto (*i.e.*

sangre de cordón), el estrés oxidativo, el sistema de defensa antioxidante y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular en plasma.

Los **objetivos específicos** de este trabajo han sido:

- Describir el diseño del estudio, las características de las mujeres incluidas, la composición del salmón utilizado en la intervención y el resultado del embarazo, además de la ingesta de pescado, así como determinar el nivel de EPA y DHA en el plasma materno y en el plasma de cordón umbilical
- Estudiar el impacto de un elevado consumo de salmón sobre el perfil de ácidos grasos en eritrocitos de mujeres embarazadas, desde la semana 20 del periodo gestacional hasta dar a luz y también en eritrocitos de cordón umbilical
- Estudiar si un aumento de la ingesta de pescado graso por parte de las mujeres embarazadas aumenta el estrés oxidativo, mediante la determinación de 8-iso-prostaglandina F_{2α} y de 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine en orina, y de peróxidos lipídicos in plasma
- Comparar el sistema de defensa antioxidante, tanto enzimático como no enzimático, en las mujeres del estudio desde la semana 20 del embarazo hasta dar a luz
- Comparar el nivel de adipoquinas y de biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular de las mujeres con ingesta de salmón y sin ella, durante el embarazo y,
- Comparar el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático y también, el nivel de adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular, en el plasma y los eritrocitos maternos y también en el plasma y en los eritrocitos de cordón umbilical

Introducción

Introducción

Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados durante la gestación

Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la nutrición humana

El balance energético a través de la gestación, depende de la estrecha relación madre-placenta-feto mediada por hormonas, que garantiza la conservación de energía y el adecuado aprovechamiento de nutrientes, siendo los lípidos, como el resto de biomoléculas, de gran importancia en el proceso de formación del nuevo ser.

Los lípidos son constituyentes estructurales importantes de las membranas celulares, cumplen funciones energéticas y de reserva metabólica, y forman parte de la estructura básica de algunas hormonas y de las sales biliares (Sastry, 1985). Además, algunos tienen la característica de no poder ser sintetizados a partir de estructuras precursoras, lo que les imprime el carácter de esenciales (Spector, 1999). Dentro de la gran diversidad estructural que caracteriza a los lípidos, los ácidos grasos (AG) son quizá los de mayor importancia.

Los AG se clasifican en dos grandes grupos: saturados (AGS, sin dobles enlaces) e insaturados (AGI, con dobles enlaces). Éstos, a su vez, pueden ser monoinsaturados (AGMI, con un solo doble enlace) o poliinsaturados (AGPI, con varios dobles enlaces). Según la posición del doble enlace, contabilizando desde el grupo metilo terminal al grupo funcional carboxílico, los AGMI y los AGPI se clasifican en tres series principales:

- AG omega-9 ($n-9$): el doble enlace está en el carbono 9.
- AG omega-6 ($n-6$): el primer doble enlace en el carbono 6.
- AG omega-3 ($n-3$): el primer doble enlace en el carbono 3.

Los AG $n-9$ no son esenciales, porque el hombre puede sintetizarlos introduciendo un doble enlace en un AG saturado en esa posición. De esta forma, el ácido oleico (18:1 $n-9$), por ejemplo, no requiere estar presente en nuestra dieta. No ocurre lo mismo con algunos AG $n-6$ y $n-3$, ya que nuestro organismo no puede introducir insaturaciones a

partir del carbono 9 (Brenner *et al.*, 1969). Por este motivo, estos AG se consideran esenciales (AGE), y resulta imprescindible que nuestra dieta los incluya en determinadas proporciones (Simopoulos, 1991).

Los AGE son los AGPI ácido linoleico (18:2 *n*-6, LA), precursor de la serie *n*-6 y el ácido α -linolénico (18:3 *n*-3, ALA), precursor de la serie *n*-3. Estos AG deben ser desaturados y elongados en el intestino, hígado y cerebro (Sprecher *et al.*, 1995), donde forman AGPI de cadena larga (AGPI-CL) (**Figura 1**), que son precursores de moléculas implicadas en funciones metabólicas y reguladoras, de gran importancia en el desarrollo neonatal (Sellmayer *et al.*, 1999). Estos AGPI-CL están representados, en la familia del LA, por el ácido di-homo- γ -linolénico (20:3 *n*-6, di-homo- γ -LA), el araquidónico (20:4 *n*-6, AA) y el docosapentaenoico (22:5 *n*-6, DPA) y, en la familia del ALA, por el eicosapentaenoico (20:5 *n*-3, EPA) y el docosahexaenoico (22:6 *n*-3, DHA).

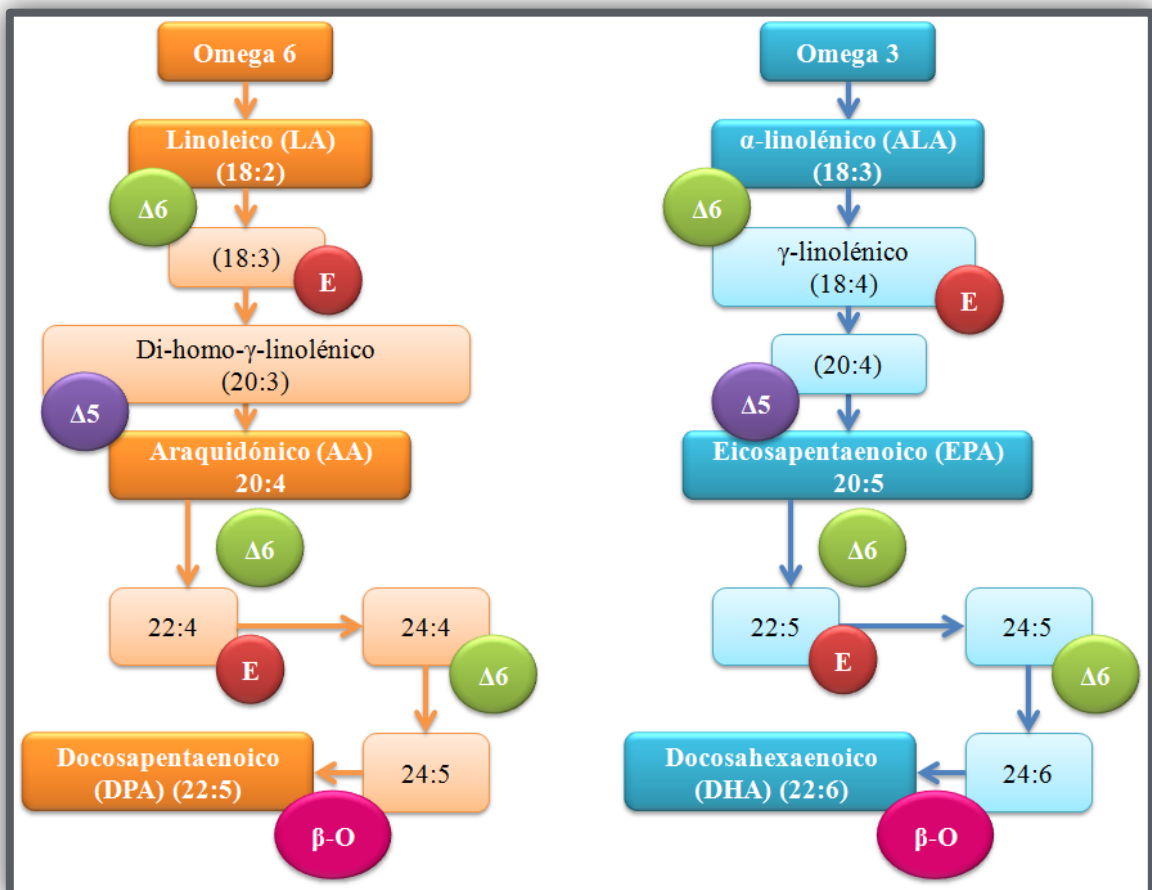


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos. β -O, β -oxidación; $\Delta 5$, $\Delta 5$ desaturasa; $\Delta 6$, $\Delta 6$ desaturasa; E, elongasa (modificado a partir de Calder *et al.*, 2010)

Las vías metabólicas de ambos AG compiten por las mismas enzimas desaturasas y elongasas, de tal manera que la síntesis de unos metabolitos u otros se realizará dependiendo del predominio de sustrato. Una ingesta excesiva de AGPI-CL $n-3$ puede tener efectos inhibidores sobre las $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas, hecho que puede causar un descenso del nivel de AA, de la misma manera que una elevada concentración de AGPI-CL $n-6$ en el plasma hace que disminuya la concentración de AGPI-CL $n-3$ (Uauy *et al.*, 2000). La proporción entre los AG $n-6$ y $n-3$ presentes en la dieta debe mantener un rango entre 5:1 y 10:1, siendo la proporción entre el DHA y el AA de 1:1 a 1:2, para que no exista competencia por las desaturasas (Uauy *et al.*, 2000).

Papel de la madre en el aporte de ácidos grasos poliinsaturados al feto durante la gestación

El aporte de AGE en cantidades adecuadas es fundamental para el desarrollo de la placenta, del feto y, en definitiva, para el resultado final de la gestación. Se sabe que un aporte adecuado de DHA es importante para el crecimiento y el desarrollo del feto y del recién nacido, especialmente para el sistema nervioso central y visual (*Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. The Stationery Office, 2004; Innis, 2008; Calder et al., 2006*). Las carencias específicas de AGPI $n-3$ durante la gestación y el primer año de vida influyen en la integridad neurológica y afectan selectivamente al aprendizaje y a la capacidad visual (Uauy *et al.*, 2006; Helland *et al.*, 2003; Bowstra *et al.*, 2003). Tanto el EPA como el DHA pueden ser también importantes para el funcionamiento de los sistemas inmunitario y cardiovascular y, en general, para el desarrollo del nuevo ser (Prescott *et al.*, 2007; Calder *et al.*, 2010; Kremmyda *et al.*, 2011; Uauy *et al.*, 2001).

Durante la etapa gestacional e, incluso, después del nacimiento, el aporte de AGPI-CL es realizado por la madre ya que, si bien el feto y el recién nacido tienen la capacidad para formar AGPI-CL a partir de precursores, la velocidad de transformación (elongación y desaturación) del LA y ALA para formar AA y DHA, respectivamente, parece no ser suficiente para proveer la cantidad de AGPI-CL requerida por el nuevo ser. La actividad biosintética de elongación y de desaturación del hígado fetal es muy incipiente debido a la inmadurez fisiológica de este órgano (Makrides *et al.*, 1995; Martínez, 1992). Por otro lado, la placenta humana no tiene la capacidad para elongar y desaturar los AGPI precursores, aunque es selectivamente permeable a los AGPI-CL de origen materno. De

hecho, la placenta posee un transportador específico que capta selectivamente DHA (Larqué *et al.*, 2006b). Por estas razones, el aporte de AGPI-CL *n*-3 al feto proviene de las reservas tisulares de AGPI-CL de la madre (principalmente del tejido adiposo), de la actividad biosintética (elongación y desaturación de precursores) del propio feto y del aporte nutricional de AGPI-CL preformados (Clandinin *et al.*, 1980). Por otra parte, se puede observar un gradiente materno-fetal en cuanto a los valores de AGE en el plasma de la madre y del feto. Tanto al nacer como en el interior del útero, se ha observado un mayor porcentaje de AGPI-CL en los lípidos circulantes del feto respecto a la madre, lo que ocurre debido a que las demandas fetales para el crecimiento neural y vascular son mayores (Martínez, 1992). El transporte a través de la placenta implica la unión de estos AG a proteínas de membrana (Larqué *et al.*, 2006a; Larqué *et al.*, 2006b) y a proteínas transportadoras del citoplasma (Dutta-Roy, 2000). En este sentido, Larqué *et al.* (2006a) han demostrado la expresión de proteínas transportadoras y de unión de AG en la placenta humana. Igualmente, el mismo grupo de investigación también ha demostrado una correlación entre la expresión de una de estas proteínas transportadoras con el contenido de DHA en la sangre de cordón, lo que sugiere que dicha proteína podría funcionar como un transportador específico de DHA en la placenta (Larqué *et al.*, 2006b).

Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 durante la gestación

Las principales fuentes de AGPI *n*-6 son los aceites de semillas, los huevos y la carne, tanto de ave como de cerdo, mientras que los productos del mar, especialmente el pescado graso, son fuentes ricas en AGPI-CL de la serie *n*-3, EPA y DHA. Ejemplos de pescado graso son el salmón, las sardinas, la caballa, el arenque y la trucha, y se ha descrito que el contenido medio de EPA+DHA, en una porción de pescado graso adulto, está entre 1 y 3.5 g, dependiendo principalmente del tipo de pescado (*Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. The Stationery Office, 2004; Briefing paper: n-3 fatty acids and health. British Nutrition Foundation, 1999*).

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), recomienda que todos los adultos consuman entre tres y cuatro raciones de pescado graso a la semana, alternando su consumo con el de pescado blanco (Opinión del Comité

Científico de la AESAN relativa a la propuesta de la CE sobre alegaciones nutricionales de ácidos grasos omega-3 en alimentos efectuada por la Comisión Europea y a las consideraciones sobre la misma aportadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Revista del Comité Científico de la AESAN nº3, 2003). También advierte que las mujeres en edad fértil, las embarazadas y las que están en periodo de lactancia, eviten el consumo del pescado graso de mayor tamaño (pez espada, tiburón, atún rojo y lucio), debido a la preocupación acerca de los contaminantes que acumulan (Informe del Comité Científico de la AESAN en relación con a los niveles de mercurio establecidos para los productos de pesa. Revista del Comité Científico de la AESAN nº13, 2006). En cambio, pueden comer sardinas, anchoas o caballa con toda tranquilidad, pues al ser pescado graso de menor tamaño, también contendrían menos mercurio. Los valores de referencia para el consumo de pescado entre las mujeres embarazadas en el Reino Unido es de una o dos porciones a la semana (*Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. The Stationery Office, 2004*). La AESAN aconseja, en línea con la misma recomendación a nivel europeo dada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el consumo de 250 mg/día de EPA+DHA por adultos sanos, con una ingesta adicional de 100-200 mg/día de DHA para las mujeres embarazadas (*EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. EFSA J, 2010*). La Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), recomiendan que las mujeres embarazadas consuman un mínimo de 300 mg/día de EPA y DHA, de los cuales, al menos 200 mg deberían ser DHA (*Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, FAO Food and Nutrition Paper 91, FAO, 2010*). Otros autores (Cetin *et al.*, 2008), han recomendado una ingesta de 200 mg de DHA/día para mujeres embarazadas y lactantes.

En definitiva, un consumo elevado de pescado, especialmente pescado graso, durante el embarazo puede tener consecuencias positivas sobre la salud durante la infancia, estando el efecto protector del pescado graso ligado a los nutrientes que contiene, particularmente los AGPI-CL (*Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity, Advice on fish consumption: benefits and risks. The Stationery Office, 2004*).

Estrés oxidativo asociado a la gestación

Radicales libres

Los radicales libres se definen como cualquier sustancia (molécula o átomo), que contiene uno o más electrones no apareados en su última órbita electrónica. Su situación energética es, por tanto, muy inestable, por lo que son altamente reactivos y de vida media corta. Su presencia genera una serie de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas que, a su vez, se convierten en radicales libres (Halliwell *et al.*, 1993; Halliwell *et al.*, 2004; Gutteridge, 1995).

Los principales radicales libres que contribuyen a la oxidación de biomoléculas son especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el radical hidroxilo ($OH\cdot$), que se forman continuamente como consecuencia de reacciones metabólicas, como por ejemplo, durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria, la explosión oxidativa en los leucocitos, la degradación de AG en los peroxisomas y los procesos de oxidación con función mixta producidos en el sistema del citocromo P450 (Halliwell *et al.*, 1993; Halliwell *et al.*, 2004; Gutteridge, 1995).

Las ERO conducen a la oxidación de biomoléculas con la consiguiente pérdida de sus funciones biológicas, así como al descontrol homeostático de células y tejidos (Halliwell *et al.*, 1993; Halliwell *et al.*, 2004; Gutteridge, 1995). El mantenimiento del estrés oxidativo de forma continuada, conlleva importantes implicaciones en el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la obesidad, la aterosclerosis, la diabetes, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer (Galili *et al.*, 2007; Fukurama *et al.*, 2004).

Cuantificación del estrés oxidativo

La cuantificación de las ERO es prácticamente imposible, debido a que su vida media es muy corta como consecuencia de su naturaleza altamente reactiva. Sin embargo, cuando la producción de radicales libres y/o especies reactivas supera la capacidad de acción de los antioxidantes, se favorece la oxidación de biomoléculas, generando metabolitos específicos, considerados marcadores del estrés oxidativo que pueden ser identificados y cuantificados. Tales marcadores se basan, sobre todo, en el análisis de productos generados durante la oxidación de lípidos, proteínas y del ácido

desoxirribonucleico (DNA), siendo los primeros los más conocidos y ampliamente determinados (Morrow *et al.*, 1990; Nenseter *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004).

Peróxidos lipídicos

La peroxidación de lípidos representa una forma de producción de daños tisulares y celulares habitualmente iniciada por las ERO. Las ERO generan una cascada de reacciones que conducen a la producción de radicales libres y a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de AGI, especialmente AGPI. Los AG más susceptibles de sufrir este proceso son los que presentan mayor número de dobles enlaces, como el AA, el DHA y el LA (Girotti, 1998, Carone *et al.*, 1993). El producto final de la peroxidación lipídica es la formación de peróxidos de AG y metabolitos derivados, algunos de ellos altamente tóxicos, como los aldehídos malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE). Se forman también dihidrocarburos como el pentano o el etano, que se eliminan por la respiración (Girotti, 1998; Girotti, 2008; Halliwell *et al.*, 1993). Por tanto, el alcance de la peroxidación lipídica puede ser estimado en función de la cantidad de productos generados por peroxidación primaria, como los peróxidos lipídicos (LPO) (Little *et al.*, 1999; Girotti, 1998, Morrow *et al.*, 2000) o por la determinación de productos finales de oxidación como el MDA.

La peroxidación lipídica es un proceso de alta capacidad destructiva derivada de dos aspectos: el daño directo a las células al atacar las membranas, provocando un descenso en la fluidez de la misma y, por lo tanto, alterando sus propiedades y la función celular normal y, el indirecto, por liberación de productos reactivos tóxicos, fundamentalmente productos carbonilos de la peroxidación, con actividad biológica definida y que pueden difundir a otros lugares del organismo (Orrenius *et al.*, 1989; Girotti, 1998; Girotti, 2008; Halliwell *et al.*, 1993).

Isoprostanos

Los F₂-isoprostanos son derivados de la familia de las prostaglandinas (PG) y, a diferencia de éstas, que se forman por acción del enzima cicloxigenasa (COX), los F₂-isoprostanos son generados *in vivo* a partir del AA, de forma independiente de este enzima, debido a un proceso de peroxidación inducida mediante radicales libres (Morrow *et al.*, 1990). Los isoprostanos circulan por sangre periférica y se excretan con la orina. Por este motivo, es en la orina donde se suele determinar su concentración, ya que

presenta la ventaja de que, además de ser un método no invasivo, no se forman productos de auto-oxidación y los isoprostanos permanecen muy estables (Morrow *et al.*, 1990; Morrow, 2000).

Después de la sustracción de un átomo de hidrógeno bis-alílico y de la adición de una molécula de oxígeno al AA para formar un radical peroxilo, tiene lugar una endociclación y una posterior adición de otra molécula de oxígeno para formar compuestos del tipo prostaglandina G_2 (PGG_2). Estos endoperóxidos bicíclicos, son intermediarios inestables, reducidos posteriormente para formar los F2-isoprostanos. Basándose en este mecanismo de formación, se generan cuatro regioisómeros de los F2-isoprostanos y se nombran como regioisómeros de las series 5-, 12-, 8- ó 15-, dependiendo del átomo de carbono al cual esté unida la cadena lateral hidroxílica (Morrow, 2000).

Uno de los principales F2-isoprostanos es la 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ (8-iso- $PGF_{2\alpha}$), actualmente considerada como uno de los principales biomarcadores de estrés oxidativo *in vivo* (Basu, 2008; Roberts *et al.*, 2000; Kadiiska *et al.*, 2005). Esta molécula se encuentra en una concentración elevada en orina en varias situaciones asociadas con el estrés oxidativo como aterosclerosis (Schwedhelm *et al.*, 2004), diabetes (Davi *et al.*, 2003; Helmersson *et al.*, 2004), obesidad (Keaney *et al.*, 2003; Sinaiko *et al.*, 2005), tabaquismo (Helmersson *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 1998), enfermedades neurodegenerativas (Casadesus *et al.*, 2007; Montine *et al.*, 2002) y asma (Jonasson *et al.*, 2009).

8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina

Los marcadores de oxidación del DNA son escasos. En los últimos años, sólo la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) ha sido considerada como un marcador de estrés oxidativo (Cooke *et al.*, 2001b). El DNA mitocondrial y nuclear de tejidos y linfocitos sanguíneos es, normalmente, el que sufre el daño oxidativo (Cooke *et al.*, 2002) y, concretamente, de las bases nitrogenadas que forman parte del DNA, la guanina es la más susceptible a la oxidación. Esta oxidación consiste en la adición de un grupo hidroxilo en la posición número 8 de la molécula de guanina, generando 8-OHdG que es una de las formas predominantes de lesiones en el DNA inducidas por radicales libres.

La reparación del DNA nuclear oxidado es llevada a cabo por glicosilasas y endonucleasas. Si no se reparan los daños ocasionados, la presencia de una base modificada, la 8-OHdG, durante la replicación del DNA, puede dar lugar a transversiones G:C-T:A. Por tanto, si las lesiones debidas a la oxidación no son reparadas antes de la replicación, se pueden convertir en mutagénicas (Bjelland *et al.*, 2003; Sunaga *et al.*, 2001). Por este motivo, una vez eliminados de la cadena del DNA, los productos de la reparación, es decir, las bases y los nucleósidos oxidados, al ser solubles en agua, van a ser excretados con la orina sin más modificaciones posteriores.

El DNA en forma de 8-OHdG puede ser cuantificado y, así, conocer el daño oxidativo. El papel del daño oxidativo al DNA es considerado importante en estudios de desarrollo del cáncer y envejecimiento. Concretamente, varios trabajos previos (Karihtala *et al.*, 2009; Murtas *et al.*, 2010; Sheridan *et al.*, 2009), han demostrado que este biomarcador puede utilizarse en la evaluación del estrés oxidativo en tejido y en carcinoma de ovario donde, por ejemplo, unos elevados niveles de 8-OHdG se han asociado con un peor pronóstico. Por otro lado, con el paso de la edad, se acumulan nucleósidos oxidados en el DNA, tanto nuclear como mitocondrial (Cooke *et al.*, 2001a; Fraga *et al.*, 1990). Por todo ello, la 8-OHdG se puede considerar un marcador sensible para estudiar el daño oxidativo del DNA.

Mecanismos antioxidantes

Las defensas antioxidantes tienen la función de inactivar las ERO y los demás radicales libres y, como consecuencia, proteger contra el daño oxidativo. De forma esquemática, los mecanismos antioxidantes pueden catalogarse en enzimáticos y no enzimáticos. A continuación, se resumen las características fundamentales de algunos de estos elementos.

Mecanismos enzimáticos

En el organismo existen diversas enzimas cuya función es disminuir las concentraciones intracelulares e intercelulares de EROs. Entre ellas se encuentran la **superóxido dismutasa (SOD)**, la **catalasa (CAT)**, la **glutación peroxidasa (GPx)** y la **glutación reductasa (GR)**. La **Figura 2** resume la acción coordinada de estas enzimas.

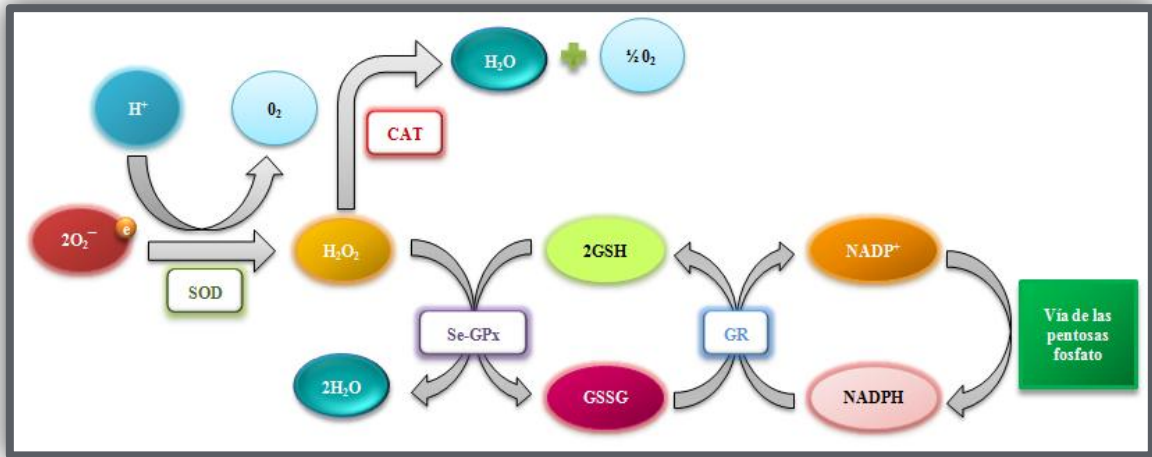


Figura 2. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. GR, glutatióno reductasa; GSH, glutatióno reducido; GSSG, glutatióno oxidado; NADP⁺, nicotinamida adeninucleótido-fosfato; NADPH, nicotinamida adeninucleótido-fosfato reducido; Se-GPx, glutatióno peroxidasa dependiente de selenio; SOD, superóxido dismutasa (modificado a partir de Gil *et al.*, 2010)

La SOD constituye la primera barrera enzimática que juega un papel vital en el control de la producción celular de ERO. Se trata de un conjunto de metaloenzimas cuya característica funcional fundamental es la aceleración de la dismutación espontánea del O₂^{•-} (McCord *et al.*, 1969). Se distinguen tres grandes familias de SOD: dos de ellas son de localización intracelular (SOD-1 y SOD-2) y una extracelular (SOD-3). La SOD-1 es dependiente de cobre (Cu) y cinc (Zn) (Cu/Zn-SOD) y se encuentra en el citoplasma celular, mientras que la SOD-2 es dependiente de manganeso (Mn) (Mn-SOD) y está presente en la mitocondria. Por otro lado, la forma extracelular de la Cu/Zn-SOD (SOD-3) es la forma predominante de SOD encontrada en el espacio extravascular (McCord *et al.*, 1969; Weisiger *et al.*, 1973, Marklund, 1982a; Marklund *et al.*, 1982b). El mecanismo general de actuación de la SOD se resume en la **Figura 2**.

El control de la producción de H₂O₂ constituye la segunda barrera enzimática contra la propagación de ERO. Las GPx son una familia de enzimas que se pueden dividir en dos grupos, dependientes e independientes de selenio (Se) y se localizan tanto en el citoplasma como en la mitocondria (Mills, 1957). Se trata de un enzima fundamental para la inactivación del H₂O₂ y de otros hidroperóxidos de cadena larga, que utiliza el glutatióno reducido (GSH) como cosustrato para aporta poder reductor, dando lugar a la formación de glutatióno oxidado (GSSG) y al hidroperóxido correspondiente como

producto de reducción (Flohé *et al.*, 1984). La CAT es otra enzima antioxidante que se encuentra principalmente en los peroxisomas (Chance *et al.*, 1979) y, de igual manera que la GPx, cataliza la descomposición del H₂O₂, dando lugar a H₂O y O₂ (Aebi, 1984) (**Figura 2**).

La GR es la encargada de mantener elevada la relación GSH/GSSG para que la GPx pueda funcionar de forma adecuada, ya que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG), utilizando equivalentes redox en forma de NADPH (Carlberg *et al.*, 1985) (**Figura 2**).

Mecanismos no enzimáticos

Además de las enzimas descritas anteriormente, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática, secuestrando los radicales libres que escapan de las enzimas antioxidantes. Dentro de este grupo se encuentran diversas moléculas como las **vitaminas**, el **glutatión**, el **ubiquinol** o los **oligoelementos**.

Glutatión

El glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un antioxidante endógeno capaz de reaccionar con ERO de diferentes maneras. Ya se ha mencionado la función del GSH como sustrato donador de hidrógeno en la reacción catalizada por la enzima GPx (Flohé *et al.*, 1984), oxidándose a GSSG. Además, este antioxidante puede reaccionar directamente con radicales libres como el O₂^{•-}, OH[•] y RO[•], donando un átomo de hidrógeno y formando un radical tiilo (GS[•]) que se dismuta formando GSSG y, posteriormente, se reduce hasta GSH por la GR (Masella *et al.*, 2005).

Vitaminas

Las vitaminas son moléculas capaces de eliminar directamente las ERO, proporcionando una fuente principal de protección contra los efectos dañinos de estos radicales libres (Sies *et al.*, 1995; Rock *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2003). Dichas moléculas no pueden ser sintetizadas por el organismo, por lo que deben ser incluidas en la dieta.

Dentro de las vitaminas antioxidantes destaca la vitamina E. El término genérico de vitamina E se refiere a un conjunto de compuestos liposolubles estrechamente relacionados entre sí, denominados tocoferoles (Herrera *et al.*, 2001). La forma más activa

de la vitamina E es el α -tocoferol, considerado el antioxidante natural más efectivo. Entre sus funciones destaca su capacidad para la eliminación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), entre otros radicales del oxígeno. Además, se conoce bien su interacción en la fase de propagación de la reacción de peroxidación, eliminando el radical lipídico peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), con lo que interrumpe los procesos de reacción en cadena que ocurren durante la propagación de la peroxidación lipídica (Herrera *et al.*, 2001). Su acción sobre éste y otros radicales preserva la integridad estructural y funcional de la célula (Traber *et al.*, 2007).

Los carotenoides también son antioxidantes liposolubles. El más ampliamente distribuido en las plantas es el β -caroteno (Bendich *et al.*, 1989), que constituye la fuente principal de vitamina A o retinol de la dieta. El β -caroteno es un compuesto biológico importante que tiene la capacidad de reaccionar con determinados radicales libres, como el $\text{ROO}\cdot$, el $\text{OH}\cdot$, el $^1\text{O}_2$, el $\text{O}_2\cdot^-$ y otras especies reactivas. Al igual que la vitamina E, el β -caroteno funciona como un inhibidor de la propagación de la lipoperoxidación de las membranas (Bendich *et al.*, 1989).

Ubiquinol

El ubiquinol o coenzima Q (CoQ) tiene como función principal la de ejercer como transportador móvil en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Además, el CoQ tiene un importante protagonismo como antioxidante de membrana (Nohl *et al.*, 1998; Maroz *et al.*, 2009), ya que interviene en el reciclaje de la vitamina E hasta su forma reducida y es capaz de inhibir la síntesis de radicales alquilo y $\text{ROO}\cdot$ de los lípidos, deteniendo, de este modo, la capacidad de propagación del daño peroxidativo.

Oligoelementos

Los oligoelementos como el Cu, el Zn, el Mn y el Se, también son de vital importancia, ya que forman parte de los sitios activos necesarios para la función de las enzimas antioxidantes o actúan como cofactores en la regulación de las enzimas antioxidantes (Chance *et al.*, 1979).

Estrés oxidativo y embarazo

Dado que el embarazo es un estado fisiológico que se acompaña de una demanda energética elevada y de un incremento en los requerimientos de oxígeno, se podría

esperar que durante este periodo se produzca un aumento del estrés oxidativo (Gitto *et al.*, 2002). Además, existen otros factores externos que durante el embarazo podrían resultar más perjudiciales, como la exposición a sustancias tóxicas, al alcohol y al humo del cigarro, fenómenos de los que son crecientes las referencias en la literatura científica en los últimos años (Jauniaux *et al.*, 2007; Floyd *et al.*, 2008; Riley *et al.*, 2011).

De acuerdo con este aumento de estrés oxidativo asociado al embarazo, en diversos estudios se ha descrito que los niveles de distintos biomarcadores (peróxidos lipídicos (Peter Stein *et al.*, 2008), F₂-isoprostanos (Hung *et al.*, 2010; Palm *et al.*, 2009), y 8-OHdG (Hung *et al.*, 2010) en mujeres con embarazos saludables y sin complicaciones, son mayores que en aquéllas que no están embarazadas. Sin embargo, el organismo también es una importante fuente de moléculas antioxidantes que pueden ayudar a controlar el estrés oxidativo (Shoji *et al.*, 2007). De esta forma, los efectos pro-oxidantes que acompañan al embarazo normal, parecen encontrar respuestas antioxidantes compensatorias que mantienen la homeostasis durante la gestación (Halliwell *et al.*, 1993; Halliwell *et al.*, 2004; Gutteridge, 1995).

Un desequilibrio entre ambos procesos se considera responsable de la iniciación o del desarrollo de patologías que afectan a la reproducción (Agarwal *et al.*, 2005; Mistry *et al.*, 2011). Así, se ha sugerido que el estrés oxidativo es el agente causante de una serie de trastornos relacionados con el embarazo (Gupta *et al.*, 2007; Al-Gubory *et al.*, 2010). La disminución de la concentración de glutatión y de las actividades GPx y SOD, además de la reducción del nivel de vitaminas antioxidantes, junto con un aumento de la peroxidación lipídica, son importantes factores relacionados con la patogénesis de la preeclampsia (Kaur *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009). El estrés oxidativo también está estrechamente relacionado con el crecimiento intrauterino retardado (CIR) (Fall *et al.*, 2003). Esta patología se ha relacionado con una mayor prevalencia del síndrome metabólico, de la diabetes *mellitus* tipo 2 y de la enfermedad cardiovascular en la edad adulta (Valsamakis *et al.*, 2006). Otras patologías del sistema reproductor, como la endometriosis, el síndrome del ovario poliquístico, y los abortos espontáneos están relacionados con la presencia de citoquinas inflamatorias y, además, con unos elevados niveles de ERO (El-Far *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2005).

Tanto la ingesta como la composición de la dieta materna son importantes determinantes del crecimiento fetal y su desarrollo, e incluso de aspectos específicos de

la reproducción y de un embarazo exitoso (Mistry *et al.*, 2011). Sin embargo, bajos niveles de antioxidantes son responsables de trastornos en la implantación, alteraciones de la función placentaria, del crecimiento fetal y, por lo tanto, del éxito del embarazo (Mistry *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2005; Al-Gubory *et al.*, 2010). Se ha descrito que las vitaminas antioxidantes, solas o en combinación con otros suplementos, disminuyen la mortalidad fetal y, por tanto, mejoran el pronóstico de éxito del embarazo (Cederberg *et al.*, 2001). En embarazos con complicaciones, la concentración de α -tocoferol es menor que en embarazos normales, lo que sugiere que las necesidades de vitamina E aumentan durante el mismo (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). Una inadecuada alimentación de la madre se ha relacionado con deficiencias de diversos micronutrientes, siendo la principal causa de CIR y de aborto (Fall *et al.*, 2003). La vitamina A es esencial para el desarrollo del feto y del recién nacido (Clagett-Dame *et al.*, 2002). En estudios de intervención, los defectos en el tubo neural de niños nacidos de mujeres que tomaban suplementos, fueron menores que en aquellas que no los tomaban (Klein, 2002). Por otro lado, deficiencias de Zn, Cu, Mn y Se parecen estar implicadas en desórdenes reproductores como el desprendimiento de la placenta, la ruptura prematura de las membranas y el bajo peso al nacer (Mistry *et al.*, 2011). Además, datos recientes (Cetin *et al.*, 2010), indican que los micronutrientes pueden afectar a la fertilidad, embriogénesis y placentación, y pueden ser útiles en la prevención de los resultados adversos del embarazo.

El nivel de antioxidantes y prooxidantes varía entre los individuos, fundamentalmente, debido a diferencias en la dieta y de las condiciones medioambientales, además del estilo de vida. Los antioxidantes enzimáticos y los de la dieta forman parte de complejos sistemas que interactúan entre sí para controlar la producción de ERO y, por tanto, asegurar las defensas contra el estrés oxidativo y prevenir el daño celular. Por consiguiente, un adecuado estado de antioxidantes en la madre, antes del embarazo y durante el mismo, podría ayudar a controlar y prevenir estos mecanismos inducidos por el estrés oxidativo.

Perfil de adipoquinas y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante la gestación

Cambios metabólicos durante el embarazo

Durante el embarazo, muchas funciones fisiológicas se ven modificadas para adaptarse a la nueva situación y permitir un crecimiento y desarrollo adecuados del feto. Así, el metabolismo materno experimenta notables cambios para adaptarse a las nuevas necesidades impuestas por la gestación.

Las primeras etapas de la gestación son consideradas como un estado anabólico, con un aumento de las reservas de tejido graso y un pequeño aumento en la concentración de insulina. Esto favorece la utilización de la glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno, reduciendo la glucogénesis hepática e inhibiéndose la lipólisis. En esta fase, las necesidades energéticas de la unidad fetoplacentaria son limitadas. Por tanto, durante este periodo, se van a ir almacenando nutrientes para satisfacer las demandas, tanto del feto como de la madre, hacia el final del embarazo y durante la lactancia (Butte, 2000; Lain *et al.*, 2007).

A medida que avanza la gestación, va siendo progresivamente menor la cantidad de energía materna almacenada, mientras que aumenta la que se destina a las necesidades de la unidad fetoplacentaria. Para poder ayudar en este aumento de la demanda, las reservas acumuladas previamente comienzan a ponerse en juego, sobre todo a partir de la semana 30 de gestación. Por lo tanto, la etapa última del embarazo es considerada como un estado catabólico, caracterizado por una menor sensibilidad a la insulina y un aumento de la resistencia periférica a la misma. Además, se favorece la lipólisis y la movilización de los depósitos grasos, lo que se traduce en un aumento de los niveles circulantes de AG y glicerol, que son utilizados preferentemente por la madre como sustratos energéticos, reservando la glucosa y los aminoácidos para su utilización por el feto, cuya mayor disponibilidad facilitará el desarrollo fetal (Butte, 2000; Lain *et al.*, 2007) (**Figura 3**).

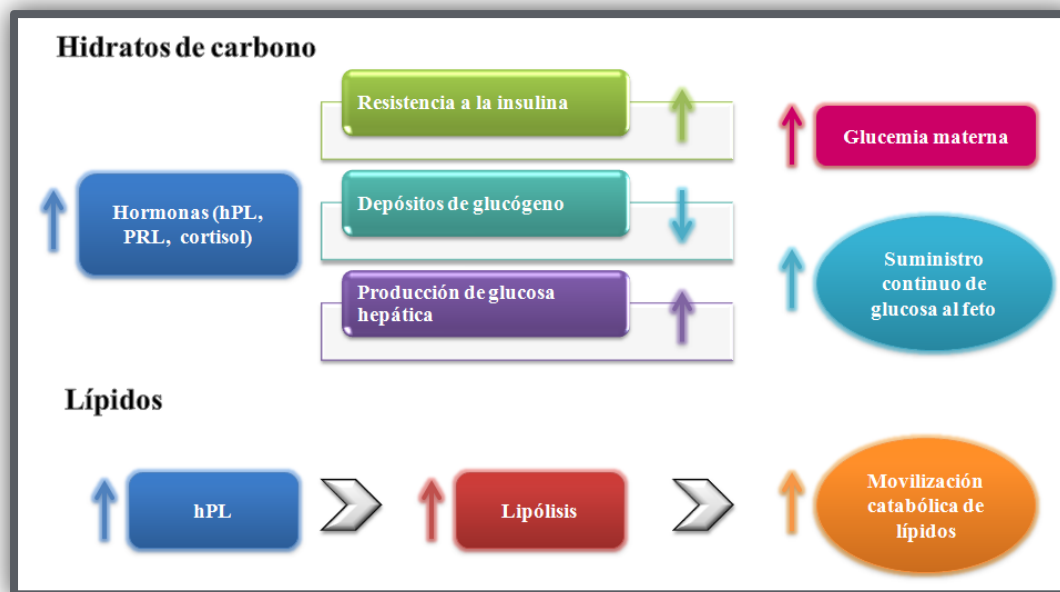


Figura 3. Metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos durante la segunda mitad de la gestación. hPL, lactógeno placentario humano; PRL, prolactina (modificado a partir de Gil *et al.*, 2010)

Por otro lado, el tejido adiposo no sólo almacena nutrientes para satisfacer la elevada demanda energética de los últimos meses del embarazo, sino que también es un tejido metabólicamente activo que tiene un papel esencial en el metabolismo del individuo (Catalano, 2007). El tejido adiposo constituye una importante fuente de citoquinas y mediadores de la inflamación, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , que puede aumentar la resistencia a la insulina, o la adiponectina, que puede disminuirla (Briana, 2009). Estos cambios también pueden afectar a la función vascular. Así, el aumento de la resistencia a la insulina y la alteración del metabolismo lipídico, pueden intervenir en la disfunción endotelial (Paradisi *et al.*, 2002). Por todo ello, el embarazo puede ser entendido como un estado de inflamación sistémica leve y controlada que puede desencadenar enfermedades como la diabetes *mellitus* de tipo gestacional o la preeclampsia, si no se consigue mantener el equilibrio (Butte *et al.*, 2000; Cortelazzi *et al.*, 2007; Miehle *et al.*, 2012).

Adipoquinas

La **adiponectina**, producida por el tejido adiposo, está implicada en la regulación de la resistencia a la insulina y la homeostasis de la glucosa. Su concentración disminuye en situaciones de resistencia a la insulina como la diabetes *mellitus* tipo 2, la obesidad y la enfermedad vascular coronaria (Weyer *et al.*, 2001). Además, tiene propiedades anti-

inflamatorias y anti-aterogénicas (Chandran *et al.*, 2003; Wiecek *et al.*, 2007). A pesar de la importancia de esta hormona en la regulación de la sensibilidad a la insulina en condiciones fisiológicas y patológicas, poco se sabe sobre su labor durante el embarazo. En varios estudios se ha descrito una asociación entre los niveles de adiponectina y el desarrollo de diabetes gestacional o preeclampsia (Mazaki-Tovi *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2006; Miehle *et al.*, 2012), mientras que la información existente respecto al embarazo normal es contradictoria. Así, los niveles de adiponectina durante el embarazo pueden disminuir (Catalano *et al.*, 2006), lo cual sería coherente con la disminución de la sensibilidad a la insulina característica de este estado, o permanecer sin cambios (Cortelazzi *et al.*, 2007; Mazaki-Tovi *et al.*, 2007), entendiéndose ésto como un mecanismo protector contra el aumento gradual de la resistencia a la insulina.

Por otro lado, la **leptina** está implicada en la secreción de insulina, la utilización de glucosa, la síntesis de glucógeno y el metabolismo lipídico (Wauters *et al.*, 2000). Esta hormona es liberada a la circulación sanguínea en función de las reservas de lípidos del organismo y actúa sobre receptores hipotalámicos, disminuyendo la ingesta de comida y aumentando el gasto energético (Wauters *et al.*, 2000). La expresión y la acción de la leptina son modificadas en alteraciones metabólicas asociadas a la resistencia a la insulina, como la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2 (Zimmet *et al.*, 1999) o la preeclampsia y la diabetes gestacional en embarazadas (Miehle *et al.*, 2012). En embarazos saludables, los niveles de leptina en sangre materna aumentan hacia el tercer trimestre de gestación y descienden a sus concentraciones iniciales en el parto (Miehle *et al.*, 2012; Sattar *et al.*, 1998). Estos elevados niveles de leptina en la madre contribuyen a la movilización de las reservas maternas y aumentan la disponibilidad y la transferencia de lípidos a través de la placenta para el feto (Sattar *et al.*, 1998; Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006).

Biomarcadores de inflamación

Los monocitos y macrófagos del tejido adiposo y de la placenta producen citoquinas inflamatorias, como el **factor de necrosis tumoral (TNF)- α** y la **interleuquina (IL)-6**, que pueden favorecer el desarrollo de la resistencia a la insulina observada durante el embarazo (Pickup *et al.*, 2000; Kirwan *et al.*, 2002).

El TNF- α interviene en procesos inflamatorios, en la activación de células endoteliales, en la regulación de actividades metabólicas y en el mecanismo de muerte celular (Saito 2000; Blackburn, 2008; Tosun *et al.*, 2010; Varfolomeev *et al.*, 2004). Por otro lado, la IL-6 estimula la proliferación, invasión y diferenciación de las células del trofoblasto, y regula la respuesta inmune, la hematopoyesis, las reacciones de fase aguda y la inflamación (Saito, 2000; Blackburn, 2008). Por otro lado, la IL-8 regula la angiogénesis, el crecimiento de tumores y la metástasis (Mukaida *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 1992). Durante el embarazo, tiene un papel clave en la dilatación cervical del parto (Keelan *et al.*, 2003). Se trata de una quimioquina inflamatoria que se produce localmente en respuesta a la lesión tisular, llevando principalmente a la selección y activación de los neutrófilos y linfocitos T (Mukaida *et al.*, 1998) y potenciando los efectos proinflamatorios de las otras citoquinas (Blackburn, 2008). En general, las citoquinas están implicadas en el mantenimiento del embarazo normal y en el momento del parto (Saito, 2000; Blackburn, 2008), aunque también se ha observado que una elevación de los niveles de citoquinas, como consecuencia de la alteración de su equilibrio, parece estar relacionado con el aborto espontáneo, el parto prematuro o la preeclampsia (Sibai *et al.*, 2005; Erlebacher *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2005).

Por otra parte, la **proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1**, liberada por células endoteliales y del músculo liso, promueve la entrada de monocitos en el espacio subendotelial (Briana *et al.*, 2009; Skurk *et al.*, 2004; Trayhurn *et al.*, 2004). La expresión de MCP-1 se ha observado en una gran variedad de tejidos durante la progresión de enfermedades inflamatorias, como la obesidad (Basu *et al.*, 2011), la aterosclerosis (Shin *et al.*, 2002), artritis (Taylor *et al.*, 2000) y el cáncer (O'Hayre *et al.*, 2008). Otras moléculas relacionadas con las respuestas inmune e inflamatoria son el **factor de crecimiento nervioso (NGF)**, cuya función principal está relacionada con el crecimiento y supervivencia de las terminaciones nerviosas (Levi-Montalcini *et al.*, 1996) y el **factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)**, que causa proliferación en diversos tejidos como la placenta (Ito *et al.*, 2008; Ferretti *et al.*, 2007). Aunque no se conocen datos que lo confirmen, estos factores podrían verse alterados durante el embarazo, al tratarse de un estado de inflamación fisiológica leve.

Biomarcadores de homeostasis vascular

Las metaloproteasas de la matriz (**MMP**), son enzimas encargadas del remodelado y degradación de la matriz extracelular (Trayhurn *et al.*, 2004; Castellucci *et al.*, 2000; Madan *et al.*, 2009) que van a participar en la degradación de la matriz extracelular de las membranas fetales en el momento del parto (Keelan *et al.*, 2003). Las MMP intervienen en funciones normales del organismo como la embriogénesis, pero también en situaciones patológicas como la artritis, la enfermedad cardiovascular y el cáncer (Chakraborti *et al.*, 2003).

Entre los biomarcadores solubles de activación endotelial e inflamación, nos encontramos con la molécula de adhesión intercelular-1 (**ICAM-1**), la molécula de adhesión celular vascular-1 (**VCAM-1**) y la **E-selectina** (Krieglstein *et al.*, 2001; van Hinsberg, 2001). Las moléculas de adhesión de la familia selectina, como la E-selectina sintetizada en las células endoteliales, interactúan con azúcares de la membrana de los leucocitos y favorecen su unión a las células endoteliales durante el proceso primario de inflamación. En cuanto a las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, también están implicadas en las respuestas inmune e inflamatoria mediante la activación, unión y migración celular (Krieglstein *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004). La expresión de estos biomarcadores puede aumentar como consecuencia de los cambios metabólicos y fisiológicos que tienen lugar durante el embarazo normal (Paradisi *et al.*, 2002), mientras que aumentan de forma significativa durante enfermedades como la aterosclerosis o la preeclampsia, debido a una función alterada de las células endoteliales (Singh *et al.*, 2004; van Hinsberg, 2001; Szarka *et al.*, 2010).

Junto a estas moléculas, el **inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1** es un factor importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular (van Hinsberg, 2001) pero, además, es una proteína de respuesta de fase aguda y sus niveles se encuentran elevados en procesos inflamatorios (Gabay *et al.*, 1999). En embarazos saludables y sin complicaciones, los niveles de este factor aumentan (Coolman *et al.*, 2006), incrementándose aún más en embarazos con complicaciones (Mori *et al.*, 2010).

Ácidos grasos e inflamación

El metabolismo enzimático de los AGPI de 20 átomos de carbono produce una amplia variedad de productos oxidados a los que, en conjunto, se denomina eicosanoides. Los eicosanoides, como las PG, tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) y los

hidróxidos del ácido eicosatetraenoico (HETE), derivan principalmente del AA y del EPA, y se trata de mediadores y reguladores claves en el proceso inflamatorio (Tilley *et al.*, 2001). Estos mediadores están implicados en la modulación de la intensidad y la duración de la respuesta inflamatoria (Tilley *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2011). Sin embargo, la respuesta, en conjunto, depende de las células presentes, de la naturaleza del estímulo, del momento de formación de los eicosanoides, de sus concentraciones y de la sensibilidad de las células y tejidos diana a los eicosanoides formados (Calder, 2008).

Los eicosanoides se sintetizan a través de la acción de las enzimas COX y lipoxigenasa (LOX). Por tanto, entre los ácidos grasos *n*-6 y *n*-3 va a existir competencia por estas enzimas, en relación con la producción de eicosanoides. Como las células inflamatorias normalmente contienen una elevada proporción de AA y baja de EPA, el AA es generalmente el principal sustrato para la síntesis de estas moléculas (Calder, 2001; Simopoulos, 2002). El AA es liberado a partir de la membrana celular por fosfolipasas, en concreto por la fosfolipasa A₂ y, posteriormente, los AG libres (AGL) actúan como sustrato de las enzimas COX y LOX. El AA, por acción de la COX, es el precursor de las PG y de los TX de la serie 2. Los monocitos y los macrófagos producen grandes cantidades de prostaglandina E₂ (PGE₂) y prostaglandina F₂α (PGF₂α); en los neutrófilos, se originan cantidades moderadas de PGE₂, mientras que en los mastocitos se produce prostaglandina D₂ (PGD₂). El metabolismo del AA por acción del enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX), da lugar a un aumento de los derivados hidróxido e hidroperóxido, como el 5-HETE y el ácido 5-hidroperóxido del ácido eicosatetraenoico (5-HPETE) y los LT de la serie 4: leucotrieno A₄ (LTA₄), B₄ (LTB₄), C₄ (LTC₄), D₄ (LTD₄) y E₄ (LTE₄). Los neutrófilos, monocitos y macrófagos producen LTB₄, mientras que los LTC₄, LTD₄ y LTE₄ son producidos por mastocitos, basófilos y eosinófilos (**Figura 4**).

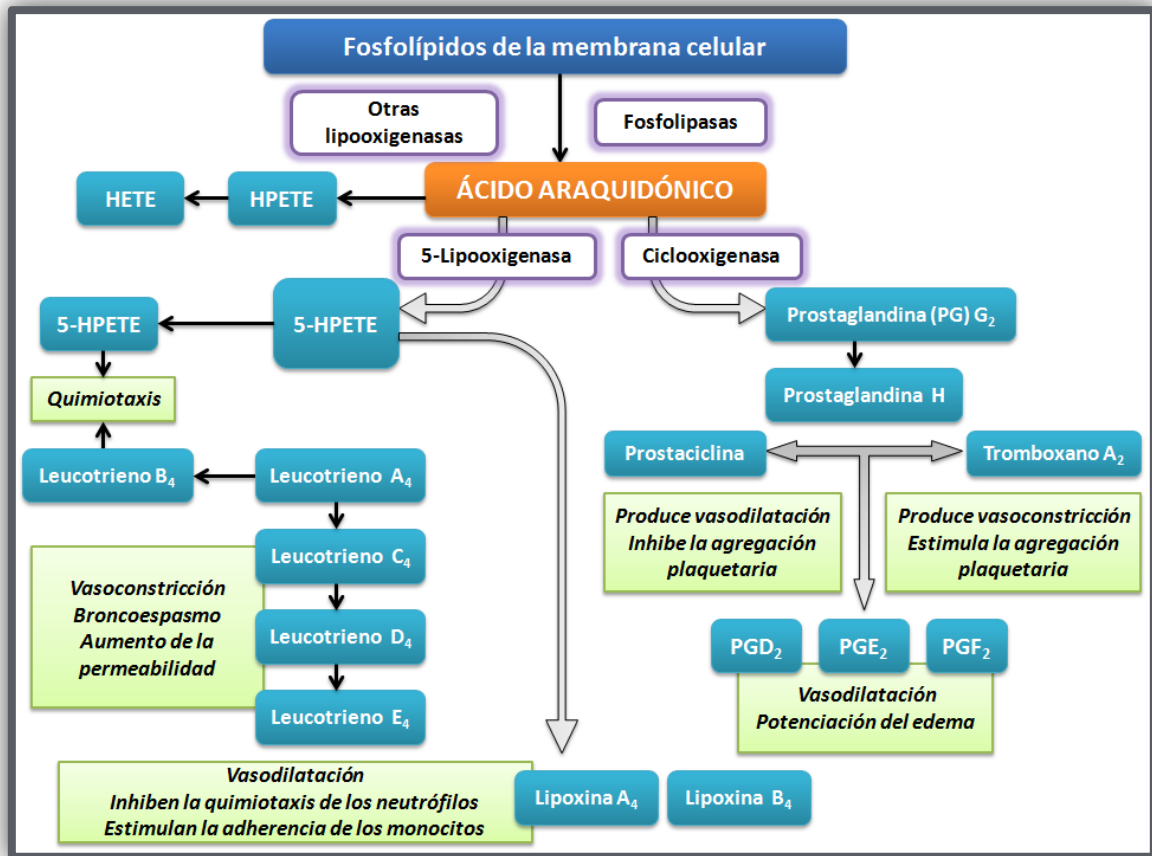


Figura 4. Papel de los eicosanoides derivados del AA en la inflamación. HETE, hidróxido del ácido eicosatetraenoico; HPETE, hidroperóxido del ácido eicosatetraenoico; PG, prostaglandina (modificado a partir de Gil *et al.*, 2010)

A los eicosanoides derivados del AA se les ha atribuido un carácter proinflamatorio (Bagga *et al.*, 2003). Por ejemplo, la PGE₂ induce la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6 en macrófagos, causando edema y vasodilatación (Tilley *et al.*, 2001; Bagga *et al.*, 2003). Además, el LTB₄ es un potente agente quimiotáctico de leucocitos, un activador de neutrófilos e induce la producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 por parte de los macrófagos (Tilley *et al.*, 2001). A pesar de que los eicosanoides derivados del AA se han clasificado generalmente como mediadores proinflamatorios, pueden jugar un importante papel como moduladores de la respuesta inmune a través de complejas interacciones con los leucocitos y, además, su intervención es crucial en las fases iniciales del proceso inflamatorio (Tilley *et al.*, 2001; Simopoulos, 2002). Sin embargo, en elevadas concentraciones, pueden dañar los tejidos y contribuir al desarrollo de desórdenes inflamatorios (Tilley *et al.*, 2001; Simopoulos, 2002). De hecho, una característica común de las enfermedades inflamatorias crónicas, como la

enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide, es una producción excesiva de eicosanoides derivados del AA (Calder, 2001; Jupp *et al.*, 2007).

El EPA también es sustrato de las enzimas COX y LOX, pero da lugar a una familia de eicosanoides diferente: las PG y TX de la serie 3, los LT de la serie 5 y los ácidos hidroxi-EPA. Los eicosanoides derivados del EPA tienen menor poder inflamatorio o, incluso, anti-inflamatorio, comparado con los eicosanoides derivados del AA (Bagga *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2006). El mejor ejemplo de estas diferencias entre los eicosanoides derivados del AA y del EPA es el de LTB₄ y el leucotrieno B₅ (LTB₅). LTB₅, derivado del EPA, es de 10 a 100 veces menos potente como agente atrayente de neutrófilos que el LTB₄, derivado del AA y, por tanto, es un inductor más débil de la inflamación (Goldman *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984). Además, Bagga *et al.* (2003), han descrito que la prostaglandina E₃ (PGE₃), induce una menor producción de IL-6 a partir de macrófagos que la PGE₂.

A su vez, el DHA puede ser metabolizado hasta generar resolvinas, por medio de la actuación de la LOX (Hong *et al.*, 2003). Las resolvinas son mediadores endógenos que actúan a nivel local y poseen potentes propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras (Serhan *et al.*, 20002; Schwab *et al.*, 2007). A nivel celular, intervienen en la reducción de la infiltración de neutrófilos y en la regulación de la producción de citoquinas, quimioquina y ERO, así como disminuyendo la magnitud de la enfermedad inflamatoria (Serhan *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que la resolvina E₁ derivada del DHA protege de la colitis experimental en modelos animales (Weylandt *et al.*, 2007).

Dada la gran diversidad de acciones de los eicosanoides y teniendo en cuenta el hecho de que la mayoría de las células del organismo son capaces de sintetizarlos, no es extraño que estos compuestos estén implicados en numerosos procesos. Entre otros, los eicosanoides parecen intervenir en las manifestaciones clínicas de la atopía a través de su acción en las células inflamatorias, el músculo liso y las células epiteliales (Calder *et al.*, 2010; Kremmyda *et al.*, 2011). Por otro lado, los eicosanoides derivados del AA parecen ser esenciales para el mantenimiento del embarazo, además de intervenir en el parto (Keelan *et al.*, 2003). En la placenta, se producen elevadas cantidades de PGD₂, que interviene en la remodelación de los tejidos gestacionales y en la prevención del parto prematuro (Keelan *et al.*, 2003).

Es importante señalar que las proporciones relativas de las diferentes series de eicosanoides en el organismo dependen del tipo de alimentación. La alimentación habitual en el mundo occidental, a base de vegetales y animales terrestres, lleva a la preponderancia de los eicosanoides derivados del AA. Por otro lado, un elevado consumo de pescado, rico en AGPI *n*-3 como el EPA y el DHA, da lugar a un aumento de las proporciones de estos AG en los fosfolípidos de las células inflamatorias (Yaqoob *et al.*, 2000), quedando parcialmente reemplazado el AA. De acuerdo con esto, se ha descrito que el consumo de aceite de pescado aumenta las concentraciones de EPA y DHA en las células inflamatorias (Yaqoob *et al.*, 2000; Healy *et al.*, 2000) y, como consecuencia, disminuye la producción de eicosanoides derivados del AA, como la PGE₂ (Rees *et al.*, 2006, Trebble *et al.*, 2003), el TXB₂ (Caughey *et al.*, 1996), el LTB₄ (Lee *et al.*, 1984; Schwab *et al.*, 2007) y el LTE₄ (Denzlinger *et al.*, 1995).

Por tanto, una ingesta excesiva de AGPI *n*-6, característica de la dieta occidental, podría potenciar los procesos inflamatorios y, en consecuencia, predisponer a, o exacerbar, enfermedades inflamatorias, mientras que el aumento de la ingesta de pescado graso o suplementos de aceite de pescado, caracterizados por presentar un elevado contenido en AGPI *n*-3, podría disminuir el riesgo de enfermedades inflamatorias como la artritis, diabetes, obesidad y enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, podemos pensar que la presencia de estos AGPI *n*-3 también podría mejorar el estado de inflamación fisiológica característica del embarazo.

Sujetos y Metodología

Sujetos y Metodología

Sujetos

(**Artículo I:** Miles *et al.* “The salmon in pregnancy study-study design, subject characteristics, maternal fish and marine *n-3* fatty acid intake, and marine *n-3* fatty acid status in maternal and umbilical cord blood” *Am J Clin Nutr*, 2011).

Se seleccionó una muestra aleatoria de mujeres embarazadas (n=689) dentro de la zona de captación del *Princess Anne Hospital, Southampton University Hospitals NHS Trust*, (Southampton, UK). Todas ellas recibieron información general acerca del estudio *The Salmon in Pregnancy Study (SiPS)* después de aceptar una invitación por correo para asistir al Hospital a una revisión rutinaria de ultrasonidos, lo que tuvo lugar alrededor de la semana 12 del embarazo. En esta cita, las mujeres que mostraron interés por el estudio (n=383), firmaron un consentimiento escrito para participar, lo que permitió realizar un examen sobre su consumo habitual de alimentos y, en particular, de pescado, así como de su historia familiar de atopía, alergia o asma. Las mujeres embarazadas que habitualmente presentaban un bajo consumo de pescado (menos de dos porciones al mes, sin considerar el atún enlatado) y una historia familiar de atopía, alergia o asma (uno o más parientes de primer grado afectados por atopía, asma o alergia), recibieron una hoja con información detallada sobre el estudio. Posteriormente, a aquellas mujeres que seguían interesadas (n=156), se les realizó una exploración física para incluirlas en el estudio.

Los **criterios de inclusión** fueron edad comprendida entre los 18 y 40 años; menos de 19 semanas de gestación; embarazo único, sano y sin complicaciones; niños con riesgo de atopía (uno o más parientes de primer grado del niño afectados por atopía, asma o alergia); consumo de menos de dos porciones de pescado graso al mes, excluyendo el atún enlatado; no tomar suplementos de aceite de pescado en el momento del estudio o en los tres meses previos. Los **criterios de exclusión** fueron su participación en otro estudio de investigación; diabetes; presencia de cualquier enfermedad autoinmune; problemas de aprendizaje; enfermedad terminal; problemas de salud mental.

Las mujeres que cumplían los criterios de inclusión y seguían interesadas en el estudio, fueron seleccionadas en su revisión rutinaria de ultrasonidos en las semanas

19/20 del periodo gestacional (de aquí en adelante se menciona como semana 20). Finalmente, las mujeres que acudieron al hospital en estado de ayunas y firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, fueron 123. Quince sujetos no completaron el estudio por varias razones (alumbramiento antes de la cita, retirada por sentirse cansada, ocupada o algún tipo de lesión), dejando un total de 54 sujetos en el grupo control y 54 sujetos en el grupo salmón (Miles *et al.*, 2011) (**Figura 5**).

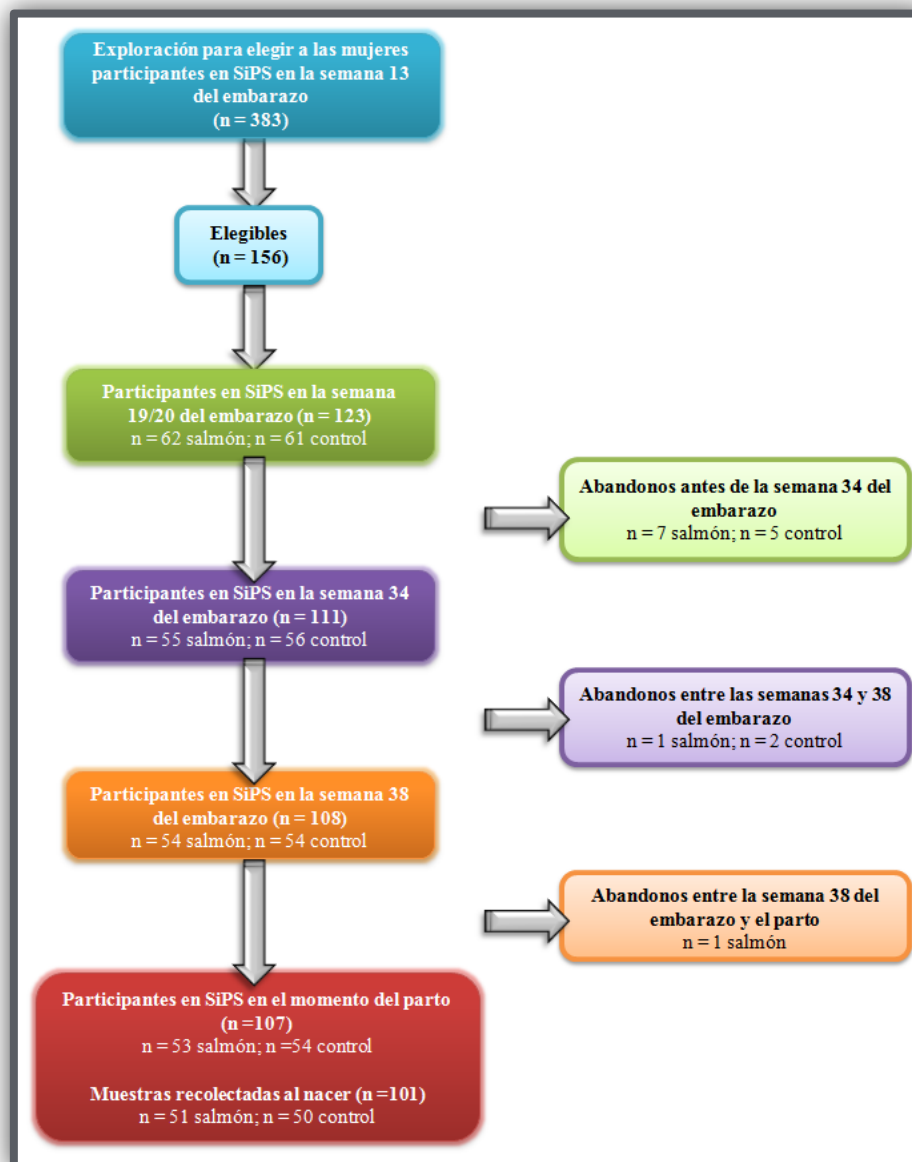


Figura 5. Diagrama de la afluencia de sujetos a lo largo del estudio

Diseño experimental

SiPS fue un estudio controlado, aleatorizado y a simple ciego, en el que las mujeres embarazadas participantes aumentaron su consumo de salmón “hecho a medida”, desde la semana 20 del periodo gestacional hasta el final del embarazo. Este estudio forma parte del Proyecto Europeo denominado *Sustainable Aquafeeds to Maximize the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers* (AQUAMAX; FOOD-CT-2006-16249), dentro del VI Programa Marco de la Unión Europea. Los análisis de laboratorio realizados en SiPS, así como el centro responsable de cada una de las medidas, aparecen en una lista en la **Tabla 1**.

Consideraciones éticas

El protocolo se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el *Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee* (07/Q1704/43). La firma del consentimiento informado por parte de las mujeres embarazadas participantes se obtuvo después de explicar detalladamente el propósito del estudio. Además, SiPS está registrado como estudio clínico de intervención en www.clinicaltrials.gov (NCT 00801502).

Datos de la dieta

Salmón “hecho a medida”

El salmón usado en el estudio se crió en el *Skretting Aquaculture Research Centre*, (Stavanger, Noruega). Su dieta contenía, expresado en g/kg: harina de pescado (298.6), concentrado de soja (141.3), gluten de maíz (99.5), gluten de trigo (29.9), trigo (120.1), aceite de pescado del hemisferio sur (132.1), aceite de colza (132.1), aceite de linaza (33.5), DL-metionina (0.32), L-lisina (0.9), fosfato monocálcico (5.64), y una mezcla de vitaminas y minerales (6.25). Los ingredientes de la dieta del salmón se seleccionaron con el objetivo de que los niveles de contaminantes fueran bajos. El salmón se crió hasta que alcanzó un peso medio de 4 kg y después se sacrificó; así, se produjeron un total de 2280 kg de salmón (eviscerado). Posteriormente, los salmones fueron fileteados en porciones de 150 g y congelados individualmente en bolsas envasadas al vacío en Noruega, desde donde fueron enviados a Southampton y almacenados a -30°C hasta su reparto a las mujeres participantes en el estudio. Las mujeres mantuvieron los filetes de pescado en los congeladores de sus casas hasta el día de cocinarlos.

Tabla 1. Resumen de los análisis de laboratorio realizados como parte del programa *The Salmon in Pregnancy Study* (SiPS) y los centros responsables de las distintas determinaciones.

<i>Análisis</i>	<i>Centro responsable</i>
Composición lipídica del plasma materno y de cordón umbilical y de células mononucleares	Southampton
Composición lipídica del tejido placentario y de cordón umbilical	Southampton
<i>Composición lipídica en membranas de eritrocitos de la madre y de cordón umbilical</i>	<i>Granada</i>
<i>Lípidos, glucosa, hormonas (insulina, adiponectina, leptina), vitaminas A y E, carotenoides, coenzima Q₁₀ y peróxidos lipídicos en el plasma materno y de cordón umbilical</i>	<i>Granada</i>
<i>Biomarcadores de inflamación en el plasma materno y de cordón umbilical</i>	<i>Granada</i>
Metabolitos de la vitamina D en el plasma materno y de cordón umbilical	Bergen
Concentración de mercurio y selenio en eritrocitos de la madre y de cordón umbilical	Bergen
Glutación en eritrocitos de la madre y de cordón umbilical	Clermont Ferrand
Taurina y aminoácidos en plasma materno y de cordón umbilical	Clermont Ferrand
<i>Enzimas antioxidantes en eritrocitos de la madre y de cordón umbilical</i>	<i>Granada</i>
Composición de ácidos grasos de la leche materna	Reading
F ₂ -isoprostanos y prostaglandinas F _{2α} en la orina materna	Uppsala
<i>8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en la orina materna</i>	<i>Granada</i>
Yodo y arsénico en la orina materna	Bergen
Taurina y aminoácidos en la orina materna	Clermont Ferrand
Microbiota fecal de los niños y sus madres	Reading
Subseries de células inmunes en la sangre de las madres y sus hijos	Southampton
Inmunoglobulina E de las madres y sus hijos	Southampton
Interleuquina-13 en plasma de cordón umbilical	Southampton
Perfiles de citoquinas de células mononucleares de las madres y sus hijos, en respuesta a mitógenos, alérgenos y agonistas de los receptores tipo <i>Toll</i>	Southampton
Producción de prostaglandinas E ₂ por las células mononucleares de las madres y de cordón umbilical, en respuesta a mitógenos y agonistas de los receptores tipo <i>Toll</i> .	Southampton
Citoquinas de la leche materna, CD14 soluble, inmunoglobulina A secretora, factores de crecimiento transformante-β1 y -β2	Reading

El contenido detallado de nutrientes y contaminantes en los filetes de salmón se determinó en el *National Institute of Nutrition and Seafood Research* (Bergen, Noruega). Cada porción de 150 g de salmón contenía (de media) 30.5 g de proteína, 16.4 g de grasa, 0.57 g de EPA (20:5 *n*-3), 0.35 g de DPA (22:5 *n*-3), 1.16 g de DHA (22:6 *n*-3), 3.56 g de AGPI *n*-3, 4.1 mg de α -tocoferol, 1.6 mg de γ -tocoferol, 6 μ g de vitamina A (como suma de todos los retinoides), 14 μ g de vitamina D₃ y 43 μ g de Se; la variación en el contenido de todos los nutrientes entre varias porciones analizadas fue < 5% para proteínas y grasa, < 10% para ácidos grasos individuales, α -tocoferol y γ -tocoferol y < 20% para la vitamina A, vitamina D₃ y selenio. De esta forma, dos porciones de salmón a la semana, normalmente proporcionarían 3.45 g de EPA+DHA, 28 μ g de vitamina D₃ y 86 μ g de Se.

El contenido de contaminantes (150 g/ porción de salmón) fue: 52.5 pg de dioxinas y de policlorobifenilos similares a las dioxinas (PCB), 0.492 μ g de diclorodifenil-tricloroetanos totales, 51 μ g de arsénico, 0.15 μ g de cadmio, 3.45 μ g de mercurio y 0.15 μ g de plomo. El salmón salvaje del Océano Pacífico presenta niveles de 0.1 a 0.4 pg/g de dioxinas y de PCB (Hites *et al.*, 2004), que equivaldrían a unos 15-60 pg en una porción de 150 g, mientras que el salmón salvaje del contaminado mar Báltico presenta niveles de 3.3 a 17 pg/g de dioxinas (Isosaari *et al.*, 2006), que equivaldrían a 495-2250 pg en una porción de 150 g. En el trabajo de Hites *et al.* (2004), el contenido de dioxinas y de PCB en salmón criado con aceite de pescado comercial fue de 0.9 a 2.9 pg/g, lo que equivaldría a 135-435 pg en una porción de 150 g. Los contaminantes del salmón usado en SiPS proporcionaron menos del 12.5% de la ingesta semanal tolerable provisional de la FAO/WHO de dioxinas y PCB, menos del 11.5% de arsénico, menos del 0.0000008% de cadmio, 0.0000025% de mercurio y menos del 0.0000002% de plomo (Miles *et al.*, 2011).

Recolección de datos y de muestras

Una vez en el Hospital, las 123 mujeres participantes proporcionaron una muestra de sangre y otra de orina y completaron un cuestionario de frecuencia de alimentos (FFQ) que recopilaba la ingesta de alimentos en las 12 semanas previas. El FFQ que se utilizó ha sido validado para su uso en mujeres embarazadas (Crozier *et al.*, 2006; Crozier *et al.*, 2008; Crozier *et al.*, 2009; Borland *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 1996), adaptado en Southampton según las necesidades de la población incluida en el estudio. Dicho cuestionario incluía preguntas específicas sobre la frecuencia de consumo de distintos tipos de pescado: “pescado graso” (incluyendo el atún enlatado), “pescado no graso”,

“barritas y platos de pescado” y “marisco”. Las categorías de frecuencia de consumo fueron: “más de una vez al día”, “una vez al día”, “3-6 veces por semana”, “1-2 veces por semana”, “una vez cada 15 días”, “una vez al mes”, “una vez cada dos-tres meses” o “nunca”.

Las mujeres embarazadas se asignaron de forma aleatoria a uno de dos grupos, de acuerdo con una tabla de números aleatorios. A las mujeres del *grupo Control* (n=61), se les pidió que continuaran con su dieta habitual. Estas mujeres recibieron una hoja informativa que describía los posibles beneficios saludables del consumo de pescado graso durante el embarazo, así como las recomendaciones del gobierno sobre el consumo de una o dos comidas de pescado graso a la semana por parte de las mujeres embarazadas (*Scientific Advisory Committee & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. The Stationery Office, 2004*). También recibieron un libro de cocina, proporcionándoles recetas para una alimentación saludable durante el embarazo. A las mujeres del segundo grupo, el *grupo Salmón* (n=62), se les pidió que incorporaran en sus dietas dos porciones de salmón a la semana, desde la semana de entrada en el estudio (semana 20 del periodo gestacional) hasta dar a luz. Estas mujeres también recibieron un libro de cocina que les proporcionó recetas para preparar y cocinar salmón. El salmón se repartía a domicilio mensualmente, en porciones individuales de 150 g, envasadas al vacío y congeladas; se proporcionaron suficientes porciones tanto para la mujer como para su pareja. Todas las mujeres recibieron un diario en el que debían ir anotando cualquier tipo de pescado y producto del mar consumido durante el transcurso del estudio, así como el modo de prepararlo y cocinarlo.

Posteriormente, las mujeres participantes asistieron a la clínica entre las semanas 32 y la 34 del periodo gestacional (a partir de ahora se menciona como semana 34) y en la semana 38 del embarazo, en ambas ocasiones, en ayunas. En estas citas, las mujeres proporcionaron una muestra de sangre y una muestra de orina. En la semana 34 volvieron a completar el FFQ, mientras que, en la semana 38, suministraron una muestra fecal. En el momento del nacimiento, se recogió la sangre de cordón de la vena umbilical después del pinzamiento del cordón, inmediatamente después del parto. Por otro lado, se recolectó tejido del cordón umbilical y de la placenta, que se guardaron congelados.

Tras el nacimiento, las mujeres proporcionaron muestras de leche materna en los días 1, 5, 14 y 28 después de dar a luz y las heces de sus hijos se recolectaron en los días 7, 14, 28 y 84. La composición corporal de los niños se determinó 14 días después del nacimiento, mediante densitometría ósea por absorción de rayos X. Las mujeres completaron un FFQ 3 meses después de dar a luz. Teniendo los niños 6 meses de edad, sus madres y, cuando fue posible, también sus padres, asistieron al *Wellcome Trust Clinical Research Facility, Southampton General Hospital*. En esta visita, se completó un FFQ para evaluar la alimentación de los niños (n=86) (Marriot *et al.*, 2008), a los que se les realizó una prueba de punción cutánea para un rango de alérgenos comunes (ácaro del polvo doméstico, huevo, proteína de la leche de vaca, salmón, hierbas comunes, árboles comunes, gato, perro, hongos comunes, penicilina), así como una evaluación de una posible dermatitis atópica y su severidad (*Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis: the SCORAD index. Dermatology*, 1993). Esta prueba también se les realizó a las madres (n=86) y a los padres (n=75) de estos niños. Asimismo, se recolectó una pequeña muestra de sangre de los niños (< 5 ml) (Miles *et al.*, 2011). En la **Figura 6** se puede observar un esquema que hace referencia a las distintas muestras recolectadas durante el estudio y los momentos en que se obtuvieron.

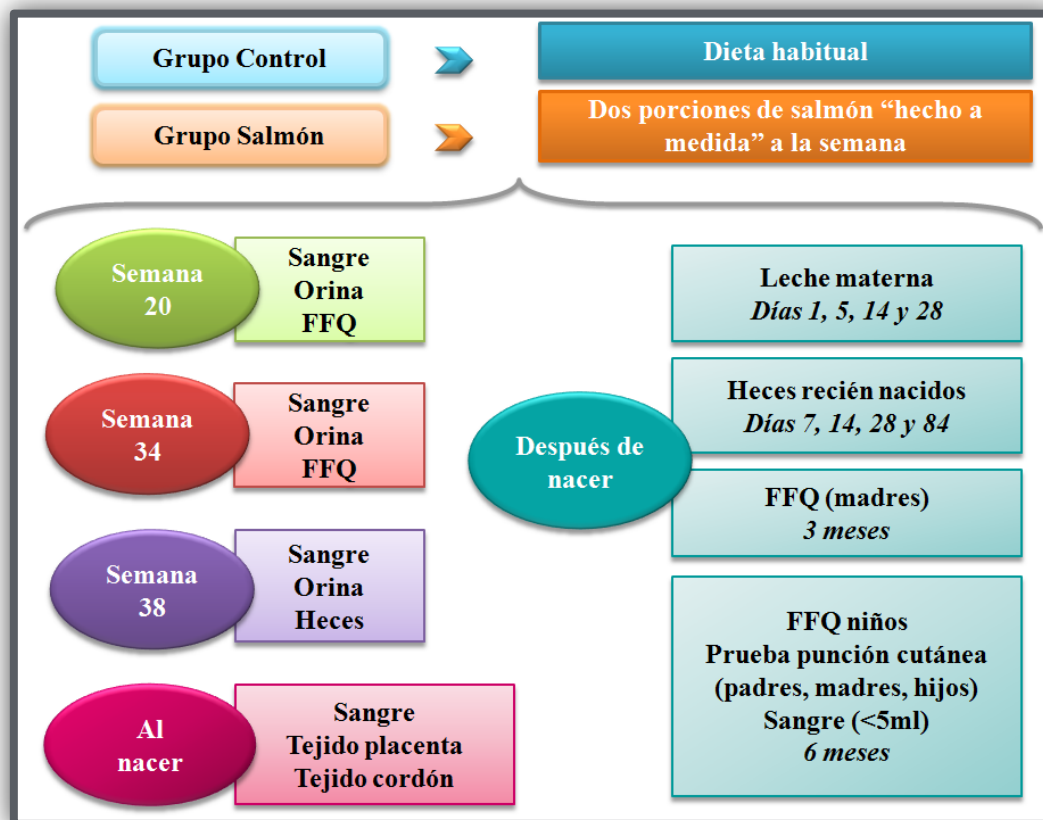


Figura 6. Recolección de muestras en los distintos momentos del estudio

Todas las muestras se mantuvieron a 4°C tras la extracción. Inmediatamente, la sangre obtenida fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 min y 4°C para separar el plasma. Después de centrifugar las muestras, el botón de eritrocitos se lavó con una solución de ClNa 0.9%. Las alícuotas de plasma y eritrocitos lavados se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su análisis.

Determinación del perfil de ácidos grasos del plasma

Los lípidos totales se extrajeron con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 vol/vol), añadiendo 5 ml de butil-hidroxi-tolueno (BHT) (50 mg/l) como antioxidante para la extracción. La fosfatidilcolina (PC), que normalmente proporciona el 75% de los fosfolípidos plasmáticos, se aisló en cartuchos de sílice adsorbida con aminopropilo, por extracción en fase sólida. Los ésteres metílicos de la PC del plasma se generaron mediante una reacción con metanol que contenía un 2% (vol/vol) de ácido sulfúrico, a 50°C durante dos horas. Los ésteres metílicos se separaron en una columna BPX-70 (30 m x 220 µm; grosor de 0.25 µm), en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP6890 y fueron analizados mediante el método descrito previamente por Thies *et al.* (2001). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los estándares analizados previamente y se cuantificaron usando el software ChemStation. El perfil lipídico del plasma se expresa como el porcentaje de cada ácido graso respecto al total (Miles *et al.*, 2011).

Determinación del perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos

La determinación se realizó mediante el método previamente descrito por Lepage *et al.*, (1986). En tubos Pyrex® con tapón de rosca y cierre hermético, se añadieron 2 ml de una solución de benceno/metanol (1:4 vol/vol). Seguidamente, se adicionaron 200 µl de cloruro de acetilo en agitación suave como agente metilante. A continuación, se cerraron los tubos herméticamente y se introdujeron en un baño a 100°C durante una hora. Al cabo de dicho tiempo, se dejaron enfriar los tubos en agua helada y se paralizó la reacción con 5 ml de carbonato potásico (K₂CO₃) al 6%. Posteriormente, se agitaron los tubos y se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos a 4°C para recoger el sobrenadante bencénico. Después, se congelaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras se

descongelaron y se llevaron a sequedad en corriente de nitrógeno para luego resuspenderlas en 100 µl de benceno. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se separaron y detectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP5890, mediante una columna capilar (60 m x 32mm; grosor de 0.25 µm) impregnada con SpTM 2330 FS (Supelco Inc., Bellefonte, Palo Alto, CA, USA). Se establecieron las siguientes condiciones para el análisis cromatográfico: nitrógeno gas portador (1 ml/min), nitrógeno gas auxiliar (25 ml/min), hidrógeno (30 ml/min) y aire (400 ml/min). Manteniendo el inyector y el detector a 275°C, el programa de temperaturas fue el siguiente: temperatura inicial de 165°C (3 min); aumento de 2°C/min hasta 195°C (2 min); aumento de 3°C/min hasta alcanzar 211°C (6.5 min); descenso de 15°C/min hasta el valor inicial de 165°C. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los estándares analizados previamente y se cuantificaron mediante el software ChemStation. El perfil lipídico de los eritrocitos se expresa como el porcentaje de cada ácido graso respecto al total.

Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo

(Artículo II: García-Rodríguez *et al.* “Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women?-The Salmon in Pregnancy Study” *Antioxid Redox Signal*, 2011).

Isoprostanos en orina

Se analizó la concentración de 8-iso-PGF₂α en orina mediante un radioinmunoanálisis altamente específico y validado, descrito previamente (Basu, 1998). La reactividad cruzada del anticuerpo 8-iso-PGF₂α con 15-ceto-13, 14-dihidro-8-iso-PGF₂α, 8-iso-PGF₂β, PGF₂α, 15-ceto-PGF₂α, 15-ceto-13, 14-dihidro-PGF₂α, TXB₂, 11β-PGF₂α, 9β-PGF₂α y 8-iso-PGF₃α fue de 1.7, 9.8, 1.1, 0.01, 0.01, 0.1, 0.03, 1.8 y de 0.6%, respectivamente. El límite de detección del análisis fue de 23 pmol/l. Las concentraciones de 8-iso-PGF₂α se ajustaron de acuerdo con la concentración de creatinina en orina y se expresan como nmol/mmol. Junto con la concentración de isoprostanos, también se analizaron una serie de parámetros: la edad de las mujeres embarazadas, su índice de masa corporal (BMI) y el hábito de fumar, debido a la posible relación que podría existir entre ellos y el nivel de isoprostanos en orina (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Peróxidos lipídicos plasmáticos

Se utilizó un kit comercial colorimétrico (Oxystat, Biomedica, Vienna, Austria) para determinar la concentración total de peróxidos lipídicos (LPO) en las muestras de plasma. La concentración de peróxidos se determinó por reacción de los peróxidos biológicos con peroxidasa y una reacción de color posterior usando 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina como sustrato. Después de añadir ácido sulfúrico como solución de parada, el líquido coloreado se midió fotométricamente a 450 nm. Se usó un calibrador para calcular la concentración de peróxidos biológicos circulantes en la muestra, con un límite de detección de 7 $\mu\text{mol/l}$. Los valores de LPO se expresan como $\mu\text{mol/l}$ (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Concentración de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en orina

Las concentraciones de 8-OHdG en orina se determinaron mediante un kit de análisis inmunoenzimático (ELISA) de competición (JAICA, Fukuroi, Japan). El anticuerpo monoclonal primario y la muestra o estándar se añadieron a microplacas previamente cubiertas con 8-OHdG. Después de una incubación durante una hora a 37°C, se lavaron las placas con una solución tampón salina fosfatada (PBS). A continuación, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano a cada pocillo, se incubó a 37°C durante otra hora y se volvió a lavar con PBS. Tras la adición del sustrato enzimático a cada uno de los pocillos, se dejó que reaccionara a temperatura ambiente durante 15 min más. Finalmente, se terminó la reacción con ácido fosfórico. La absorbancia de cada uno de los pocillos se determinó a 450 nm con un lector de microplacas. El rango de determinación fue de 0.125-10 ng/ml. La concentración de 8-OHdG se ajustó según los niveles en orina de creatinina y se expresa como ng de 8-OHdG/mg de creatinina (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Creatinina en orina

La concentración de creatinina en las muestras de orina se midió en un autonalizador Konelab 20 (Thermo Clinical Lab Systems, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Evaluación del sistema de defensa antioxidante

(Artículo III: García-Rodríguez *et al.* *Antioxid Redox Signal*. "Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women?" *Antioxid Redox Signal*, 2012a).

Actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante en eritrocitos

La concentración de **hemoglobina (Hb)** de las muestras se determinó espectrofotométricamente mediante el método colorimétrico de la cianometahemoglobina (Drabkin, 1948). El reactivo de Drabkin (1.0 g de bicarbonato sódico (NaHCO₃), 0.05 g de cianuro de potasio (KCN) y 0.20 g de ferricianuro potásico (K₃Fe(CN)₆, pH 7.2, Sigma Diagnostics), se diluyó en un litro de agua desionizada antes de su uso. En un tubo de ensayo se pusieron 5 ml del reactivo y 20 µl de sangre y se dejó incubar durante 10 min. Cinco ml del reactivo se utilizaron como blanco. La Hb de la muestra, en presencia de K₃Fe(CN)₆, se oxidó a metahemoglobina, que a su vez se combinó con iones cianuro, convirtiéndose en cianometahemoglobina, de coloración parda. La lectura se efectuó a 540 nm y se utilizó una curva patrón para calcular la concentración de Hb en las muestras (0.08-08 mg/ml) (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Actividad CAT (EC 1.11.1.6). Se analizó mediante el método descrito por Aebi (1984). Después de ajustar la concentración de Hb de la muestra original a 1 g/l (Drabkin, 1948), se añadieron 10 µl de la muestra a 90 µl de tampón fosfato 50 mM, pH 7.0, en una placa de 96 pocillos. Luego, se añadieron 50 µl de H₂O₂ 30 mM. En el rango ultravioleta (UV), el H₂O₂ se caracteriza por presentar un aumento continuo de la absorción paralelo a un descenso de la longitud de onda (λ). La descomposición del H₂O₂ se determinó, por el descenso de absorbancia a 240 nm. El blanco se preparó con 150 µl de tampón. La diferencia de absorbancia por unidad de tiempo es la medida de la actividad CAT, que se expresa como nmol/(l. g Hb) (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Actividad SOD (EC 1.5.1.1). Se determinó mediante el uso de xantina y xantina oxidasa para la generación de radicales O₂⁻ que, a su vez, oxidan al citocromo c, generando color que puede medirse a 450 nm. La SOD presente en la muestra compite con el citocromo c oxidado en su reacción con los radicales O₂⁻ (McCord *et al.*, 1969). Después de ajustar la concentración de Hb de la muestra original a 1 g/l (Drabkin, 1948), se realizó una extracción previa del sobrenadante con cloroformo y etanol. A continuación, se mezclaron 40 µl del sobrenadante con 240 µl de reactivo (Ferricitocromo c 50 µM (*Horse heart cytochrome c, superoxide dismutase-free*, Sigma type III), xantina 1 mM y tampón carbonato sódico (20 mM, pH 10.0), con 0.1 M de

EDTA), en una placa de 96 pocillos. La mezcla se incubó durante 90 s. Luego, se añadieron 20 µl de xantina oxidasa 15 mU/ml y se determinó la variación de absorbancia a 450 nm, durante 3 min. Se determinó la concentración de SOD en función de una curva con soluciones estándar de SOD (0.75-15 U/ml). Se define una unidad de SOD como la cantidad de enzima que reduce en un 50% el citocromo generado de forma espontánea. Los resultados se expresan como U/mg Hb (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Actividad GR (EC 1.6.4.2). Se determinó mediante la medición de la tasa de oxidación del NADPH en presencia de GSSG (Carlberg *et al.*, 1985). Después de ajustar la concentración de Hb de la muestra original a 10 g/l (Drabkin, 1948), se añadieron 30 µl de la muestra a una solución con 205 µl de GSSG (3.7 mM, Sigma G-4376), en tampón fosfato 147 mM con 0.47 mM de EDTA pH 7.2 y, todo ello, en una placa de 96 pocillos. Después de incubar la placa durante 5 min a 37 °C, se añadieron 40 µl de NADPH (2.25 mM) en NaHCO₃ (0.1%), a cada uno de los pocillos. Posteriormente, se determinó el descenso de absorbancia durante otros 5 min. En el rango UV, el NADPH presenta un aumento continuo de absorción paralelo a un descenso en la λ, que puede seguirse a 340 nm. El blanco se preparó con 30 µl de agua junto con la mezcla de reactivos. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de GR que cataliza la transformación de 1 µmol de NADPH por min. Los resultados se expresaron como U/g Hb (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Actividad GPx (EC 1.11.1.9). Se determinó mediante la reacción acoplada del enzima con hidroperóxido tert-butílico (t-BOOH) como sustrato (Flohé *et al.*, 1984). Después de ajustar la concentración de Hb de la muestra original a 10 g/l (Drabkin, 1948), se añadieron 25 µl de muestra a 125 µl de tampón fosfato 100 mmol/l, 1 mmol/l EDTA, pH 7.4, azida sódica 0.1 M (500:10), 25 µl de enzima GR (2.4 U/ml, cat. no. G-4751; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en tampón fosfato 0.1 M, 25 µl de GSH 10 mM (Sigma, G-4251) en tampón fosfato 0.1 M y 25 µl de NADPH (1.25 mM, Sigma, N-1630) en NaHCO₃ (0.1%) y todo ello en una placa de 96 pocillos, que se incubó durante 3 min a 37°C. A continuación, se añadieron 25 µl de t-BOOH (12 mM) para que comenzara la reacción. El descenso de absorbancia se midió durante otros 5 min a 340 nm. En presencia de GR y NADPH, el GSSG es convertido inmediatamente en GSH junto con la oxidación de NADPH a NADP⁺. El blanco se preparó con 25 µl de agua junto con la mezcla de reactivos. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de

GPx que cataliza la transformación de 1 μmol de NADPH por min. Los resultados se expresan en U/g Hb (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos

La concentración de **Se** en los eritrocitos (~ 0.5 g), se determinó mediante espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo en un aparato Agilent 7500 ICPMS, siguiendo el método previamente descrito por Julshamn *et al.* (2007). Se añadieron 0.5 ml de H_2O_2 y 2 ml de ácido nítrico ultrapuro a 0.5 g de eritrocitos y la mezcla se calentó. Después de enfriarse, los eritrocitos digeridos se diluyeron hasta un volumen final de 10 ml. La concentración de Se (^{78}Se) en las muestras de glóbulos rojos se calculó usando un calibrador estándar externo. La concentración de Se se expresa como $\mu\text{g Se/kg}$ eritrocitos (RBC) (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

El contenido de **glutatión** se determinó mediante HPLC con detección fluorescente a 420 nm, como describieron Cereser *et al.* (2001) y se expresa como $\mu\text{mol/g}$ Hb. Previamente al análisis, los eritrocitos fueron descongelados y lisados en tampón fosfato 25 mM (pH 6). El hemolizado (50 μl) se trató con 50 μl de una solución de DL-ditiotreitol (DTT) para la determinación del glutatión total y otros 50 μl fueron tratados inmediatamente con 50 μl de tampón fosfato 25 mM, para la determinación del GSH. Después de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 50 μl de éster etílico de glutatión como estándar interno para las dos determinaciones. Las muestras se derivatizaron y desproteinizaron mediante la adición de 850 μl de ácido metafosfórico (MPA) al 6% (w/v). Las proteínas que precipitaron después de centrifugar las muestras (5 min, 10 000 g, 4°C), fueron eliminadas. Se neutralizaron y diluyeron 100 μl del sobrenadante, mediante la adición de 300 μl de tampón fosfato 25 mM (pH 6). Cincuenta μl de esta mezcla se derivatizaron 15 min a temperatura ambiente, con 50 μl de una solución de ortoftalaldehido (OPA). Estas muestras se neutralizaron y diluyeron, añadiendo 200 μl de tampón fosfato 25 mM (pH 6). A continuación, se inyectaron 20 μl de muestra en el aparato de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La separación de los aductos GSH-OPA se realizó a 37 °C en una columna de sílice de fase reversa C-18 (150 x 4.60 mm; tamaño de partícula de 5 μm) de Phenomenex (Le Pecq, Francia), seguido de la detección fluorimétrica a 420 nm. El HPLC estaba constituido por una bomba Dionex P680 (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France), un detector de fluorescencia Dionex RF2000 y un dispensador de muestras Dionex ASI100. Los

derivados se eluyeron usando un gradiente de acetonitrilo al 10% y al 50% en un tampón fosfato sódico (pH 6) durante 5 min, seguido de acetonitrilo al 50% durante 5 min, con un flujo de 0.5 ml/min. La integración de los cromatogramas se realizó usando el software Chromeleon de Dionex (Versión 6.80). El contenido de GSH se calculó utilizando una curva estándar determinada bajo las mismas condiciones. La concentración de GSSG se obtuvo mediante la sustracción de los valores de GSH a los valores de glutatión total (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Concentraciones de vitaminas

Las concentraciones en plasma de α - y γ -tocoferol, retinol y CoQ se determinaron mediante un sistema HPLC acoplado a un detector electroquímico (HPLC-EC), según Battino *et al.* (2004), después de su extracción con 1-propanol. Se extrajeron 100 μ l de muestra con 300 μ l de 1-propanol que se agitó durante 60 s. Después de centrifugar a 11200 *g* durante 10 min, en una centrifugadora de mesa para viales Eppendorf, se inyectaron 30 μ l del sobrenadante en el HPLC. El sistema HPLC estaba constituido por una bomba Beckman System Gold 125 (Beckman Instrumentes, Fullerton, CA), un dispensador de muestras Water 717 Plus (Milford, MA, USA), y una columna de acero inoxidable (15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro), con un relleno de 3 mm de ODS Supercosil, además de un detector electroquímico ESA Coulochem III. Los cromatogramas se integraron usando el Gold Beckman System. En el caso del CoQ, la fase móvil estaba constituida por 20 mM de perclorato de litio, 10 mM de ácido perclórico, un 20% de etanol y un 80% de metanol con un flujo de 1 ml/min; el electrodo 1 se fijó a -0.50 voltios (V), el electrodo 2 se fijó a +0.35 V. Las concentraciones de α - y γ -tocoferol y de retinol se determinaron con una fase móvil distinta, constituida por perclorato de litio 20 mM, ácido perclórico 10 mM, agua purificada al 10% y acetonitrilo al 90% con un flujo de 1.5 ml/min; el electrodo 1 se fijó a -0.50 V y el electrodo 2 a +0.40V. Las muestras se trataron de igual forma que en el caso del CoQ y se inyectaron 50 μ l del sobrenadante para la determinación del retinol y 15 μ l para la de tocoferol. El β -caroteno se determinó después de la extracción con 1-propanol y se inyectaron 50 μ l de muestra en un sistema HPLC, Waters 2695. La detección de los β -carotenos se realizó mediante un detector UV (996 Diodo, Waters) a 450 nm, con un cartucho Nova-Pak[®] C18 (4 μ m, 4.6 x 250mm, Waters) precedido por una columna Nova-Pak[®] C18 (4 μ m, 3.9 x 20mm, Waters). Todos los compuestos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares individuales. Como todas las vitaminas analizadas son

liposolubles, las concentraciones se expresan por ml de plasma y en relación con los lípidos plasmáticos totales (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Análisis bioquímicos

(Artículo IV: García-Rodríguez *et al.* “Effect of salmon consumption on plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers during gestation”, 2012b).

La **glucosa**, los **TAG**, los **fosfolípidos** y el **colesterol HDL (HDLc)** y **total** del plasma se midieron espectrofotométricamente usando kits comerciales de análisis enzimático de Spinreact (Girona, Spain) (*Glucose*, Ref.1001191, *Triglycerides*, Ref. 1001311, *Phospholipids*, Ref. 1001140; *HDL cholesterol*, Ref. 1001096 y *Total cholesterol*, Ref. 1001091), adaptados al análisis en placas de 96 pocillos, de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los resultados se determinaron usando soluciones estándar para la calibración de glucosa, TAG, fosfolípidos, HDLc y colesterol total. La concentración de **colesterol LDL (LDLc)** se calculó usando la fórmula de Friedewald *et al.* (1972). La **resistencia a la insulina** se calculó mediante el **modelo de evaluación homeostático (HOMA-IR)**, definido mediante la ecuación $HOMA-IR = \text{glucosa en ayunas (mg/dl)} \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) / 405$ (Matthews *et al.*, 1985). Los valores de glucosa, TAG, fosfolípidos, HDLc, LDLc y colesterol total se expresan como mg/dl (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Determinación de adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular

(García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Se utilizaron kits de anticuerpos monoclonales humanos de LINCOPlex™ (Linco Research, St Charles, MO, USA) para determinar la concentración de:

- La **IL-6** (CV: 7.8%), la **IL-8** (CV: 7.9%), el **TNF- α** (CV: 7.8%), la **MCP-1** (CV: 7.9%), el **HGF** (CV: 7.7%), el **NGF** (CV: 6.0%), la **insulina** (CV: 5.1%) y la **leptina** (CV: 7.9%) (Cat. #HADK2-61K-B).

- La **sICAM-1** (CV: 7.9%), la **sVCAM-1** (CV: 4.5%), la **sE-selectina** (CV: 11.2%), la **MMP-9** (CV: 6.8%), el **tPAI-1** (CV: 11.8%) y la **adiponectina** (CV: 9.2%) (Cat. #HCVD1-67AK).

Estos biomarcadores se analizaron en el Luminex® 200™ System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este equipo utiliza la tecnología X-Map que se desarrolla en base a la citometría de flujo, el láser, las microesferas y el procesamiento de señales digitales. Las microesferas son de polietileno y cada una es teñida internamente con fluoróforos que absorben luz en distintas proporciones de rojo e infrarrojo, creando un espectro único en cada microesfera de acuerdo con las proporciones de dichos fluoróforos. A cada microesfera se le asigna un anticuerpo específico para la determinación de un analito en particular. El principio de la técnica es muy similar al ELISA en sándwich, con la presencia de un anticuerpo primario (unido a las microesferas), un anticuerpo secundario biotinilado y, como revelador, la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). El equipo detecta la coloración del interior de la microesfera con el láser rojo y, la fluorescencia derivada del anticuerpo secundario conjugado con SAPE, con el láser verde (**Figura 7**).

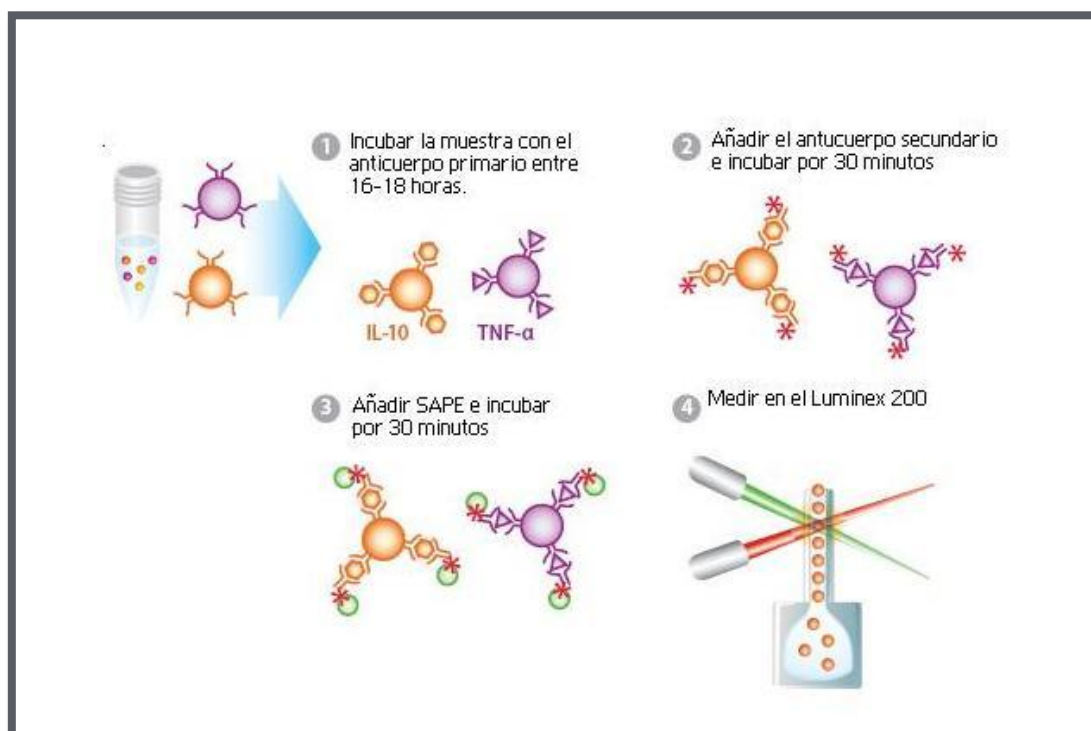


Figura 7. Método de determinación de antígenos diversos utilizando un sistema LINCplex.

Los valores de insulina se expresan como mU/l, los de adiponectina y sVCAM-1 como mg/l, los de leptina, MMP-9, sE-selectina, sICAM-1 y tPAI-1, como µg/l, los de HGF como pg/l, y los de IL-6, IL-8, MCP-1, NGF y TNF-α se expresan como ng/l (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) 15.0 para Windows. Los valores $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

En el **Artículo I** (Miles *et al.*, 2011), los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) o como media y el rango intercuartílico apropiado. La distribución normal de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Previamente se calculó que un tamaño de muestra de 50 mujeres por grupo tendría un poder del 93% con un error de tipo I o $\alpha < 0.05$, en relación con las variables principales de estudio. Los datos de ingesta de pescado y de los AGPI-CL $n-3$ se compararon entre grupos mediante el test U de Mann Whitney. Los datos de EPA y DHA del plasma materno se compararon entre grupos a lo largo del embarazo (semanas 20, 34 y 38), mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas de doble vía (tiempo y grupo de tratamiento como factores). Se realizaron también comparaciones pareadas entre grupos para EPA y DHA del plasma materno, en momentos concretos y entre grupos. Además, se realizaron comparaciones pareadas entre grupos para EPA y DHA del plasma de cordón umbilical, mediante la prueba t de Student para muestras independientes.

En los **Artículos II** (García-Rodríguez *et al.*, 2011), **III** (García-Rodríguez *et al.*, 2012a) y **IV** (García-Rodríguez *et al.*, 2012b), los datos se expresan como media \pm SEM. La distribución normal de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre grupos de tratamiento (Control y Salmón) a lo largo del embarazo (semanas 20, 34 y 38), se evaluaron mediante un modelo lineal general para medidas repetidas. Se realizó el test de Bonferroni a *posteriori* para evaluar las diferencias específicas dentro de cada grupo entre los distintos momentos del periodo gestacional. En cuanto a los porcentajes de las distintas categorías del hábito de fumar (nunca, en el

pasado y fumadores actuales), las diferencias entre grupos se compararon usando el test de Chi-cuadrado (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Cuando los valores iniciales eran diferentes, los análisis estadísticos se corrigieron utilizando los valores basales como covariable (ANCOVA) (García-Rodríguez *et al.*, 2011; García-Rodríguez *et al.*, 2012a; García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Las diferencias estadísticas entre las madres en la semana 38 del embarazo y la sangre de cordón, se analizaron mediante una t de Student para muestras relacionadas. Las diferencias entre los grupos Control y Salmón se compararon mediante una t de Student para muestras independientes. Las correlaciones entre los distintos parámetros se estimaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson en el caso de que los valores estuvieran distribuidos normalmente y una ρ de Spearman cuando se trataba de otro tipo de distribución.

Resultados

Resultados

Características generales de las mujeres embarazadas y de sus hijos

En la **Tabla 2** se observan las características de las mujeres embarazadas, de sus embarazos y de los recién nacidos. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de mujeres en cuanto a la edad, altura o peso en el momento de entrar al estudio, tampoco respecto a la respuesta frente una prueba de punción cutánea. Durante el estudio, no se observaron, ni se informó de efectos adversos sobre la salud (Miles *et al.*, 2011).

Tabla 2. Características de las mujeres participantes en SiPS y de sus embarazos

	Control		Salmón	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<i>Edad (años)</i>	61	28.4 ± 0.6	62	29.5 ± 0.5
<i>Altura (cm)</i>	61	165.6 ± 0.9	62	165.4 ± 0.8
<i>Peso (kg)</i>	61	71.3 ± 2.0	62	67.5 ± 1.6
<i>Primer embarazo (n)</i>	61	23	62	27
<i>Prueba cutánea de alergenidad (n)</i>	38	21	48	31
<i>Duración del embarazo (d)</i>	54	277 ± 2	53	282 ± 1
<i>Tipo de parto (n):</i>				
<i>Vaginal normal</i>		35		35
<i>Cesárea electiva</i>	54	2	53	3
<i>Cesárea de urgencia</i>		7		5
<i>Instrumental</i>		10		10
<i>Peso al nacer (g)</i>	54	3425 ± 82	53	3449 ± 72
<i>Circunferencia de la cabeza al nacer (cm)</i>	54	34.7 ± 0.2	53	34.5 ± 0.2
<i>Apgar score 1 minuto después</i>		8.5 ± 0.2		8.5 ± 0.2
<i>Apgar score 5 minutos después</i>	54	9.1 ± 0.1	53	9.1 ± 0.1
Hábito de fumar	Control		Salmón	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
<i>Nunca</i>	31		34	
<i>En el pasado</i>	21		24	
<i>En la actualidad</i>	9		4	

Los valores se expresan como media ± SEM. No hubo diferencias significativas entre grupos

Características del embarazo

La duración media del embarazo fue unos cinco días más larga en el grupo Salmón, pero sin diferencias significativas en duración respecto al grupo Control (**Tabla 2**). El tipo de parto y el peso, la circunferencia de la cabeza y el bienestar de los recién nacidos (evaluado mediante el *Apgar score*) se determinaron inmediatamente después de nacer. No se encontraron diferencias entre grupos (Miles *et al.*, 2011) (**Tabla 2**).

Ingestas de pescado, EPA y DHA

Las ingestas de pescado, EPA y DHA se muestran en las **Tablas 3 y 4**. El FFQ confirmó que las mujeres participantes en el estudio presentaban una baja ingesta de pescado graso. El cuestionario de la semana 34 evidenció que todas las mujeres del grupo Salmón tomaron pescado graso 1-2 veces a la semana, lo que se interpretó como 1.5 veces por semana (**Tabla 3**). Por tanto, en la semana 34 del embarazo, el consumo de pescado graso por el grupo Salmón fue significativamente más elevado que en el grupo Control (medias de 1.5 y 0 veces por semana, para el grupo Salmón y el Control, respectivamente; $P < 0.001$) (**Tabla 3**). Este cambio en la ingesta de pescado graso desde la semana 20 del embarazo a la 34 (-0.04 y 1.21 veces por semana para los grupos Control y Salmón, respectivamente) fue significativamente diferente entre los dos grupos ($P < 0.001$). En la semana 34 del periodo gestacional, las ingestas de EPA, DHA y EPA+DHA a partir de la dieta completa, de marisco y de pescado graso fueron significativamente mayores en el grupo Salmón comparado con el grupo Control (en todos los casos, $P < 0.001$) (**Tabla 4**). De acuerdo con los datos del FFQ, la ingesta media diaria de EPA+DHA a partir del pescado total aumentó en 270 mg en el grupo Salmón, mientras que en el grupo Control descendió 12 mg ($P < 0.001$) (Miles *et al.*, 2011).

Tabla 3. Frecuencia de consumo semanal de pescado y productos del mar en el grupo Control y el grupo Salmón durante el tiempo del estudio

Grupos de pescado	Datos del FFQ de la semana 34			Datos de los diarios de pescado (media de las semanas 21 a la 38)		
	Control (n=54)	Salmón (n=55)	P-valor	Control (n=47)	Salmón (n=49)	P-valor
Pescado no graso	0.25 (0.08, 1.5)	0.5 (0.25, 1.5)	0.204	0.33 (0.06, 0.56)	0.17 (0.06, 0.33)	*0.036
Platos y barritas de pescado	0.18 (0, 0.5)	0.1 (0, 0.25)	0.866	0 (0, 0.11)	0 (0, 0)	*0.002
Pescado graso	0 (0, 0.14)	1.5 (1.5, 1.5)	*<0.001	0 (0, 0.07)	1.94 (1.87, 2.00)	*<0.001
Marisco	0 (0, 0)	0 (0, 0.1)	0.076	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.507

Los valores se refieren al número medio (rango intercuartílico) de veces por semana

*Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), usando el test U de Mann Whitney

Tabla 4. Ingestas de los AGPI-CL $n-3$ a partir de marisco, de pescado graso y del resto de la dieta en los grupos Control y Salmón, calculadas a partir del FFQ de la semana 34 del embarazo

	Resto de la dieta			Marisco			Pescado graso		
	Control	Salmón	P-valor	Control	Salmón	P-valor	Control	Salmón	P-valor
EPA	12 (3, 35)	134 (128, 146)	*< 0.001	12 (3, 35)	133 (128, 146)	*< 0.001	0 (0, 15)	122 (122, 122)	*< 0.001
DHA	20 (6, 67)	269 (261, 298)	*< 0.001	20 (5, 63)	267 (259, 298)	*< 0.001	0 (0, 27)	249 (249, 249)	*< 0.001
EPA+DHA	30 (9, 103)	403 (309, 444)	*< 0.001	30 (8, 97)	403 (387, 444)	*< 0.001	0 (0, 41)	371 (371, 371)	*< 0.001

Los valores se refieren al número medio (rango intercuartílico) de mg por día; n=54 en el grupo Control y n=55 en el grupo Salmón

*Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), usando el test U de Mann Whitney.

Los diarios sobre la ingesta de pescado manifestaron que la frecuencia media de consumo semanal del salmón del estudio en el grupo Salmón fue de 1.94 porciones, mientras que la frecuencia media de consumo semanal de pescado graso en el grupo Control fue de cero porciones ($P<0.001$). La frecuencia de consumo de pescado total fue de 2.11 porciones a la semana en el grupo Salmón y de 0.47 porciones a la semana en el grupo Control ($P<0.001$). Los diarios sobre la ingesta de pescado mostraron que el 80% de las voluntarias del grupo Salmón tomaron dos (o más) porciones del salmón del estudio por semana, durante el 81% de las semanas que duró la intervención. Además, el 24.5% de las voluntarias del grupo Salmón tomaron dos o más porciones del salmón del estudio por semana, desde la semana 21 del embarazo hasta la semana 38. Los datos del consumo de pescado y productos del mar de los diarios se utilizaron para calcular las ingestas diarias de EPA y DHA: las ingestas medias diarias a partir del pescado total fueron de 162 mg de EPA, 326 mg de DHA, y 491 mg de EPA+DHA para el grupo Salmón, y de 10 mg de EPA, 16 mg de DHA y 24 mg de EPA+DHA para el grupo Control, durante la intervención (en todos los casos, $P<0.001$) (Miles *et al.*, 2011)

EPA y DHA en plasma materno y de cordón

Los porcentajes de EPA y DHA en el plasma materno aparecen representados en la **Figura 8**. La presencia de estos ácidos grasos en el plasma fue similar en ambos grupos en el momento inicial del estudio (20 semanas). Se detectó un efecto significativo del tratamiento, así como del tratamiento por el tiempo de interacción en las proporciones de EPA y DHA en el plasma materno ($P<0.001$, en todos los casos). Los porcentajes de EPA y DHA disminuyeron durante el embarazo en el grupo Control ($P=0.029$ y 0.008 , respectivamente), mientras que aumentaron en el grupo Salmón ($P<0.001$, en ambos casos). Los niveles de EPA y DHA en el plasma materno fueron diferentes entre los dos grupos de tratamiento en las semanas 34 y 38 del embarazo ($P<0.001$). Las diferencias en los porcentajes de EPA y DHA en el plasma materno entre las semanas 20 y 34 y las semanas 20 y 38 del periodo gestacional fueron significativamente diferentes entre grupos ($P<0.001$, en todos los casos) (Miles *et al.*, 2011).

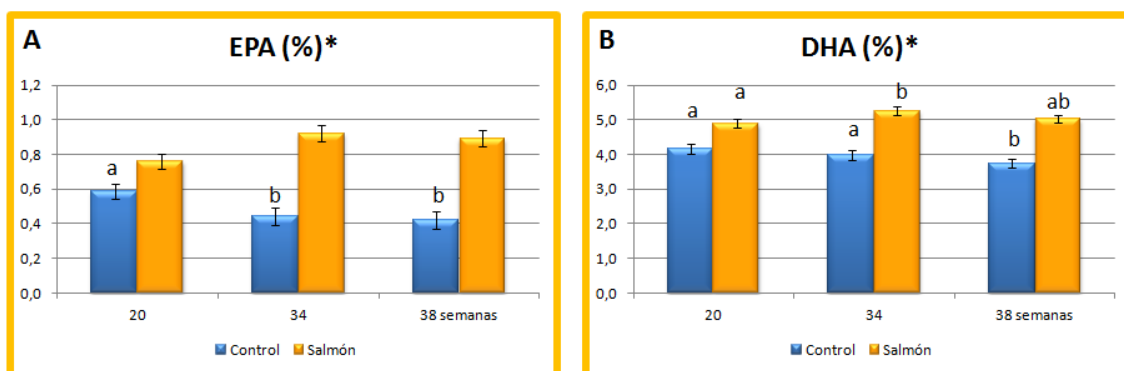


Figura 8. Concentraciones de (A) EPA y (B) DHA en plasma materno en los grupos Control y Salmón. Los datos se expresan como media \pm SEM g/100 g de AG totales. *Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), usando un ANOVA de doble vía. Las distintas letras indican diferencias significativas entre diferentes momentos del periodo gestacional, dentro de cada grupo ($P < 0.05$).

Los porcentajes de EPA y DHA en el plasma de cordón umbilical fueron significativamente más elevados en el grupo Salmón que en el grupo Control (EPA: 0.32 ± 0.2 y 0.63 ± 0.04 en los grupos Control y Salmón, respectivamente, $P < 0.001$; DHA: 6.4 ± 0.2 y 7.4 ± 0.2 en los grupos Control y Salmón, respectivamente, $P < 0.001$) (Miles *et al.*, 2011).

Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos

La composición de AG en las membranas de los eritrocitos maternos a lo largo del embarazo se ha representado como porcentaje de peso respecto al total (Tabla 5). La Tabla 6 muestra los porcentajes en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón). Los coeficientes de correlación entre los distintos AG analizados en las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos, en los dos grupos del estudio, se pueden observar en la Tabla 7.

Perfil de ácidos grasos en las membranas de los eritrocitos maternos

Los resultados de nuestro estudio revelaron que no se alcanzaron diferencias significativas entre el grupo Control y Salmón en relación a la proporción de los AG de membranas de eritrocitos. Durante el embarazo, en ambos grupos se observó un aumento significativo de los porcentajes de palmítico, AA, lignocérico y DHA (P entre < 0.001 y 0.014), mientras que los porcentajes de LA, ALA y DPA disminuyeron de forma

significativa ($P < 0.001$, < 0.001 y 0.029 , respectivamente). Globalmente, no hubo modificaciones en los distintos AG, excepto en el caso de los AGMI, que disminuyeron su proporción en las membranas de eritrocitos durante el periodo gestacional en los dos grupos ($P < 0.011$) (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) durante el embarazo, en las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón)

	Grupo						P-valor		
	Control (n=54)			Salmón (n=54)			Fuente de variación		
	20 semanas	34 semanas	38 semanas	20 semanas	34 semanas	38 semanas	Grupo (G)	Tiempo (T)	Interacción (G x T)
%									
<i>Palmítico C16:0</i>	23.94 ± 2.02 ^a	25.70 ± 2.86 ^b	25.85 ± 4.13 ^b	23.45 ± 1.57 ^a	25.34 ± 2.89 ^b	26.22 ± 4.13 ^b	0.639	<0.001	0.570
<i>Estearico C18:0</i>	17.00 ± 7.30	15.04 ± 1.59	15.09 ± 1.70	16.60 ± 7.19	15.03 ± 1.35	15.81 ± 4.98	0.864	0.060	0.662
<i>Oleico C18:1 n-9</i>	14.03 ± 2.87	14.32 ± 1.92	14.50 ± 1.95	13.73 ± 2.52	14.31 ± 1.77	14.15 ± 2.59	0.476	0.326	0.872
<i>Linoleico C18:2 n-6</i>	8.22 ± 2.26 ^a	7.78 ± 1.90 ^{ab}	6.85 ± 2.47 ^b	8.11 ± 2.07 ^a	7.57 ± 1.85 ^{ab}	6.56 ± 2.72 ^b	0.444	<0.001	0.956
<i>Linolenico C18:3 n-3</i>	0.25 ± 0.19 ^{ab}	0.31 ± 0.13 ^a	0.21 ± 0.10 ^b	0.24 ± 0.10 ^a	0.32 ± 0.16 ^b	0.18 ± 0.07 ^c	0.592	<0.001	0.634
<i>AA C20:4 n-6</i>	10.66 ± 2.85	10.55 ± 3.52	12.39 ± 4.02	11.60 ± 2.85	11.30 ± 3.22	12.34 ± 4.00	0.214	0.014	0.586
<i>c-5,8,11,14,17-EPA C20:5 n-3</i>	0.46 ± 0.38	0.51 ± 0.27	0.49 ± 0.22	0.48 ± 0.25	0.50 ± 0.24	0.37 ± 0.21	0.290	0.159	0.239
<i>Lignocérico C24:0</i>	2.90 ± 0.94 ^a	3.92 ± 1.12 ^b	3.72 ± 0.98 ^b	3.00 ± 0.85 ^a	3.70 ± 1.07 ^b	3.69 ± 1.19 ^b	0.697	<0.001	0.603
<i>Nervónico C24:1</i>	6.63 ± 1.80	6.66 ± 1.45	6.49 ± 1.07	7.05 ± 1.74	6.79 ± 1.36	6.79 ± 1.48	0.165	0.670	0.809
<i>c-7,10,13,16,19-DPA C22:5 n-3</i>	1.65 ± 0.62	1.60 ± 0.68	1.46 ± 0.88	1.85 ± 0.65 ^a	1.62 ± 0.67 ^{ab}	1.42 ± 0.78 ^b	0.463	0.029	0.521
<i>c-4,7,10,13,16,19-DHA C22:6 n-3</i>	3.59 ± 1.41 ^a	4.54 ± 2.04 ^b	4.96 ± 2.12 ^b	4.23 ± 1.61	4.67 ± 1.90	4.87 ± 2.04	0.373	0.001	0.396
AGS	39.40 ± 3.84	41.60 ± 3.71	40.47 ± 8.66	38.51 ± 4.39	40.05 ± 6.58	39.45 ± 8.01	0.164	0.135	0.906
AGI	60.60 ± 3.83	58.40 ± 3.71	59.53 ± 8.66	61.49 ± 4.38	59.95 ± 6.58	60.55 ± 8.01	0.164	0.135	0.906
AGMI	24.56 ± 5.95	22.78 ± 1.63	22.41 ± 1.10	24.57 ± 5.74	22.97 ± 1.29	23.39 ± 3.83	0.428	0.011	0.606
AGDI	14.45 ± 2.88	14.92 ± 2.01	14.90 ± 2.03	14.17 ± 2.58	14.84 ± 1.75	14.57 ± 2.67	0.470	0.232	0.928
AGPI	30.00 ± 5.73	30.79 ± 3.48	30.18 ± 4.21	30.32 ± 5.75	30.64 ± 2.92	29.27 ± 5.17	0.675	0.385	0.688
AGPI (n-6)	24.29 ± 5.06	24.13 ± 3.03	23.28 ± 3.18	23.76 ± 4.42	23.84 ± 2.64	22.61 ± 4.33	0.297	0.126	0.945
AGPI (n-3)	5.70 ± 2.11	6.65 ± 2.62	6.90 ± 2.70	6.56 ± 2.14	6.79 ± 2.49	6.66 ± 2.54	0.443	0.138	0.304
AGPI>18C (n-6)	1.63 ± 0.63	1.44 ± 0.48	1.53 ± 0.73	1.48 ± 0.38	1.43 ± 0.52	1.48 ± 0.60	0.316	0.357	0.711
AGPI>18C (n-3)	5.70 ± 2.11	6.65 ± 2.62	6.90 ± 2.70	6.56 ± 2.14	6.79 ± 2.49	6.66 ± 2.54	0.443	0.138	0.304
II	2.95 ± 0.46	2.88 ± 0.51	3.07 ± 0.93	3.12 ± 0.56	3.07 ± 0.80	3.07 ± 0.87	0.168	0.673	0.588

Los valores se expresan como media ± SEM. Las distintas letras indican diferencias estadísticas entre los distintos momentos del periodo gestacional dentro de cada grupo ($P < 0.05$). AA, ácido araquidónico; AGDI, ácidos grasos diinsaturados; AGI, ácidos grasos insaturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; DHA, ácido docosahexaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico; II, índice de insaturación

Ácidos grasos en las membranas de eritrocitos maternos y de sangre de cordón

Al comparar el perfil de AG de las membranas de eritrocitos de la sangre de cordón de los recién nacidos con la de sus madres del grupo Salmón, se observó un menor porcentaje de palmítico, lignocérico y nervónico, así como una menor proporción de AGMI en la sangre de cordón (P entre 0.006 y 0.048), mientras que los porcentajes de EPA, AGPI $n-3$ y AGPI $>18C$ $n-3$ fueron significativamente mayores en la sangre de cordón de los recién nacidos que en la de sus madres ($P=0.042$, 0.002 y 0.002, respectivamente). Por otro lado, en el grupo Control no se encontraron diferencias significativas en el perfil de AG de eritrocitos entre madres y cordón. Al comparar los dos grupos del estudio, se observó que la concentración de EPA fue significativamente menor en el grupo Salmón comparado con el grupo Control, únicamente en las madres a las 38 semanas de gestación ($P=0.010$). Sin embargo, en la sangre de cordón de los recién nacidos del grupo Salmón las proporciones de AGPI $n-3$ y, concretamente, los de cadena larga, AGPI $>18C$ $n-3$, fueron significativamente mayores ($P=0.044$, en ambos casos), comparado con el grupo Control (Tabla 6).

Correlaciones entre los ácidos grasos de las membranas de eritrocitos maternos y de sangre de cordón

Se observaron correlaciones negativas significativas entre las madres y sus hijos en la proporción de AGPI $n-6$ tanto en el grupo Control [$n=33$, $r=-0.391$, $P=0.025$] como Salmón [$n=34$, $r=-0.485$, $P=0.004$]. Por otro lado, en el grupo Control, los porcentajes de palmítico, esteárico, lignocérico, y los AGMI, AGPI y AGPI ($n-6$) se correlacionaron negativamente de forma significativa [$n=34$, $r=-0.459$, $P=0.006$; $n=34$, $r=-0.451$, $P=0.007$; $n=34$, $r=-0.349$, $P=0.043$; $n=34$, $r=-0.350$, $P=0.046$; $n=33$, $r=-0.488$, $P=0.004$, $n=33$, $r=-0.391$, $P=0.025$, respectivamente], mientras que para el AA y el DHA la correlación fue positiva [$n=34$, $r=0.488$, $P=0.003$; $n=34$, $r=0.423$, $P=0.013$]. En el grupo Salmón, sólo se encontraron correlaciones positivas significativas entre las proporciones de AGS y AGI de madres e hijos [$n=34$, $r=0.366$, $P=0.033$ y $n=34$, $r=0.366$, $P=0.033$, respectivamente] (Tabla 7).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón)

	Grupo				P-valor			
	Control (n=50)		Salmón (n=51)		Fuente de variación			
	38 semanas	Cordón	38 semanas	Cordón	Madre-Cordón		Grupo	
					Control	Salmón	38 semanas	Cordón
%								
<i>Palmítico C16:0</i>	25.34 ± 0.63	24.50 ± 0.96	23.23 ± 0.61	22.75 ± 1.18	0.364	*0.021	0.687	0.515
<i>Estéarico C18:0</i>	14.94 ± 0.28	14.31 ± 0.51	16.03 ± 0.89	13.69 ± 0.73	0.360	0.062	0.403	0.737
<i>Oleico C18:1 n-9</i>	14.48 ± 0.32	14.89 ± 0.55	13.87 ± 0.42	13.58 ± 0.73	0.567	0.744	0.435	0.463
<i>Linoleico C18:2 n-6</i>	7.13 ± 0.41	7.11 ± 0.54	6.42 ± 0.46	6.45 ± 0.52	0.976	0.968	0.578	0.549
<i>Linoléico C18:3 n-3</i>	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.461	0.082	0.173	0.576
<i>AA C20:4 n-6</i>	12.63 ± 0.62	12.20 ± 0.65	12.58 ± 0.66	12.18 ± 0.70	0.508	0.668	0.931	0.829
<i>c-5,8,11,14,17-EPA C20:5 n-3</i>	0.49 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.094	*0.042	*0.010	0.243
<i>Lignocérico C24:0</i>	3.62 ± 0.15	3.19 ± 0.16	3.62 ± 0.21	2.81 ± 0.17	0.104	*0.006	0.785	0.316
<i>Nervónico C24:1</i>	6.55 ± 0.18	6.33 ± 0.26	6.67 ± 0.26	5.49 ± 0.32	0.499	*0.007	0.205	0.093
<i>c-7,10,13,16,19-DPA C22:5 n-3</i>	1.56 ± 0.15	1.50 ± 0.14	1.38 ± 0.13	1.59 ± 0.15	0.800	0.282	0.789	0.471
<i>c-4,7,10,13,16,19-DHA C22:6 n-3</i>	5.12 ± 0.34	5.15 ± 0.35	5.02 ± 0.34	5.65 ± 0.37	0.953	0.150	0.902	0.242
<i>AGS</i>	39.81 ± 1.41	37.86 ± 1.46	39.11 ± 1.14	38.57 ± 1.27	0.301	0.697	0.647	0.778
<i>AGI</i>	60.19 ± 1.41	62.13 ± 1.46	60.90 ± 1.14	61.40 ± 1.27	0.303	0.712	0.646	0.770
<i>AGMI</i>	22.22 ± 0.18	22.07 ± 0.29	23.47 ± 0.75	21.75 ± 0.35	0.702	*0.048	0.105	0.340
<i>AGDI</i>	14.82 ± 0.34	15.74 ± 0.32	14.33 ± 0.47	15.22 ± 0.31	0.083	0.167	0.474	0.554
<i>AGPI</i>	31.02 ± 0.64	31.67 ± 0.76	29.42 ± 0.92	32.13 ± 0.81	0.593	0.062	0.353	0.476
<i>AGPI (n-6)</i>	23.67 ± 0.54	24.41 ± 0.64	22.56 ± 0.79	23.75 ± 0.66	0.456	0.349	0.374	0.717
<i>AGPI (n-3)</i>	7.35 ± 0.41	7.26 ± 0.41	6.86 ± 0.41	8.38 ± 0.37	0.858	*0.002	0.687	*0.044
<i>AGPI >18C (n-6)</i>	1.58 ± 0.12	1.34 ± 0.08	1.54 ± 0.10	1.51 ± 0.08	0.162	0.808	0.772	0.102
<i>AGPI >18C (n-3)</i>	7.35 ± 0.41	7.26 ± 0.41	6.86 ± 0.41	8.38 ± 0.37	0.858	*0.002	0.687	*0.044
<i>II</i>	3.18 ± 0.15	3.38 ± 0.16	3.08 ± 0.14	3.43 ± 0.17	0.333	0.080	0.915	0.802

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre las madres y la sangre de cordón en ambos grupos, usando el test t de Student para muestras relacionadas y entre los grupos Control y Salmón, en las madres y en la sangre de cordón de sus recién nacidos, utilizando un test t de Student para muestras independientes. AA, ácido araquidónico; AGDI, ácidos grasos diinsaturados; AGI, ácidos grasos insaturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; DHA, ácido docosahexaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico; II, índice de insaturación

Tabla 7. Coeficientes de correlación entre los perfiles de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos

	Control		P-valor	Salmón		P-valor
	n	r		n	r	
%						
<i>Palmítico 16:0</i>	34	-0.459	*0.006	37	-0.212	0.208
<i>Esteárico 18:0</i>	34	-0.451	*0.007	37	-0.125	0.463
<i>Oleico 18:1 n-9</i>	34	-0.289	0.097	37	-0.047	0.784
<i>Linoleico 18:2 n-6</i>	34	-0.076	0.671	37	-0.063	0.710
<i>Linoléico 18:3 n-3</i>	34	-0.258	0.140	37	-0.102	0.548
<i>AA 20:4 n-6</i>	34	0.488	*0.003	37	0.060	0.722
<i>c-5,8,11,14,17-EPA 20:5 n-3</i>	34	-0.104	0.558	37	0.057	0.739
<i>Lignocérico 24:0</i>	34	-0.349	*0.043	37	-0.102	0.550
<i>Nervónico 24:1</i>	34	0.019	0.916	37	0.001	0.997
<i>c-7,10,13,16,19-DPA 22:5 n-3</i>	34	-0.290	0.096	37	-0.014	0.936
<i>c-4,7,10,13,16,19-DHA 22:6 n-3</i>	34	0.423	*0.013	37	0.281	0.092
AGS	33	0.162	0.369	34	0.366	*0.033
AGI	33	0.164	0.363	34	0.367	*0.033
AGMI	33	-0.350	*0.046	34	-0.035	0.844
AGDI	33	-0.218	0.223	34	-0.272	0.120
AGPI	33	-0.488	*0.004	34	-0.312	0.072
AGPI (n-6)	33	-0.391	*0.025	34	-0.485	*0.004
AGPI (n-3)	33	0.253	0.156	34	0.335	0.052
AGPI>18C (n-6)	33	-0.265	0.135	34	-0.241	0.170
AGPI>18C (n-3)	33	0.253	0.156	34	0.335	0.052
II	33	0.117	0.518	34	0.211	0.231

*Diferencias significativas ($P < 0.05$); r, coeficiente de correlación. AA, ácido araquidónico; AGDI, ácidos grasos diinsaturados; AGI, ácidos grasos insaturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; DHA, ácido docosahexaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico II, índice de insaturación

Biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y orina maternos

Los resultados de los distintos indicadores de estrés oxidativo aparecen representados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Biomarcadores de oxidación lipídica y del DNA en mujeres embarazadas en distintos momentos (semanas 20, 34 y 38) del periodo gestacional en relación con el grupo (Control vs. Salmón)

	Grupo						P-valor		
	Control (n=54)			Salmón (n=54)			Fuente de variación		
	20 semanas	34 semanas	38 semanas	20 semanas	34 semanas	38 semanas	Grupo (G)	Tiempo (T)	Interacción (G x T)
Isoprostanos/creatinina (nmol/mmol)	0.86 ± 0.04	0.92 ± 0.05	1.05 ± 0.07	0.80 ± 0.04	0.90 ± 0.05	0.90 ± 0.05	*0.021	0.402	0.813
Peróxidos lipídicos (μmol/l)	1163 ± 61	1182 ± 66	1138 ± 87	979 ± 43	1065 ± 51	967 ± 57	0.120	0.441	0.443
8-OHdG/creatinina (ng/mg)	39.83 ± 2.92	46.83 ± 3.80	38.90 ± 3.95	45.82 ± 3.67	39.88 ± 2.90	37.43 ± 2.65	0.775	0.223	0.145

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), usando un modelo lineal general de la varianza. Cuando la concentración de los isoprostanos se utilizó como covariable, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($P = 0.350$). 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Las concentración en orina de **8-iso-PGF₂α** no se vio alterada de forma significativa durante el embarazo. Sin embargo, se observó un efecto del tratamiento en la concentración en orina de 8-iso-PGF₂α, siendo significativamente menor en el grupo Salmón comparado con el grupo Control ($P=0.021$). A pesar de que la comparación entre los dos grupos en las semanas 20, 34 y 38 del embarazo evidenció que los valores de isoprostanos tienden a ser menores en el grupo tratado con pescado que en el grupo Control ($P=0.050$, 0.164 y 0.094 , en las semanas 20, 34 y 38, respectivamente), cuando la concentración basal de 8-iso-PGF₂α (semana 20) se utilizó como covariable, el efecto del grupo dejó de ser significativo ($P=0.350$). Por lo tanto, la concentración en orina de 8-iso-PGF₂α no se vio modificada desde la semana 20 del embarazo hasta la semana 38 y tampoco se vio afectada por el aumento en la ingesta de salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Por otro lado, en relación con la concentración de isoprostanos, no se encontraron diferencias entre grupos respecto a la edad o el hábito de fumar y el BMI tampoco fue diferente, aunque tendía a ser menor en el grupo Salmón (**Tabla 2**) (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los niveles de LPO en plasma y de 8-OHdG en orina no cambiaron durante el embarazo y tampoco se encontraron diferencias entre grupos (**Tabla 8**) (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Sistema de defensa antioxidante

Sistema de defensa antioxidante materno

Las actividades de las cuatro enzimas del sistema de defensa antioxidante determinadas en las madres de este estudio, así como las concentraciones de Se y glutatión, aparecen en la **Tabla 9**. Las concentraciones plasmáticas de vitaminas y otros factores liposolubles ajustados por los lípidos totales y sin ajustar por su concentración, se pueden observar en la **Tabla 10**.

Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos maternos

Las actividades GPx y GR aumentaron de forma significativa durante el embarazo ($P<0.001$ y $P=0.008$, respectivamente) en ambos grupos, mientras que las actividades SOD y CAT no se vieron modificadas durante este periodo (**Tabla 9**). Las actividades SOD, CAT y GR fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, la actividad GPx en eritrocitos fue significativamente más elevada en el grupo Salmón comparado con el

grupo Control ($P=0.042$) a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre valores individuales a cada tiempo ($P=0.409$, $P=0.087$ y $P=0.176$, en las semanas 20, 34 y 38, respectivamente). Cuando la actividad GPx de la semana 20 se utilizó como covariable, se perdieron las diferencias significativas entre grupos, aunque se observó una tendencia del grupo tratado con pescado a ser mayor que el grupo Control ($P=0.063$) (Tabla 9) (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos maternos

Las concentraciones de Se y glutatión (oxidado, reducido y total) aumentaron de forma significativa durante el embarazo (P entre <0.001 y 0.029). La concentración de Se en eritrocitos fue significativamente mayor en el grupo Salmón comparado con el grupo Control ($P<0.001$) (Tabla 9). Las comparaciones entre grupos en las semanas 20, 34 y 38 mostraron una diferencia significativa para la concentración de Se, con valores de Se más altos en el grupo Salmón ($P=0.042$, <0.001 y 0.018 , respectivamente). Cuando la concentración de Se en la semana 20 del embarazo se utilizó como covariable, se mantuvieron las diferencias significativas entre grupos ($P=0.001$). Por otro lado, la concentración de glutatión (reducido, oxidado y total) en glóbulos rojos fue similar en los dos grupos del estudio. (García-Rodríguez *et al.*, 2011a).

Tabla 9. Actividades de las enzimas antioxidantes y concentración de glutatión y Se en eritrocitos de mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón)

	Grupo						P-valor		
	Control (n=54)			Salmón (n=54)			Fuente de variación		
	20 semanas	34 semanas	38 semanas	20 semanas	34 semanas	38 semanas	Grupo (G)	Tiempo (T)	Interacción (G x T)
CAT (nmol/l · g Hb)	2.96 ± 0.14	2.70 ± 0.12	2.85 ± 0.13	2.83 ± 0.11	2.99 ± 0.16	2.98 ± 0.13	0.345	0.904	0.156
SOD (U/mg Hb)	1.46 ± 0.09	1.42 ± 0.11	1.46 ± 0.13	1.38 ± 0.10	1.33 ± 0.10	1.43 ± 0.11	0.867	0.058	0.875
GR (U/g Hb)	2.70 ± 0.13	2.87 ± 0.14	3.30 ± 0.24	2.74 ± 0.13 ^a	2.91 ± 0.12 ^a	3.36 ± 0.23 ^b	0.634	0.008	0.973
GPx (U/g Hb)	445 ± 21 ^{ab}	407 ± 21 ^a	515 ± 34 ^b	479 ± 19 ^a	456 ± 26 ^a	578 ± 34 ^b	*0.042	<0.001	0.740
Se (µg/kg RBC)	119 ± 5 ^a	154 ± 5 ^b	126 ± 4 ^a	135 ± 6 ^a	180 ± 6 ^b	143 ± 6 ^a	*<0.001	<0.001	0.118
GSH (mmol/l)	1.69 ± 0.03 ^a	1.79 ± 0.04 ^b	1.75 ± 0.04 ^{ab}	1.70 ± 0.03	1.78 ± 0.03	1.71 ± 0.05	0.640	0.029	0.409
GSSG (mmol/l)	0.16 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.03 ^b	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.221	0.005	0.320
Glutatión total (mmol/l)	1.85 ± 0.03 ^a	1.97 ± 0.04 ^b	1.99 ± 0.04 ^b	1.90 ± 0.03	1.95 ± 0.03	1.93 ± 0.04	0.882	0.007	0.057

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$), usando un modelo lineal general de la varianza. Cuando la actividad GPx y la concentración de Se en la semana 20 se usaron como covariables, se encontraron diferencias significativas entre grupos sólo para el Se ($P = 0.001$). Las distintas letras indican diferencias estadísticas entre los distintos momentos del periodo gestacional estudiados, dentro de cada uno de los grupos ($P < 0.05$). CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; Hb, hemoglobina; RBC, glóbulos rojos; Se, selenio; SOD, superóxido dismutasa

Tabla 10. Niveles plasmáticos de retinol, α - y γ -tocoferol, β -caroteno y CoQ₁₀ en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón, dos veces a la semana (grupo Salmón)

	Grupo						P-valor		
	Control (n=54)			Salmón (n=54)			Fuente de variación		
	20 semanas	34 semanas	38 semanas	20 semanas	34 semanas	38 semanas	Grupo (G)	Tiempo (T)	Interacción (G x T)
μM									
<i>α-tocoferol</i>	29.7 \pm 1.5	27.4 \pm 2.2	26.2 \pm 1.5	28.3 \pm 1.5	26.4 \pm 2.0	25.2 \pm 1.5	0.725	0.178	0.254
<i>γ-tocoferol</i>	2.90 \pm 0.19 ^a	2.19 \pm 0.23 ^b	1.56 \pm 0.20 ^b	2.66 \pm 0.17 ^a	2.00 \pm 0.23 ^b	1.39 \pm 0.13 ^b	0.456	<0.001	0.599
<i>β-caroteno</i>	1.71 \pm 0.15 ^a	1.60 \pm 0.15 ^a	1.46 \pm 0.14 ^b	2.04 \pm 0.14 ^a	2.04 \pm 0.15 ^a	1.72 \pm 0.16 ^b	0.126	<0.001	0.801
<i>Retinol</i>	1.06 \pm 0.06 ^a	0.85 \pm 0.04 ^b	0.86 \pm 0.04 ^b	1.20 \pm 0.06 ^a	1.06 \pm 0.06 ^{ab}	1.07 \pm 0.06 ^b	*0.002	0.002	0.861
<i>CoQ₁₀</i>	0.44 \pm 0.03 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.25 \pm 0.01 ^c	0.42 \pm 0.03 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.25 \pm 0.02 ^c	0.471	<0.001	0.833
<i>CoQ₁₀H₂</i>	1.07 \pm 0.06 ^a	0.95 \pm 0.11 ^{ab}	0.70 \pm 0.08 ^b	0.99 \pm 0.07 ^a	0.84 \pm 0.11 ^{ab}	0.61 \pm 0.06 ^b	0.440	<0.001	0.833
<i>CoQ₁₀ total</i>	1.52 \pm 0.08 ^a	1.18 \pm 0.11 ^b	0.95 \pm 0.11 ^b	1.42 \pm 0.10 ^a	1.06 \pm 0.11 ^{ab}	0.87 \pm 0.07 ^b	0.447	<0.001	0.741
(ng/mg)/ lípidos totales									
<i>α-tocoferol</i>	2993 \pm 158 ^a	2630 \pm 203 ^b	2313 \pm 123 ^b	2985 \pm 150 ^a	2730 \pm 209 ^{ab}	2288 \pm 106 ^b	0.781	0.004	0.169
<i>γ-tocoferol</i>	293 \pm 20 ^a	212 \pm 23 ^b	139 \pm 19 ^b	279 \pm 16 ^a	205 \pm 23 ^a	125 \pm 11 ^b	0.707	<0.001	0.486
<i>β-caroteno</i>	221 \pm 20 ^a	198 \pm 18 ^a	164 \pm 17 ^b	272 \pm 18 ^a	263 \pm 20 ^a	200 \pm 18 ^b	0.124	<0.001	0.565
<i>Retinol</i>	72 \pm 5 ^a	56 \pm 3 ^b	51 \pm 2 ^b	86 \pm 4 ^a	72 \pm 4 ^b	67 \pm 4 ^b	*0.001	<0.001	0.859
<i>CoQ₁₀</i>	92 \pm 6 ^a	41 \pm 2 ^b	44 \pm 3 ^b	91 \pm 7 ^a	43 \pm 2 ^b	47 \pm 3 ^b	0.961	<0.001	0.412
<i>CoQ₁₀H₂</i>	219 \pm 14 ^a	186 \pm 21 ^b	127 \pm 16 ^b	209 \pm 16 ^a	175 \pm 23 ^a	114 \pm 11 ^b	0.652	<0.001	0.645
<i>CoQ₁₀ total</i>	311 \pm 19 ^a	229 \pm 22 ^b	171 \pm 17 ^b	299 \pm 21 ^a	221 \pm 24 ^a	161 \pm 13 ^b	0.740	<0.001	0.535

Los valores se expresan como media \pm SEM. *Diferencias estadísticas entre grupos ($P < 0.05$) usando un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas. Cuando la concentración de retinol de la semana 20 se utilizó como covariable, se siguieron observando diferencias significativas entre grupos ($P = 0.008$). Las distintas letras indican diferencias estadísticas entre los distintos momentos del periodo gestacional estudiados dentro de cada uno de los grupos ($P < 0.05$). CoQ₁₀, coenzima Q₁₀; CoQ₁₀H₂, coenzima Q₁₀ reducido

Concentración de vitaminas y otros factores liposolubles en plasma materno

Durante el embarazo, los niveles de α - y γ -tocoferol, retinol, β -caroteno y CoQ₁₀ (oxidado, reducido y total) disminuyeron significativamente (P entre 0.002 y <0.001). La concentración de retinol en plasma fue significativamente mayor en el grupo Salmón comparado con el grupo Control ($P=0.002$), concretamente en las semanas 34 y 38 ($P=0.032$ y 0.003, respectivamente). Las diferencias significativas entre grupos se mantuvieron cuando la concentración de retinol en la semana 20 se utilizó como covariable ($P=0.007$). Las concentraciones plasmáticas de las demás vitaminas y factores antioxidantes permanecieron similares entre los grupos Control y Salmón. (Tabla 10) (García-Rodríguez *et al.*, 2012a).

Relaciones entre el sistema de defensa antioxidante materno y de cordón

En la Tabla 11 se pueden observar los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en la sangre de cordón de los recién nacidos y en sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón). Los coeficientes de correlación entre los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos en los dos grupos del estudio, aparecen en la Tabla 12.

Actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante en eritrocitos maternos y de cordón

La actividad GPx fue significativamente menor en la sangre de cordón que en las madres en la semana 38 del embarazo, tanto en el grupo Control como Salmón ($P<0.001$, en ambos casos) (Tabla 11). No se observaron diferencias significativas entre la sangre materna y de cordón para el resto de las enzimas analizadas ni entre los dos grupos del estudio (Tabla 11).

Concentración de selenio y glutatión en glóbulos rojos maternos y de cordón

La concentración de Se fue significativamente más elevada en la sangre de cordón respecto a las madres sólo en el grupo Control ($P=0.014$). La concentración de glutatión oxidado en la sangre de cordón fue significativamente mayor que en las madres a las 38 semanas, en el grupo Control ($P=0.032$) y en el grupo Salmón ($P=0.001$), mientras que la concentración de glutatión total fue mayor en la sangre de cordón respecto a las madres

embarazadas de 38 semanas, únicamente en el grupo que tomó pescado ($P=0.026$). Al comparar la presencia de estos antioxidantes entre los dos grupos, tanto en las madres como en la sangre de cordón de sus hijos se observó que los niveles de Se eran mayores en el grupo Salmón ($P=0.018$ y $P=0.022$, respectivamente) (Tabla 11).

Tabla 11. Actividades de las enzimas del sistema de defensa antioxidante y concentraciones de antioxidantes no enzimáticos en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón)

	Grupo				P-valor			
	Control (n=50)		Salmón (n=51)		Fuente de variación			
	38	Cordón	38	Cordón	Madre-Cordón		Grupo	
	semanas		semanas		Control	Salmón	38 semanas	Cordón
CAT (nmol/l · g Hb)	2.93 ± 0.14	3.36 ± 0.64	2.98 ± 0.16	2.80 ± 0.12	0.517	0.346	0.505	0.435
SOD (U/mg Hb)	1.51 ± 0.13	1.72 ± 0.15	1.38 ± 0.13	1.43 ± 0.13	0.064	0.630	0.849	0.101
GR (U/g Hb)	3.44 ± 0.27	3.59 ± 0.15	3.40 ± 0.27	3.72 ± 0.17	0.617	0.265	0.834	0.814
GPx (U/g Hb)	519 ± 38	332 ± 16	598 ± 40	381 ± 19	*<0.001	*<0.001	0.196	0.105
Selenio (µg/kg RBC)	127 ± 4	137 ± 4	143 ± 7	147 ± 5	*0.014	0.498	*0.018	*0.022
GSH (mmol/l)	1.76 ± 0.05	1.66 ± 0.09	1.66 ± 0.04	1.68 ± 0.10	0.222	0.917	0.491	0.414
GSSG (mmol/l)	0.22 ± 0.04	0.40 ± 0.06	0.22 ± 0.04	0.47 ± 0.06	*0.032	*0.001	0.787	0.587
Glutación total (mmol/l)	1.99 ± 0.05	2.06 ± 0.10	1.89 ± 0.04	2.15 ± 0.10	0.511	*0.026	0.352	0.262
µg/ml								
α-tocoferol	10.57 ± 0.77	0.54 ± 0.14	9.69 ± 0.68	0.45 ± 0.04	*<0.001	*<0.001	0.641	0.383
γ-tocoferol	0.94 ± 0.20	0.10 ± 0.00	0.75 ± 0.11	0.10 ± 0.01	*<0.001	*<0.001	0.467	0.842
β-caroteno	0.78 ± 0.49	nd	0.92 ± 0.57	nd			0.229	
Retinol	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.14 ± 0.02	*0.031	*0.017	*0.002	0.861
CoQ₁₀	0.20 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.00	*0.029	*0.012	0.754	0.433
CoQ₁₀H₂	0.80 ± 0.22	0.10 ± 0.00	0.64 ± 0.14	0.09 ± 0.00	*0.031	*0.003	0.389	0.314
Total CoQ₁₀	1.26 ± 0.23	0.17 ± 0.03	0.76 ± 0.16	0.18 ± 0.01	*0.003	*0.004	0.467	0.574
(µg/mg)/ lípidos totales								
α-tocoferol	2.22 ± 0.17	0.17 ± 0.03	2.21 ± 0.13	0.28 ± 0.11	*<0.001	*<0.001	0.878	0.257
γ-tocoferol	0.16 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.04 ± 0.01	*0.026	*0.001	0.451	0.823
β-caroteno								
Retinol	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02	*0.051	0.700	*<0.001	0.540
CoQ₁₀	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	*0.029	0.700	0.556	0.555
CoQ₁₀H₂	0.19 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.03 ± 0.01	*0.003	*0.003	0.534	0.547
Total CoQ₁₀	0.23 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.03	*0.004	*0.038	0.605	0.879

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias estadísticas ($P<0.05$) entre las madres y la sangre de cordón en ambos grupos, usando el test t de Student para muestras relacionadas y entre los grupos Control y Salmón en las madres y en la sangre de cordón de sus recién nacidos,

utilizando un test t de Student para muestras independientes. *nd*, no detectable. CAT, catalasa; CoQ₁₀, coenzima Q₁₀; CoQ₁₀H₂, coenzima Q₁₀ reducido; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; Hb, hemoglobina; RBC, glóbulos rojos; Se, selenio; SOD, superóxido dismutasa

Correlaciones madre-hijo del sistema de defensa antioxidante enzimático, selenio y glutatión

Se observaron correlaciones positivas significativas entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos en cuanto a la concentración de Se y la actividad SOD, tanto en el grupo Control [n=33, r=0.440, P=0.010 y n=34, r=0.706, P<0.001, respectivamente] como en el grupo Salmón [n=36, r= 0.418, P=0.011 y n=37, r=0.707, P<0.001]. No se observaron diferencias significativas entre la sangre materna y de cordón para el resto de analitos (**Tabla 12**).

Concentración de vitaminas y de otros factores liposolubles en plasma materno y de cordón

En el grupo Control, las concentraciones plasmáticas de todas las vitaminas y factores liposolubles analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos, fueron significativamente menores respecto a sus madres (P entre <0.001 y 0.051) (**Tabla 11**), al igual que ocurre en el grupo Salmón (P entre <0.001 y 0.017). Sin embargo, en este último grupo, estas diferencias desaparecen en el caso del retinol y del CoQ₁₀ cuando se expresan las concentraciones plasmáticas de estos compuestos en función de la concentración de lípidos totales (**Tabla 11**). Por otro lado, al comparar los dos grupos, la concentración de retinol fue significativamente mayor en las madres del grupo Salmón que en las del grupo Control (P<0.002 y 0.001, sin ajustar y después de ajustar por lípidos totales, respectivamente) (**Tabla 11**).

Correlaciones madre-hijo de vitaminas y otros factores liposolubles

El α -tocoferol aumentó de forma paralela en la sangre de cordón y en la sangre de las madres que tomaron salmón (n=28, r=0.516, P=0.005), mientras que en el caso del grupo Control, fueron las concentraciones plasmáticas de γ -tocoferol las que correlacionaron de forma positiva en la sangre de las madres y del cordón de sus hijos (n=16, r=0.509, P=0.044) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Coeficientes de correlación entre las concentraciones de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos

	Grupo					
	Control			Salmón		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>
<i>CAT</i> (nmol/l · g Hb)	34	-0.084	0.635	37	0.049	0.774
<i>SOD</i> (U/mg Hb)	34	0.706	*<0.001	37	0.707	*<0.001
<i>GR</i> (U/g Hb)	34	0.135	0.446	37	0.271	0.105
<i>GPx</i> (U/g Hb)	34	-0.084	0.638	37	-0.170	0.315
<i>Se</i> (µg/kg RBC)	33	0.440	*0.010	36	0.418	*0.011
<i>GSH</i> (mmol/l)	31	0.305	0.095	34	-0.177	0.317
<i>GSSG</i> (mmol/l)	31	-0.118	0.529	34	0.092	0.606
<i>Glutación total</i> (mmol/l)	31	0.190	0.305	34	-0.089	0.617
µg/ml						
<i>α-tocoferol</i>	24	-0.124	0.564	28	0.516	*0.005
<i>γ-tocoferol</i>	16	0.509	*0.044	15	0.026	0.927
<i>β-caroteno</i>		<i>nd</i>			<i>nd</i>	
<i>Retinol</i>	8	0.269	0.520	9	0.177	0.648
<i>CoQ₁₀</i>	8	-0.481	0.227	10	0.348	0.324
<i>CoQ₁₀H₂</i>	5	0.707	0.181	10	0.268	0.455
<i>CoQ₁₀ total</i>	8	-0.472	0.237	10	0.405	0.245
(µg/mg)/lípidos totales						
<i>α-tocoferol</i>	23	-0.122	0.580	20	-0.258	0.272
<i>γ-tocoferol</i>	13	0.108	0.725	14	-0.066	0.823
<i>β-caroteno</i>		<i>nd</i>			<i>nd</i>	
<i>Retinol</i>	10	0.216	0.549	7	0.086	0.855
<i>CoQ₁₀</i>	11	0.340	0.307	7	0.125	0.790
<i>CoQ₁₀H₂</i>	11	-0.206	0.543	7	0.207	0.657
<i>CoQ₁₀ total</i>	11	-0.020	0.954	7	0.236	0.611

*Diferencias significativas ($P < 0.05$); *r*, coeficiente de correlación. *nd*, no detectable. *CAT*, catalasa; *CoQ₁₀*, coenzima *Q₁₀*; *CoQ₁₀H₂*, coenzima *Q₁₀* reducido; *GPx*, glutación peroxidasa; *GR*, glutación reductasa; *GSH*, glutación reducido; *GSSG*, glutación oxidado; *Hb*, hemoglobina; *RBC*, glóbulos rojos; *Se*, selenio *SOD*, superóxido dismutasa

Biomarcadores plasmáticos del metabolismo glucídico y lipídico

Plasma materno

Las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores del metabolismo glucídico y lipídico de las madres del estudio aparecen representados en la **Tabla 13**.

Durante el embarazo, se observó un aumento significativo en la concentración de TAG, colesterol total y de la concentración de LDLc ($P < 0.001$) en los dos grupos

analizados. La concentración de HDLc disminuyó significativamente desde la semana 20 del embarazo a la 34 y aumentó posteriormente en la semana 38 ($P<0.001$), mientras que los niveles de insulina y el índice HOMA-IR aumentaron significativamente ($P<0.001$) en la semana 34 y disminuyeron en la semana 38 del embarazo, particularmente en el grupo Control. Los niveles de glucosa y fosfolípidos permanecieron sin cambios a lo largo del periodo gestacional. Los resultados de nuestro estudio no revelaron diferencias significativas en los niveles de estos biomarcadores entre los grupos Control y Salmón. (Tabla 13) (García-Rodríguez *et al.*, 201b2).

Tabla 13. Concentraciones plasmáticas de los biomarcadores del metabolismo glucídico y lipídico en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón, dos veces a la semana (grupo Salmón)

	Grupo						P-valor		
	Control (n=54)			Salmón (n=54)			Fuente de variación		
	20 semanas	34 semanas	38 semanas	20 semanas	34 semanas	38 semanas	Grupo (G)	Tiempo (T)	Interacción (G x T)
Glucosa (mg/dl)	66 ± 14	68 ± 10	64 ± 12	64 ± 9	67 ± 10	66 ± 10	0.687	0.125	0.445
TAG (mg/dl)	96 ± 25 ^a	114 ± 31 ^b	133 ± 36 ^c	96 ± 34 ^a	106 ± 31 ^a	125 ± 45 ^b	0.401	<0.001	0.488
Fosfolípidos (mg/dl)	141 ± 24	135 ± 11	135 ± 14	138 ± 19	130 ± 14	133 ± 14	0.108	0.010	0.791
Colesterol (mg/dl)	178 ± 24 ^a	192 ± 25 ^b	221 ± 29 ^c	176 ± 31 ^a	188 ± 29 ^b	210 ± 37 ^c	0.318	<0.001	0.354
LDLc (mg/dl)	90 ± 24 ^a	112 ± 26 ^b	129 ± 28 ^c	88 ± 31 ^a	109 ± 28 ^b	114 ± 34 ^b	0.158	<0.001	0.105
HDLc (mg/dl)	69 ± 21 ^a	57 ± 15 ^b	65 ± 16 ^a	69 ± 19 ^a	58 ± 18 ^b	71 ± 19 ^a	0.331	<0.001	0.387
Insulina (μU/ml)	4.79 ± 0.28 ^a	6.64 ± 0.46 ^b	4.81 ± 0.55 ^a	5.12 ± 0.39 ^a	7.11 ± 0.63 ^b	6.76 ± 0.92 ^{ab}	0.223	<0.001	0.421
HOMA-IR	0.73 ± 0.06 ^a	1.14 ± 0.11 ^b	0.78 ± 0.10 ^a	0.80 ± 0.07 ^a	1.18 ± 0.13 ^b	1.06 ± 0.13 ^b	0.279	<0.001	0.243

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias estadísticas entre grupos ($P < 0.05$) usando un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los distintos momentos del periodo gestacional estudiados dentro de cada uno de los grupos ($P < 0.05$). HDLc, colesterol de lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR, modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; LDLc, colesterol de lipoproteína de baja densidad; TAG, triacilgliceroles

Plasma materno a las 38 semanas de gestación y de cordón

En la **Tabla 14** se muestran las concentraciones plasmáticas de los parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico y lipídico analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos y en sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón). Los coeficientes de correlación de los distintos parámetros bioquímicos entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos en los dos grupos del estudio aparecen en la **Tabla 15**.

Tabla 14. Concentraciones plasmáticas de algunos biomarcadores del metabolismo glucídico y lipídico analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón)

	Grupo				P-valor			
	Control (n=54)		Salmón (n=54)		<i>Fuente de variación</i>			
	38 semanas	Cordón	38 semanas	Cordón	<i>Madre-Cordón</i>		<i>Grupo</i>	
				Control	Salmón	38 semanas	Cordón	
Glucosa (mg/dl)	64 ± 2	49 ± 4	65 ± 2	54 ± 5	*0.003	*0.033	0.537	0.242
TAG (mg/dl)	127 ± 6	55 ± 4	120 ± 6	63 ± 10	*<0.001	*<0.001	0.404	0.493
Fosfolípidos (mg/dl)	133 ± 2	109 ± 3	133 ± 2	106 ± 3	*<0.001	*<0.001	0.561	0.427
Colesterol (mg/dl)	220 ± 5	76 ± 5	203 ± 6	74 ± 4	*<0.001	*<0.001	0.153	0.757
LDLc (mg/dl)	130 ± 5	38 ± 3	112 ± 6	39 ± 2	*<0.001	*<0.001	*0.025	0.909
HDLc (mg/dl)	64 ± 3	27 ± 2	67 ± 7	25 ± 2	*<0.001	*<0.001	0.095	0.866
Insulina (μU/ml)	4.58 ± 0.77	2.75 ± 0.45	6.60 ± 0.45	2.86 ± 0.50	*0.049	*0.015	0.074	0.727
HOMA-IR	0.76 ± 0.12	0.26 ± 0.06	1.17 ± 0.21	0.26 ± 0.07	*0.001	*<0.001	*0.050	0.743

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre las madres y la sangre de cordón en ambos grupos, usando el test t de Student para muestras relacionadas y entre los grupos Control y Salmón en las madres y en la sangre de cordón de sus recién nacidos, utilizando un test t de Student para muestras independientes. HDLc, colesterol de lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR, modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; LDLc, colesterol de lipoproteína de baja densidad; TAG, triacilglicerolos

Tabla 15. Coeficientes de correlación entre los parámetros bioquímicos generales del metabolismo glucídico y lipídico de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos

	Grupo					
	Control			Salmón		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	35	0.049	0.780	32	0.091	0.621
<i>TAG (mg/dl)</i>	31	0.035	0.850	30	-0.001	0.996
<i>Fosfolípidos (mg/dl)</i>	31	0.195	0.293	30	0.030	0.875
<i>Colesterol (mg/dl)</i>	31	0.153	0.412	29	0.249	0.193
<i>LDLc (mg/dl)</i>	31	0.242	0.189	28	0.290	0.134
<i>HDLc (mg/dl)</i>	31	0.037	0.843	30	0.099	0.602
<i>Insulina (μU/ml)</i>	24	0.037	0.863	25	-0.028	0.893
<i>HOMA-IR</i>	29	0.014	0.944	38	-0.070	0.674

*Diferencias significativas ($P < 0.05$); *r*, coeficiente de correlación. HDLc, colesterol de lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR, modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; LDLc, colesterol de lipoproteína de baja densidad; TAG, triacilgliceroles

Las concentraciones de glucosa, TAG, fosfolípidos, colesterol total, LDLc y HDLc, junto con la insulina y el índice HOMA-IR, fueron significativamente menores en la sangre de cordón respecto a las madres en la semana 38 de gestación, tanto en el grupo Control (P entre <0.001 y 0.049) como Salmón (P entre <0.001 y 0.033). Por otro lado, en las madres del grupo Salmón, en la semana 38 del embarazo la concentración de LDLc fue menor respecto al Control ($P=0.025$), mientras que el índice HOMA-IR fue mayor en el grupo Salmón respecto al control ($P=0.050$) (Tabla 14).

Correlaciones madre-hijo de los parámetros bioquímicos del metabolismo glucídico y lipídico

No se observaron correlaciones significativas en los parámetros bioquímicos del metabolismo de glúcidos y lípidos analizados entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos (Tabla 15).

Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular

Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular en plasma materno

La concentración plasmática de las distintas adipoquinas y de los biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular de las mujeres embarazadas del estudio, se muestran en las **Figuras 9, 10 y 11**.

Adipoquinas

La concentración de las distintas adipoquinas analizadas en este estudio se muestran en la **Figura 9**. Los niveles de adiponectina disminuyeron a lo largo del embarazo ($P<0.001$) mientras que los niveles de leptina aumentaron, también de forma significativa ($P=0.001$). No observamos diferencias significativas entre los grupos Control y Salmón.

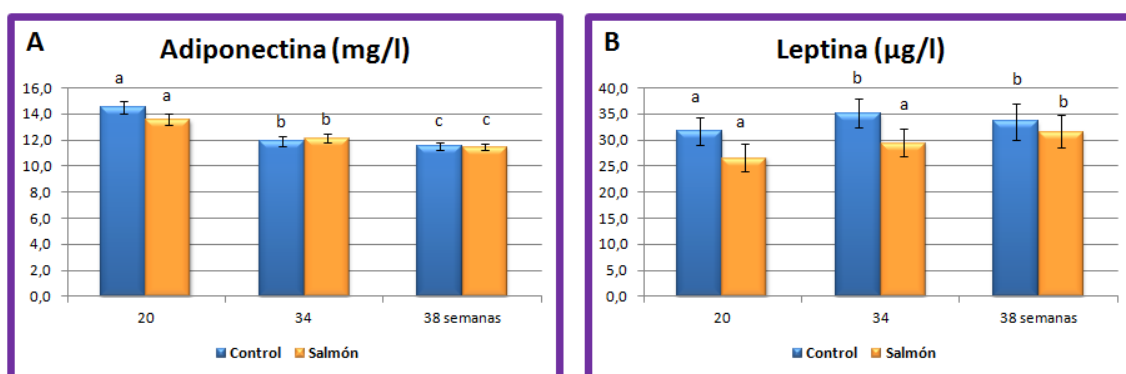


Figura 9. Concentraciones de (A) adiponectina y (B) leptina en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón). Los datos se expresan como media \pm SEM. Las distintas letras indican diferencias significativas entre diferentes momentos del periodo gestacional, dentro de cada grupo ($P<0.05$).

Biomarcadores de inflamación

Durante el embarazo, las concentraciones de IL-8 y HGF aumentaron significativamente ($P<0.001$, en los dos casos), mientras que la concentración de MCP-1 disminuyó en la semana 34 del periodo gestacional, para volver a aumentar significativamente en la semana 38 ($P<0.001$). Los niveles de IL-6, NGF y TNF- α permanecieron en un rango de concentraciones constantes durante la gestación. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los grupos para ninguno de los biomarcadores de inflamación analizados (**Figura 10**) (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

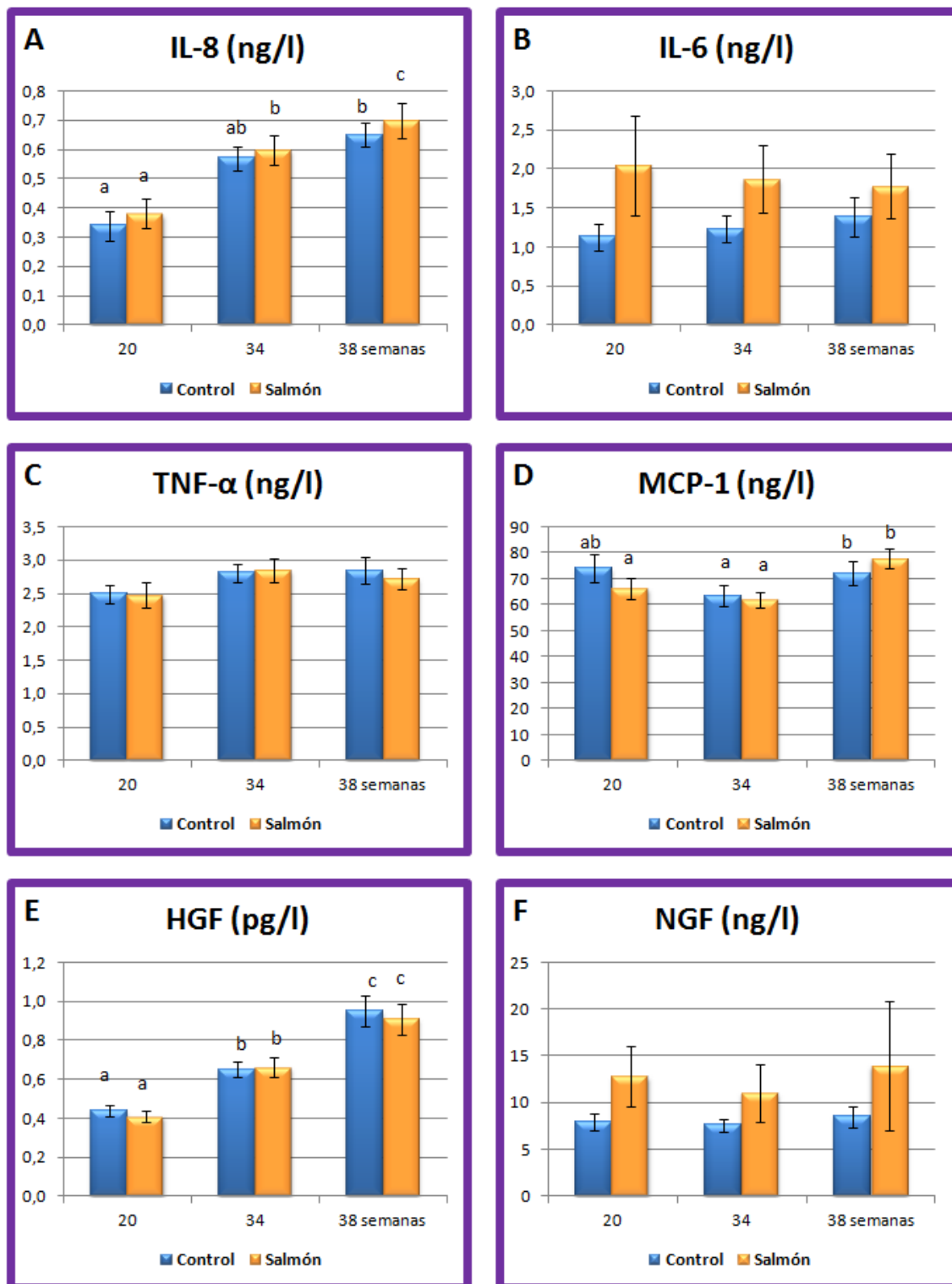


Figura 10. Concentraciones de (A) IL-8 (B) IL-6 (C) TNF- α (D) MCP-1 (E) HGF y (F) NGF en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón). Los datos se expresan como media \pm SEM. Las distintas letras indican diferencias significativas entre diferentes momentos del periodo gestacional, dentro de cada grupo ($P < 0.05$). HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IL-6, interleuquina-6; IL-8,

interleuquina-8; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos; NGF, factor de crecimiento nervioso; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α

Biomarcadores de homeostasis vascular

La concentración de sICAM-1 fue significativamente menor en el grupo Salmón respecto al grupo Control ($P=0.007$), aumentando significativamente a lo largo del embarazo ($P<0.001$), en ambos grupos (**Figura 11**). De forma específica, los valores de sICAM-1 en el grupo Salmón fueron menores respecto al Control en las semanas 20 y 38 ($P=0.035$, 0.154 y 0.018, en las semanas 20, 34 y 38, respectivamente). Sin embargo, cuando la concentración basal de sICAM-1 en la semana 20 del embarazo se utilizó como covariable, el efecto del grupo dejó de ser significativo ($P=0.688$); de hecho, la interacción grupo x tiempo no fue significativa para este parámetro. Por otro lado, la concentración de sE-selectina aumentó de forma significativa con la progresión del embarazo sólo en el grupo Salmón ($P<0.001$), a pesar de que no se encontraron diferencias entre grupos. Las concentraciones de sVCAM-1 y tPAI-1 también aumentaron de forma significativa durante el embarazo ($P<0.001$) en ambos grupos, sin diferencias entre ellos. Finalmente, la concentración plasmática de MMP-9 no se modificó durante el embarazo, siendo los valores similares entre grupos (**Figura 11**) (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

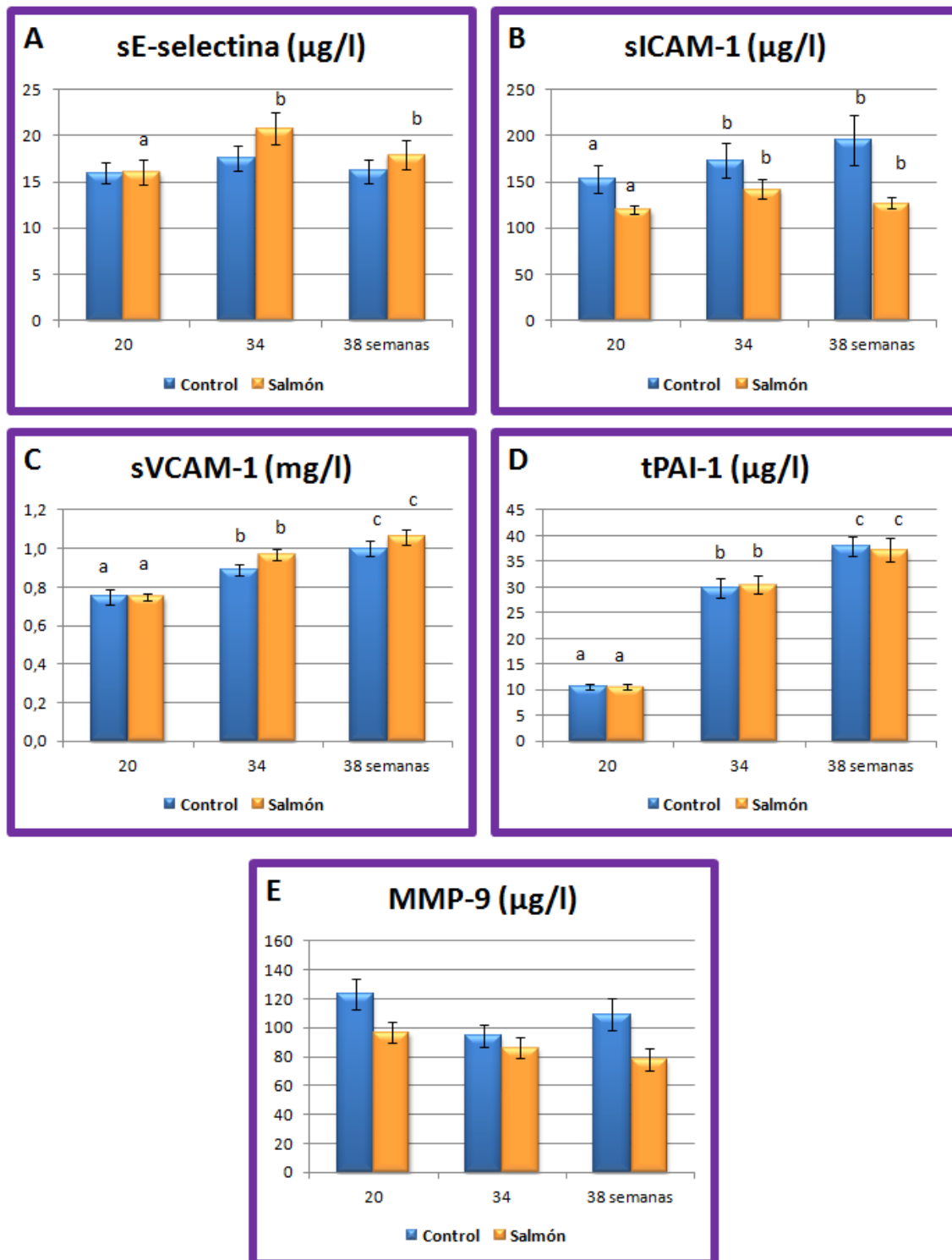


Figura 11. Concentraciones de (A) sE-selectina (B) sICAM-1 (C) sVCAM-1 (D) tPAI-1 y (E) MMP-9 en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón). Los datos se expresan como media \pm SEM. *Diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$) usando un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas. Cuando la concentración basal de sICAM-1 se utilizó como covariable, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($P = 0.688$). Las distintas letras indican diferencias significativas entre diferentes momentos del periodo gestacional, dentro de cada

grupo ($P < 0.05$). MMP-9, metaloproteínasa de la matriz-9; sE-selectina, E-selectina soluble; sICAM-1, molécula de adhesión intercelular soluble-1; sVCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; tPAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1 total

Adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular en plasma materno y de cordón

Las concentraciones plasmáticas de las distintas adipoquinas y de los biomarcadores de inflamación y de activación endotelial en la sangre de cordón de los recién nacidos y en sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) están representadas en la **Tabla 15**. Por otro lado, los coeficientes de correlación entre los distintos biomarcadores analizados en las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos en los dos grupos del estudio se muestran en la **Tabla 16**.

Adipoquinas

La concentración plasmática de adiponectina, fue significativamente más elevada en la sangre de cordón que en las madres, tanto en el grupo Control ($P < 0.001$) como Salmón ($P < 0.001$). Por otro lado, cuando se analizaron el grupo Control y el Salmón, no se observaron diferencias entre las madres en la semana 38 de gestación, tampoco entre la sangre de cordón de sus hijos (**Tabla 15**).

Correlaciones madre-hijo de la concentración de adipoquinas en plasma

No se observaron correlaciones significativas en la concentración plasmática de las distintas adipoquinas analizadas entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos (**Tabla 16**).

Biomarcadores de inflamación

Las concentraciones plasmáticas de IL-8, MCP-1 y HGF fueron significativamente más elevadas en la sangre de cordón que en las madres, tanto en el grupo Control (P entre < 0.001 y 0.018) como Salmón (P entre < 0.001 y 0.002). Además, en el grupo Salmón, las concentraciones de IL-6, TNF- α y NGF fueron significativamente menores en la sangre de cordón de los recién nacidos que en sus madres (P entre < 0.001 y 0.039) (**Tabla 15**).

Correlaciones madre-hijo de la concentración de los biomarcadores de inflamación en plasma

Se observaron correlaciones significativas en cuanto a la concentración plasmática de MCP-1 (positiva) y NGF (negativa) entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos, únicamente en el grupo Control [n=32, r=0.384, P=0.030 y n=15, r=-0.599, P=0.018, respectivamente] (Tabla 16).

Tabla 15. Concentraciones plasmáticas de adipocinas y de los biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos y en sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón)

	Grupo				P-valor			
	Control (n=50)		Salmón (n=51)		Fuente de variación			
	38 semanas	Cordón	38 semanas	Cordón	Madre-Cordón		Grupo	
				Control	Salmón	38 semanas	Cordón	
<i>Adiponectina</i> (mg/l)	11.79 ± 0.31	17.74 ± 0.38	11.35 ± 0.38	16.98 ± 0.61	<0.001	<0.001	0.229	0.681
<i>Leptina</i> (µg/l)	32.70 ± 3.76	39.31 ± 4.45	30.89 ± 4.45	44.52 ± 7.75	0.268	0.135	0.681	0.604
<i>IL-8</i> (ng/l)	0.62 ± 0.04	7.45 ± 2.72	0.78 ± 0.09	2.74 ± 0.54	0.018	0.002	0.461	0.069
<i>IL-6</i> (ng/l)	1.04 ± 0.14	16.14 ± 8.11	1.84 ± 0.57	4.95 ± 1.26	0.078	0.039	0.433	0.261
<i>TNF-α</i> (ng/l)	2.74 ± 0.21	16.92 ± 9.18	2.64 ± 0.18	6.77 ± 0.32	0.130	<0.001	0.629	0.292
<i>MCP-1</i> (ng/l)	69 ± 5	222 ± 24	76 ± 5	253 ± 36	<0.001	<0.001	0.348	0.825
<i>HGF</i> (ng/l)	907 ± 101	7186 ± 492	861 ± 98	6307 ± 461	<0.001	<0.001	0.757	0.541
<i>NGF</i> (ng/l)	10.8 ± 2.0	12.0 ± 1.4	6.05 ± 1.15	11.21 ± 2.31	0.698	0.022	0.467	0.688
<i>sE-selectina</i> (µg/l)	16.4 ± 1.4	77.3 ± 5.7	17.50 ± 1.63	82.68 ± 6.13	<0.001	<0.001	0.402	0.746
<i>sICAM-1</i> (µg/l)	176 ± 28	81 ± 7	121 ± 5	76 ± 3	<0.001	<0.001	0.018	0.662
<i>sVCAM-1</i> (mg/l)	1.00 ± 0.05	1.52 ± 0.07	1.03 ± 0.05	1.66 ± 0.10	<0.001	<0.001	0.263	0.135
<i>tPAI-1</i> (µg/l)	38.8 ± 2.3	53.9 ± 7.6	36.6 ± 3.2	52.8 ± 9.8	0.066	0.094	0.786	0.671
<i>MMP-9</i> (µg/l)	101 ± 11	211 ± 22	71 ± 8	198 ± 21	<0.001	<0.001	0.025	0.919

Los valores se expresan como media ± SEM. *Diferencias estadísticas (P<0.05) entre las madres y la sangre de cordón en ambos grupos, usando el test t de Student para muestras relacionadas y entre los grupos Control y Salmón en las madres y en la sangre de cordón de sus recién nacidos, utilizando un test t de Student para muestras independientes. HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IL-6, interleuquina-6; IL-8, interleuquina-8; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos; MMP-9, metaloproteinasas de la matriz-9; NGF, factor de crecimiento nervioso; sE-selectina, E-selectina soluble; sICAM-1, molécula de adhesión intercelular soluble-1; sVCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; TNF-α, factor de necrosis tumoral-α; tPAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno-1 total

Biomarcadores de homeostasis vascular

Las concentraciones de MMP-9, sE-selectina y sVCAM-1 fueron significativamente más elevadas en la sangre de cordón respecto a la de las madres, tanto en el grupo Control ($P<0.001$, en todos los casos) como Salmón ($P<0.001$, en todos los casos), mientras que la concentración de sICAM-1 fue significativamente menor en la sangre de cordón ($P<0.001$, en los dos grupos). Cuando se analizaron los grupos Control y Salmón, las concentraciones de MMP-9 y sICAM-1 fueron menores en las madres en la semana 38 del embarazo del grupo Salmón ($P=0.025$ y 0.018 , respectivamente), comparado con el grupo Control (Tabla 15).

Correlaciones madre-hijo de la concentración de los biomarcadores de homeostasis vascular en plasma

Únicamente se observaron correlaciones significativas positivas en los niveles plasmáticos de sICAM-1 entre las madres y la sangre de cordón de sus recién nacidos del grupo Control [$n=33$, $r=0.592$, $P<0.001$] (Tabla 16).

Tabla 16. Coeficientes de correlación entre los niveles plasmáticos de adipoquinas y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos

	Grupo					
	Control			Salmón		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P-valor</i>
<i>Adiponectina</i> (mg/l)	32	0.004	0.984	32	0.022	0.905
<i>Leptina</i> (μg/l)	33	-0.100	0.957	32	-0.119	0.515
<i>IL-8</i> (ng/l)	32	-0.175	0.337	31	-0.232	0.209
<i>IL-6</i> (ng/l)	19	0.194	0.427	22	-0.064	0.776
<i>TNF-α</i> (ng/l)	33	0.219	0.220	32	0.191	0.295
<i>MCP-1</i> (ng/l)	32	0.384	*0.030	31	-0.071	0.706
<i>HGF</i> (ng/l)	32	0.092	0.616	31	0.318	0.081
<i>NGF</i> (ng/l)	15	-0.599	*0.018	13	0.522	0.067
<i>sE-selectina</i> (μg/l)	32	0.064	0.728	30	0.188	0.320
<i>sICAM-1</i> (μg/l)	33	0.592	*<0.001	32	0.105	0.568
<i>sVCAM-1</i> (mg/l)	33	0.045	0.803	32	0.165	0.366
<i>tPAI-1</i> (μg/l)	33	0.002	0.990	32	0.268	0.139
<i>MMP-9</i> (μg/l)	33	0.326	0.064	32	0.145	0.429

*Diferencias significativas ($P<0.05$); *r*, coeficiente de correlación. HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IL-6, interleuquina-6; IL-8, interleuquina-8; MCP-1, proteína quimiotáctica de

monocitos; MMP-9, metaloproteínasa de la matriz-9; NGF, factor de crecimiento nervioso; sE-selectina, E-selectina soluble; sICAM-1, molécula de adhesión intercelular soluble-1; sVCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; tPAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno-1 total

Discusión

Discusión

Características generales del estudio

El objetivo principal del estudio SiPS ha consistido en potenciar la ingesta de salmón por parte de mujeres embarazadas que no consumían pescado graso de forma habitual, con el fin de aumentar su ingesta de AGPI-CL $n-3$ (junto con otros nutrientes clave) y así, mejorar el nivel de AGPI-CL $n-3$, tanto en las madres como en los fetos y recién nacidos. La hipótesis de partida de este trabajo de investigación ha sido que una elevada exposición a los AGPI-CL $n-3$ podría afectar a los sistemas inmunitario materno y fetal, tal y como han descrito otros autores que han investigado la exposición temprana a los AGPI-CL $n-3$ de los aceites de pescado (Dunstan *et al.*, 2003a; Dunstan *et al.*, 2003b; Denburg *et al.*, 2005), así como, si dicha intervención podría reducir el riesgo de atopía en la infancia (Dunstan *et al.*, 2003b). El salmón empleado en el estudio fue criado de forma controlada y específica para su uso en el mismo, y proporcionaba 1.8 g de EPA y DHA, 2.08 g de AGPI-CL $n-3$ y 3.56 g de AGPI $n-3$ totales por porción. Cabe destacar que los ingredientes con los que fue alimentado y criado el salmón del estudio, se seleccionaron para que contuvieran bajos niveles de contaminantes. De esta forma, además de ser rico en AGPI-CL $n-3$, este salmón contenía muy bajos niveles de un gran variedad de posibles contaminantes (Miles *et al.*, 2011).

Si las mujeres del grupo Salmón consumían las dos porciones de salmón indicadas a la semana, calculamos que incorporarían semanalmente unos 3.6 g de EPA y DHA a partir de esta fuente. Si comparamos estos valores con las ingestas de EPA y DHA estimadas para adultos, el consumo de estos AGPI-CL aumentaría en estas mujeres por lo menos 18 veces o incluso más. De hecho, si utilizamos los datos de la ingesta de EPA y DHA disponibles a partir de los FFQs y con los diarios sobre ingesta de pescado, éstos fueron 20 veces mayores en el grupo Salmón que en el grupo Control durante el periodo de intervención (Miles *et al.*, 2011). Con estos datos referidos al consumo de dos porciones de pescado graso a la semana, se calcula que, el contenido de EPA y DHA de la dieta suministrada permitiría a las mujeres embarazadas conseguir las actuales recomendaciones sobre la ingesta de los AGPI-CL $n-3$ (Cetin *et al.*, 2008; Opinión del Comité Científico de la AESAN relativa a la propuesta de la CE sobre alegaciones nutricionales de ácidos grasos omega-3 en alimentos efectuada por la Comisión Europea

y a las consideraciones sobre la misma aportadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Revista del Comité Científico de la AESAN nº3, 2003; *EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. EFSA J*, 2010).

En otros estudios se ha descrito previamente que un consumo elevado de pescado o de AGPI-CL *n*-3 está asociado con una mayor duración del embarazo (Olsen *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2006). En nuestro caso, hemos observado que el embarazo fue cinco días más largo en el grupo Salmón que en el grupo Control (Miles *et al.*, 2011), lo que coincide con las desigualdades encontradas previamente por otros autores. Sin embargo, las diferencias halladas no fueron significativas, probablemente debido a nuestro pequeño tamaño de muestra, lo que ha podido limitar la fuerza para detectar esta diferencia como significativa. Otros resultados característicos del embarazo como el peso, la circunferencia de la cabeza y la salud del recién nacido, fueron similares entre grupos (Miles *et al.*, 2011).

Influencia de la ingesta de salmón sobre el nivel de EPA y DHA durante el embarazo

La disminución en los porcentajes de EPA y DHA hallada en el plasma de las madres del grupo Control durante el embarazo (Miles *et al.*, 2011), es totalmente consistente con los datos descritos previamente (Al *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 1995; De Vriese *et al.*, 2003). Nuestros resultados fueron muy similares a los encontrados por otros autores en el plasma de mujeres embarazadas holandesas, belgas y alemanas (Al *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 1995; De Vriese *et al.*, 2003; Berghaus *et al.*, 1998). Al contrario de lo que ocurría en el grupo Control, los porcentajes tanto de EPA como de DHA no disminuyeron en el plasma del grupo Salmón, sino que aumentaron. Concretamente, en el grupo Salmón, durante las semanas 34 y 38 del periodo gestacional, el porcentaje plasmático de EPA fue un 50% más elevado y el DHA un 25% mayor en comparación con el grupo Control (Miles *et al.*, 2011). Además, en la sangre de cordón umbilical, también existió una mayor proporción de EPA y DHA en el grupo Salmón, indicando una elevada transferencia de estos importantes AG al feto, probablemente como consecuencia de la mayor disponibilidad de los mismos en la circulación materna. El mayor porcentaje de EPA y DHA, hallado únicamente en la circulación fetal del grupo Salmón, podría dar

lugar a un desarrollo inmunitario, neural y visual superior en esos niños en comparación con los del grupo Control.

En este trabajo, ya se ha mencionado que los AGPI *n*-3 son beneficiosos para la salud humana y existen evidencias de que son importantes para el normal desarrollo del feto (Neuringer *et al.*, 1984) y de la agudeza visual (Gibson *et al.*, 1999); las necesidades especiales de DHA por parte de la retina y el cerebro durante el desarrollo fetal han sido descritas previamente (Clandinin *et al.*, 1980; Martínez, 1992; Uauy *et al.*, 2001; Makrides *et al.*, 1995). Sin embargo, es importante enfatizar que también son necesarios unos niveles adecuados de los AGPI *n*-6, como el AA, esenciales durante el desarrollo embrionario (Crawford, 2000; Elias *et al.*, 2001), siendo este AG el más abundante de la familia de los *n*-6 en tejido neural y retina (Svennerholm, 1986; Sastry, 1985). La importancia relativa de AG específicos en el crecimiento y el desarrollo normales no está clara, y lo más probable es que unos niveles adecuados sean unos niveles equilibrados.

En algunos estudios se ha descrito un aumento de la concentración de DHA y AA hacia el final del embarazo, especialmente después de recibir algún tipo de suplemento (Montgomery *et al.*, 2003; Otto *et al.*, 2000; Dunstan *et al.*, 2004). De la misma manera, en SiPS observamos un aumento significativo de los porcentajes de DHA y AA al final del periodo gestacional, tanto en el grupo Control como en el grupo Salmón, lo que indica una movilización de estos dos AG desde las reservas de la madre para satisfacer las necesidades del feto. De estos resultados también se deduce que el aporte de AGPI-CL *n*-3 no compromete las demandas de AA. Otra razón que podría explicar este incremento en los niveles de AGPI-CL, sería un aumento en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de estos AG a partir de sus precursores. La incorporación de AG a los lípidos de membrana es un proceso complejo. Las interacciones entre LA y ALA pueden modular la síntesis de AA y DHA y EPA a partir de LA y ALA, respectivamente, debido a que éstos AG compiten por las mismas enzimas desaturasas. En nuestros resultados, observamos que el LA va disminuyendo a lo largo del periodo gestacional, lo que permitiría incrementar la síntesis de EPA y DHA a partir de su correspondiente precursor, el ALA. De hecho, el ALA acumulado en la semana 34 se iría consumiendo durante el último mes de embarazo, para aumentar las concentraciones de los AGPI-CL *n*-3. Este hecho justifica los incrementos de DHA y AA hallados en los dos grupos en este trabajo.

Cabe destacar que durante el embarazo, las reservas de AGPI-CL $n-3$ tienden a agotarse debido a que estos AG son transferidos desde la madre para su utilización de forma preferente por el feto en desarrollo (Hanebutt *et al.*, 2008; Larqué *et al.*, 2003). Esta disminución de AGPI-CL $n-3$ ha sido descrita previamente en otros trabajos (Bonham *et al.*, 2008; Al *et al.*, 1995; Al *et al.*, 1997) y, como consecuencia del desgaste, podría ocurrir que al final del embarazo, el feto y el neonato recibieran un aporte sub-óptimo de estos AGPI-CL (Holman *et al.*, 1991; Otto *et al.*, 1997; Montgomery *et al.*, 2003), si la cantidad aportada a través de la dieta no resultara adecuada. En SiPS, los AGPI-CL $n-3$ proporcionados con el salmón, constituyen una ingesta diaria equivalente de cerca de 500 mg EPA y DHA/día. Otros autores que utilizaron cantidades menores de DHA (184 y 200 mg/día) no evidenciaron ningún efecto en la concentración de este AG (Sanjurjo *et al.*, 2004; Smuts *et al.*, 2003). Sin embargo, un aporte mayor de DHA, de 570 a 1000 mg (o incluso más), sí se reflejaría en la concentración de los AGPI-CL $n-3$ (Helland *et al.*, 2001; Connor *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 2000; van Houwelingen *et al.*, 1995; Dunstan *et al.*, 2004). Por tanto, nuestros resultados siguen la línea de lo descrito previamente y justifica la hipótesis de partida de este trabajo ya que el aporte de esta cantidad de salmón contribuye a mantener las reservas maternas para que no se agoten durante la gestación. A diferencia de nuestros resultados, algunos autores describen que los niveles plasmáticos de AA disminuyen después del aporte de DHA (Montgomery *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2008; Dunstan *et al.*, 2004) o permanecen sin cambios (Bonham *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2003). Por tanto, el aumento de la ingesta materna con AGPI $n-3$ y la elevación de sus niveles plasmáticos más allá de unos ciertos valores, podría resultar en una reducción de otros AG, como el AA, hecho que no ocurre en nuestro estudio.

En lo referente a la sangre de cordón, en el grupo que estaba tomando pescado graso, detectamos una mayor cantidad de AGPI ($n-3$), AGPI $>18C$ ($n-3$) y EPA comparado con las madres en la semana 38 del periodo gestacional, hecho que no ocurre en el grupo Control. Sin embargo, los niveles de EPA, DHA y AA en la sangre de cordón no son diferentes entre ambos grupos. Los resultados obtenidos pueden ser la consecuencia de un transporte preferente de AGPI CL $n-3$ desde la madre al feto, que no depende de los niveles maternos ya que su objetivo es conseguir el aporte necesario de estos ácidos grasos para la correcta formación del feto. Esto coincide con numerosos estudios que han demostrado mayores concentraciones de AGPI-CL $n-3$ en la circulación fetal que en la materna (Al *et al.*, 1990; Montgomery *et al.*, 2003). Aunque los mecanismos moleculares

de la absorción y transporte de AGPI-CL no se entienden completamente, existe un transporte preferente de DHA a partir de la dieta y las reservas corporales maternas hacia el feto (Dutta-Roy *et al.*, 2000; Hanebutt *et al.*, 2008; Larqué *et al.*, 2006b), lo que es corroborado en parte por nuestro estudio. La placenta puede transferir de forma selectiva los AGPI CL *n*-3 a la circulación fetal (Hanebutt *et al.*, 2008; Dutta-Roy, 2000; Larqué *et al.*, 2006b). El transporte de AG a través de la placenta está mediado por varias proteínas de unión de AG, la proteína de unión de AG de la membrana plasmática (FABPpm) y la proteína de transferencia de AG (FAT/CD36, FATP) (Hanebutt *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 1998) y el transporte es selectivo para determinados AG. Los AG AA y DHA son liberados preferentemente a partir de lipoproteínas plasmáticas por lipasas de la placenta (Hanebutt *et al.*, 2008). Además, FABPpm puede enviar selectivamente AGPI-CL a la circulación fetal siendo el orden de preferencia DHA > AA > ALA > LA (Hanebutt *et al.*, 2008; Larqué *et al.*, 2006). Aunque la síntesis de los AGPI-CL a partir de los precursores de los AGE, se ha demostrado que ocurre en recién nacidos pretérmino tan pronto como en la semana 26 de gestación (Uauy *et al.*, 2000), otros autores han estimado que la contribución de la síntesis endógena al conjunto de AGPI-CL en recién nacidos a término es pequeña (Demmelmair *et al.*, 1995; Szitanyi *et al.*, 1999). La realización de nuevos estudios debe ayudar a entender los mecanismos moleculares del transporte de AGPI-CL a través de la placenta y su efecto en relación con un desenlace satisfactorio del embarazo y el desarrollo fetal. La competición por la enzima Δ 6-desaturasa que interviene en el metabolismo tanto del LA para dar AA, como del EPA para dar DHA (Sprecher, 2000), también podría ser la responsable de los elevados índices AGPI *n*-3 encontrados en el grupo que consumía salmón, teniendo en cuenta que otros autores, estudiando embarazos en los que las madres consumían pescado graso o suplementos de aceite de pescado, encontraron niveles elevados de AGPI *n*-3 como el DHA y un menor nivel de AGPI *n*-6 en los eritrocitos de cordón (Sanjurjo *et al.*, 1995; van Houwelingen *et al.*, 1995; Connor *et al.*, 1996; Montgomery *et al.*, 2003). Otro estudio sugiere que dosis de 500 mg de AGPI-CL *n*-3 al día, aumentan significativamente la composición de AGPI-CL *n*-3 en el neonato, sin comprometer el contenido de los AGPI *n*-6 (Velzing-Aarts *et al.*, 2001). De forma similar, el aporte de 0.57 g DHA/día aumentó significativamente los niveles de DHA en plasma y eritrocitos, sin reducir el AA u otro AGPI *n*-6 (Otto *et al.*, 2000).

En conclusión, nuestro estudio demuestra que, si mujeres embarazadas que normalmente no consumen pescado graso, tomaran dos porciones de salmón a la semana, aumentarían significativamente su ingesta de AGPI-CL *n*-3, cumplirían las actuales recomendaciones de ingesta con la dieta de DHA y AGPI-CL *n*-3 y mejorarían su status de EPA y DHA, evitando la disminución asociada a estos AG durante el embarazo y aumentando los niveles de EPA y DHA en sus fetos y recién nacidos.

Influencia de la ingesta de salmón sobre los niveles de diversos biomarcadores de estrés oxidativo durante el embarazo

Los resultados del SIPS, evidenciaron que el estado de estrés oxidativo de mujeres embarazadas, determinado como la concentración de 8-iso-PGF₂α y 8-OHdG en orina y de LPO en plasma, no se vio alterado después de consumir dos porciones de salmón a la semana **Artículo II** (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los F₂-isoprostanos son considerados biomarcadores muy fiables para la determinación del nivel de estrés oxidativo *in vivo* ya que, además de mantenerse muy estables sin formarse productos de autooxidación, se han encontrado en elevada concentración en diversas situaciones asociadas con el estrés oxidativo como la aterosclerosis (Schwedhelm *et al.*, 2004), la diabetes (Davi *et al.*, 2003; Helmersson *et al.*, 2004), la obesidad (Keaney *et al.*, 2003; Sinaiko *et al.*, 2005) o el tabaquismo (Helmersson *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 1998), entre otras. El embarazo se caracteriza por una mayor demanda energética y un aumento de los requerimientos de oxígeno, por lo que cabe esperar que durante el mismo también se produzca un aumento del estrés oxidativo (Basu, 2008). En general, las mujeres con embarazos sanos y sin complicaciones presentan unos niveles más elevados de F₂-isoprostanos, a diferencia de las que no están embarazadas (Hung *et al.*, 2010; Palm *et al.*, 2009; Ishihara *et al.*, 2004). De acuerdo con esto y, en comparación con mujeres no embarazadas, los niveles de F₂-isoprostanos fueron significativamente más elevados en el plasma y la orina de una población de mujeres japonesas, en el tercer trimestre de gestación (Ishihara *et al.*, 2004). Asimismo, se ha observado un aumento progresivo en la concentración de F₂-isoprostanos durante el embarazo normal en la orina de mujeres suecas (Palm *et al.*, 2009). Igualmente, en un estudio reciente, se ha descrito un aumento en la concentración de isoprostanos totales

en el plasma durante el tercer trimestre del embarazo, en comparación con mujeres no embarazadas (Hung *et al.*, 2010). Sin embargo, en otros trabajos, no se han hallado cambios significativos en los niveles de F₂-isoprostanos durante el embarazo (Morris *et al.*, 1998; Mutlu-Turkoglu *et al.*, 1998). Estas desigualdades entre los diversos estudios pueden tener su origen en el método utilizado para la determinación de los isoprostanos o bien, estar relacionadas con diferencias respecto al momento exacto del embarazo en el que tuvo lugar la recolección de muestras. En nuestro caso, no detectamos un aumento en la concentración de F₂-isoprostanos durante el embarazo en ninguno de los dos grupos (García-Rodríguez *et al.*, 2011), lo que indica que el curso del embarazo no provocó un aumento de estrés oxidativo en nuestra población de estudio (indicado como los niveles de 8-iso-PGF₂α en orina).

Otras moléculas relacionadas con el estrés oxidativo, como los LPO, también se han encontrado en elevada concentración durante el embarazo (Keaney *et al.*, 2003; Mutlu-Turkoglu *et al.*, 1998; Toescu *et al.*, 2002). Además, una serie de estudios transversales (Ioika *et al.*, 1991; Ishihara *et al.*, 1978) y otros longitudinales (Carone *et al.*, 1993; Toescu *et al.*, 2002) han descrito concentraciones de LPO elevadas y/o de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante la gestación. Sin embargo, la concentración plasmática de LPO de las mujeres embarazadas de nuestro trabajo, no cambió de forma significativa a lo largo del estudio (García-Rodríguez *et al.*, 2011), sugiriendo que el estado de estrés oxidativo relacionado con los lípidos, no se vio alterado.

La 8-OHdG, un nucleósido derivado de la oxidación del DNA nuclear y mitocondrial, es el biomarcador más utilizado para determinar el daño oxidativo a nivel de los ácidos nucleicos, que se excreta en la orina en función de la reparación del DNA (Wu *et al.*, 2004). El aumento de 8-OHdG en la orina materna se ha asociado con el parto prematuro y el bajo peso al nacer (Kim *et al.*, 2005; Peter Stein *et al.*, 2008). Hung *et al.* (2010), analizaron la concentración de 8-OHdG urinaria en mujeres con embarazos saludables y sin complicaciones y encontraron que los niveles de esta molécula aumentaban conforme avanzaba la gestación. Sin embargo, nosotros no hemos hallado cambios en las concentraciones urinarias de 8-OHdG a partir de la semana 20 del embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2011), lo que indica que el embarazo no tuvo un efecto significativo sobre el daño oxidativo del DNA.

En diversos trabajos, se ha descrito una disminución de las concentraciones de F₂-isoprostanos en relación con el aporte de suplementos ricos en AGPI-CL *n*-3 (Nälsen *et al.*, 2006). Por ejemplo, en el plasma de individuos sanos se ha encontrado una menor concentración de F₂-isoprostanos después de tomar suplementos de aceite de pescado (3.2 g de EPA y DHA/día). También se ha observado que, tanto el EPA como el DHA, son capaces de disminuir la concentración de F₂-isoprostanos en diversas situaciones patológicas, como la diabetes *mellitus* (Mori *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2003) o la hiperlipidemia (Mori *et al.*, 2000). Otro estudio en mujeres postmenopáusicas mostró una disminución en la concentración de isoprostanos después de tomar AGPI-CL *n*-3, en comparación con la ingesta de dietas enriquecidas en otros AG como el oleico o el LA (Higdon *et al.*, 2000). En nuestro trabajo, también encontramos una menor concentración de 8-iso-PGF_{2α} en orina en el grupo Salmón debida fundamentalmente a desigualdades existentes al comienzo del estudio, es decir, en la semana 20 del embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Después de analizar el hábito de fumar, no hallamos diferencias significativas entre los dos grupos de mujeres embarazadas, consideradas en su conjunto como una población saludable. No obstante, a pesar de que las mujeres fueron asignadas de forma aleatoria a los grupos, estas diferencias de concentración de 8-iso-PGF_{2α} a nivel basal se podrían deber al hecho de que el consumo de pescado graso entre los dos grupos ya era diferente, de forma leve aunque significativa, al inicio del estudio, hecho que fue detectado posteriormente al analizar los datos de frecuencia de consumo de alimentos (Miles *et al.*, 2011).

Se ha descrito también que el aporte de AGPI-CL *n*-3 puede provocar un aumento de estrés oxidativo (Filaire *et al.*, 2010; Filaire *et al.*, 2011), debido a la reactividad química de los múltiples dobles enlaces presentes en estas moléculas (Nenseter *et al.*, 1996). Algunos autores han observado que el aporte de AGPI-CL *n*-3 en forma de aceite de pescado, provoca un incremento en los niveles de marcadores de peroxidación lipídica, como los TBARS, en el plasma de personas adultas y sanas (Grundt *et al.*, 2003; McGrath *et al.*, 1996; Palozza *et al.*, 1996). Esto también se ha descrito en un estudio en embarazadas (Franke *et al.*, 2010). En SiPS, en cambio, los niveles de LPO se mantuvieron en unos valores similares tanto en el grupo Control como en el grupo Salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Además, la concentración en orina de 8-OHdG, tampoco se vio alterada después de la ingesta de dos porciones de salmón a la semana (García-Rodríguez *et al.*, 2011), resultados que coinciden con los observados por otros

autores como Shoji *et al.* (2006) tras la administración de 500 mg de DHA y 150 mg de EPA a mujeres embarazadas.

En conjunto, nuestros resultados indican que el estado de estrés oxidativo no aumentó en las mujeres embarazadas, después de incrementar su ingesta de AGPI-CL *n*-3 a partir de dos porciones de salmón a la semana. Hay tres razones que podrían justificar que los AGPI-CL *n*-3 del salmón no provocan un aumento en las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo analizados, a diferencia de los resultados observados tras la administración de suplementos de AGPI-CL *n*-3. La primera razón está relacionada con la dosis o el nivel de ingesta. En SiPS, los AGPI-CL *n*-3 que se tomaron a partir del salmón representaban una ingesta diaria equivalente a unos 500 mg de EPA y DHA/día. En algunos estudios se suministran suplementos de aceite de pescado de varios gramos de EPA y DHA al día, cantidad mucho mayor que la proporcionada en SiPS. En segundo lugar, debe existir alguna diferencia entre suministrar los AGPI-CL *n*-3 en forma de aceite purificado en cápsulas y hacerlo dentro de una matriz alimentaria, como se ha hecho en SiPS. En tercer lugar, las cápsulas utilizadas en muchos estudios, permiten aumentar la ingesta de AGPI-CL *n*-3, sin afectar a la ingesta de antioxidantes a excepción de la vitamina E, que suele estar presente en las cápsulas de aceite de pescado. Sin embargo, el salmón de SiPS proporciona un amplio rango de nutrientes implicados en la defensa antioxidante, como el α - y el γ -tocoferol, la vitamina A y el selenio (Miles *et al.*, 2011), de forma que, además de una ingesta elevada de AGPI-CL *n*-3, el salmón utilizado en SiPS permite elevar el nivel de nutrientes antioxidantes, que actuarían contrarrestando la mayor susceptibilidad a la oxidación de estos AGPI-CL *n*-3 y evitarían así un aumento del estrés oxidativo. En este sentido, Filaire *et al.* (2011), observaron que el aporte de AGPI-CL *n*-3 provocaba un aumento del estrés oxidativo que disminuía cuando se añadían antioxidantes en combinación con los AGPI-CL *n*-3.

En resumen, nuestras observaciones conducen a la conclusión de que, después de la semana 20 del embarazo, no tiene lugar un aumento del estrés oxidativo y que la elevada ingesta de pescado graso hasta el alumbramiento, tampoco provoca un aumento del mismo (García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Influencia de la ingesta de salmón sobre el sistema de defensa antioxidante durante el embarazo

Los resultados del SiPS, revelaron que las actividades GPx y GR y la concentración de Se y glutatión aumentaron significativamente después de la semana 20 del embarazo. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de α - y γ -tocoferol, retinol, β -caroteno y CoQ₁₀ disminuyeron de forma significativa durante el periodo gestacional estudiado. Por otro lado, el consumo de dos porciones de salmón a la semana provocó un incremento de los niveles de Se en los eritrocitos y de retinol en el plasma de estas mujeres, en comparación con el grupo Control que continuó tomando su dieta habitual, baja en pescado. **Artículo III** (García-Rodríguez *et al.*, 2012a)

La GPx, enzima dependiente de selenio, reduce el H₂O₂ y los peróxidos orgánicos y conduce a la oxidación del GSH. El GSSG es reducido por la GR en presencia de NADPH, regenerando de esta forma el GSH. Otro enzima antioxidante, la SOD, actúa neutralizando radicales superóxido, que pueden comenzar el proceso de peroxidación lipídica, mientras que la CAT reacciona de forma muy eficiente con el H₂O₂ para generar agua y oxígeno molecular (Sigalov *et al.*, 1998; Michiels *et al.*, 1994). En SiPS, no encontramos diferencias en las actividades SOD, CAT, GR o GPx o en la concentración de glutatión, después del aporte de dos porciones de salmón a la semana (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), aunque algunos estudios previos demuestran la activación de estos sistemas protectores por acción de los AGPI-CL (Arab *et al.*, 2006). La enzima GPx, que contiene cerca del 60% del Se corporal, es la proteína con selenio más abundante en los mamíferos (Loverro *et al.*, 1996). En nuestro trabajo, hemos encontrado diferencias en cuanto a la concentración de Se entre los dos grupos a nivel basal, debido al hecho de que la ingesta de pescado graso fue, por acción del azar, ligera pero significativamente diferente entre los dos grupos del estudio en la semana 20 del periodo gestacional (Miles *et al.*, 2011). Sin embargo, también hallamos una mayor concentración de selenio en el grupo Salmón en las etapas intermedias del embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), reflejando así el efecto de la ingesta de salmón en la concentración de este oligoelemento. Este incremento de los niveles plasmáticos de Se podría ser un factor subyacente al aumento observado en la actividad GPx en el grupo Salmón, a pesar de no ser significativa. La ingesta o el aporte de Se con la dieta se ha relacionado con una actividad antioxidante enzimática mayor y una menor peroxidación lipídica (Tara *et al.*, 2010). En cambio, la deficiencia de Se conduce a una disminución de la actividad tisular

de las enzimas antioxidantes dependientes de Se que facilitaría el desarrollo de procesos oxidativos (Nève, 2010; Pappas *et al.*, 2008).

Junto con los AGPI-CL *n*-3, el pescado graso también proporciona antioxidantes que pueden ayudar a prevenir el aumento de estrés oxidativo provocado, a su vez, por el aumento de la ingesta de estos AG. Por ejemplo, el α -tocoferol elimina los radicales peróxido liposolubles y es el antioxidante liposoluble más importante (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). En SiPS, no observamos diferencias respecto a la concentración en plasma de vitamina E entre los grupos Control y Salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), lo que coincide con lo descrito en un estudio previo, en el que se aportaba aceite de pescado a mujeres embarazadas (Shoji *et al.*, 2006). Los aceites vegetales son la principal fuente de vitamina E, de tal forma que la cantidad proporcionada por el pescado fue relativamente pequeña y no llegamos a observar diferencias. Nuestros datos indican un comportamiento similar al de la vitamina E para el β -caroteno, sin diferencias entre los dos grupos (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). Franke *et al.* (2010), hallaron diferencias significativas en la concentración plasmática de β -caroteno tras la suplementación con aceite de pescado durante el embarazo, aunque los autores no encontraron una explicación válida para esa mayor concentración de β -caroteno en el grupo que tomaba el suplemento. El β -caroteno elimina radicales peróxido de forma efectiva (Tsuchihashi *et al.*, 1995) y es el precursor del retinol, vitamina de una importancia esencial para el crecimiento y el desarrollo de células y tejidos. En nuestro estudio, la concentración plasmática de retinol fue significativamente mayor en el grupo Salmón, en comparación con el grupo Control (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), a pesar de que la concentración de retinol también fue significativamente diferente entre grupos a nivel basal (Miles *et al.*, 2011). Esta elevada concentración de retinol en el plasma del grupo que tomaba pescado graso, podría explicarse como consecuencia de la ingesta de salmón, que es rico en esta vitamina (Strobel *et al.*, 2007). El CoQ₁₀ tiene un papel clave como enlace redox entre las flavoproteínas y los citocromos de la cadena respiratoria de transporte de electrones y también posee importantes propiedades antioxidantes en condiciones lipofílicas (Palan *et al.*, 2004). Los niveles de CoQ₁₀ en nuestro estudio no se vieron afectados por la ingesta de salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). Por lo tanto, el efecto de la suplementación con AGPI-CL *n*-3 puede ser prooxidante o antioxidante, en función de las condiciones experimentales, de la dosis y del contenido de antioxidantes de la dieta previa, así como de los suplementos proporcionados.

Otro resultado importante de este estudio muestra que las actividades GPx y GR, junto con la concentración de glutatión y selenio, aumentaron de forma significativa en las etapas medias y tardías del embarazo, mientras que las actividades SOD y CAT no se vieron modificadas durante la gestación (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). La información relativa a los cambios que experimentan las actividades de estas enzimas antioxidantes durante el embarazo normal es conflictiva y escasa. Por ejemplo, Loverro *et al.* (1996) describieron que la actividad SOD fue mayor en mujeres embarazadas que en las no gestantes, y que la GPx no manifestó cambios durante el primer, segundo o tercer trimestre del embarazo. En otros trabajos, Djordjevic *et al.* (2004) y Hung *et al.* (2010) mostraron una elevada actividad SOD en mujeres sanas durante el tercer trimestre de gestación. Por el contrario, otros autores han demostrado que las actividades de estas enzimas no se afectan durante el embarazo (Arikan *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2008). Además, la concentración de Se en los eritrocitos experimentó un aumento significativo en la semana 34 del embarazo, como también lo hizo la GR en la semana 38 y el glutatión (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las enzimas GPx y GR parecen tener un papel importante en la eliminación de los peróxidos lipídicos generados durante el embarazo. Este aumento en la actividad del sistema de defensa antioxidante observado en nuestra población, sugiere una respuesta de las defensas antioxidantes al incremento de estrés oxidativo inducido por el embarazo (Shoji *et al.*, 2007; Bruinse *et al.*, 1995).

En SiPS también observamos una disminución significativa en la concentración de todos los antioxidantes no enzimáticos plasmáticos después de la semana 20 del periodo gestacional (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). Este descenso ha sido descrito por otros autores (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Hubel *et al.*, 1997; Oostenbrug *et al.*, 1998) y podría ser un indicador del elevado estrés oxidativo experimentado hacia el final del embarazo, así como del aumento de volumen sanguíneo materno (Palm *et al.*, 2009). Este aumento de estrés oxidativo, podría explicar también las bajas concentraciones plasmáticas de CoQ₁₀ observados durante el tercer trimestre de la gestación (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). La disminución de las concentraciones de β -caroteno y retinol durante el embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios previos (Bruinse *et al.*, 1995; Cikot *et al.*, 2001). El papel que el retinol y sus metabolitos tienen en la reproducción y el desarrollo embrionario se ha establecido de forma clara (Clagett-Dame *et al.*, 2002), y las bajas concentraciones de retinol tanto en la sangre materna como en cordón, han sido asociados con un nivel precario de vitamina A

que, a su vez, podría afectar negativamente al crecimiento fetal (Gazala *et al.*, 2003). Este descenso en las concentraciones plasmáticas de retinol hacia el final del embarazo podría reflejar un aumento de la transferencia y utilización de esta vitamina por parte del feto (Clagett-Dame *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2004). El mantenimiento de unas concentraciones adecuadas de retinol en el feto a expensas de su disminución en la madre, es de vital importancia para un resultado exitoso del embarazo y, un aumento del consumo de salmón podría contribuir a ello.

Influencia de la ingesta de salmón sobre las relaciones madre-hijo del sistema de defensa antioxidante durante el embarazo

Numerosos estudios han evaluado el efecto de los AGPI-CL *n-3* en relación con el desarrollo neural y visual de los recién nacidos, lo que ha demostrado un efecto positivo de los AGPI-CL *n-3* sobre esos parámetros (Uauy *et al.*, 2006; Helland *et al.*, 2003; Bowstra *et al.*, 2003). Sin embargo, su efecto sobre las defensas antioxidantes en cordón o en el recién nacido apenas ha sido estudiado. En nuestro caso, como se ha mencionado anteriormente, las madres que consumieron dos porciones de salmón a la semana, presentaban una concentración de Se más elevada hacia el final del embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2012a). Por otro lado, nuestros datos indican que la concentración de este oligoelemento también fue mayor en la sangre de cordón de sus hijos. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la ingesta de salmón puede mejorar los niveles de Se tanto en las madres como en sus recién nacidos. Además, la concentración de glutatión total también fue más elevada en la sangre de cordón, pero sólo en el grupo cuyas madres tomaron dos porciones de salmón a la semana, mientras que la concentración de selenio fue mayor en los eritrocitos de cordón sólo en el grupo Control. Las actividades de las distintas enzimas antioxidantes analizadas en cordón no se vieron alteradas tras la ingesta por las madres de dos porciones de salmón a la semana. Las interacciones entre los distintos mecanismos antioxidantes enzimáticos en madres e hijos y el efecto de la ingesta de AGPI-CL *n-3* se desconocen, por lo que serían necesarios más estudios en relación con la materia.

Koletzko *et al.* (2003) y, posteriormente, Skouroliahou *et al.* (2010), describieron un aumento de la concentración plasmática de vitamina E después de suministrar a

neonatos prematuros una fórmula comercial rica en AGPI-CL *n*-3. En SiPS, las concentraciones de vitamina E, β -caroteno y CoQ, fueron similares en los dos grupos del estudio, de tal forma que el aporte de AGPI-CL *n*-3 procedentes del salmón, parece no afectar a la concentración de estas moléculas en el recién nacido. A pesar de que la ingesta de dos porciones de salmón a la semana resultara en un aumento de las concentraciones de retinol plasmático en las mujeres embarazadas (García-Rodríguez *et al.*, 2012a), no se observaron diferencias en el plasma de cordón en función de la dieta. Sin embargo, es interesante señalar que la concentración de retinol fue similar en las madres y sus hijos sólo en el grupo Salmón, por lo que la disminución de retinol previamente observada en el plasma de cordón en otros estudios (Berggren-Söderlund *et al.*, 2004; Yeum *et al.*, 1998; Saker *et al.*, 2008) puede haberse visto amortiguada en los neonatos de nuestro estudio gracias al aporte de salmón.

El equilibrio entre los mecanismo oxidantes y antioxidantes en el neonato también puede verse modificado y esto puede afectar negativamente tanto al crecimiento como al desarrollo (Saker *et al.*, 2008; Titova *et al.*, 2012). En SiPS, la concentración de GSSG en la sangre de cordón fue significativamente más elevada en comparación con las madres, tanto en el grupo Control como en el grupo Salmón, de forma que en los neonatos la proporción GSH/GSSG se encuentra alterada, lo que parece indicar una situación de estrés oxidativo. Esto puede deberse al hecho de que los eritrocitos de la sangre de cordón están expuestos a una elevada cantidad de radicales libres (Schechter, 2008; Buonocore *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2011). Por ejemplo, la hemoglobina de tipo fetal puede provocar una mayor producción de ERO que la hemoglobina de los adultos (Schechter, 2008). Por otro lado, al nacer, tendría lugar una elevada exposición a oxígeno que al recién nacido le podría resultar difícil de controlar (Buonocore *et al.*, 2002). El momento del parto también supone una situación de mayor estrés y de generación de radicales libres (Hung *et al.*, 2011). La deficiencia de regeneración del glutatión, también podría haber afectado a la del enzima GPx, lo que explicaría la menor actividad de esta enzima detectada en la sangre de cordón, en los dos grupos del estudio. En nuestro trabajo, las actividades CAT y SOD se mantuvieron dentro de unos valores similares tanto en las madres como en los eritrocitos de cordón de sus hijos. Por otro lado, se observaron correlaciones significativas para la actividad SOD y la concentración de selenio en eritrocitos, lo que indica la importancia de estos elementos tanto en las madres como en sus hijos.

Los neonatos también presentaron una concentración de vitaminas y factores liposolubles significativamente menor que la detectada en sus madres, tanto en el grupo Control como en el grupo con aporte de dos porciones de salmón a la semana. Otros autores (Hågå *et al.*, 1982; Jain *et al.*, 1994), también han descrito menores niveles de tocoferol en el plasma de cordón. Además, en SiPS hallamos una asociación en relación con las concentraciones plasmáticas de α -y γ -tocoferol entre las madres y el cordón de sus recién nacidos. Estas correlaciones coinciden con las observadas en otros trabajos (Hågå, 1982; Cachia *et al.*, 1995; Yeum *et al.*, 1998). Por lo tanto, los tocoferoles pueden estar implicados en la transferencia materno-fetal de esta vitamina. De igual manera, las concentraciones de retinol, carotenoides y CoQ10 fueron significativamente mayores en el plasma materno que en el plasma de cordón, lo que también se ha descrito previamente (Berggren-Söderlund *et al.*, 2004; Yeum *et al.*, 1998; Saker *et al.*, 2008). Sin embargo, no encontramos correlaciones significativas en relación con las concentraciones plasmáticas de retinol o carotenoides entre las madres y sus hijos. En general, los bajos niveles de vitaminas y factores liposolubles encontrados en el plasma de cordón pueden deberse a que la cantidad de lípidos presentes en cordón es menor que en el plasma materno, lo que limitaría su capacidad de transporte (Hågå *et al.*, 1982). También, sugieren una elevada utilización por parte del feto para contrarrestar el aumento de estrés oxidativo aunque, otra posibilidad, es que estas bajas concentraciones evidencien una baja ingesta por parte de las madres que se reflejaría en sus hijos.

En conclusión, nuestros resultados indican que el consumo de dos porciones de salmón a la semana puede elevar las concentraciones de Se y retinol en las mujeres embarazadas y en el cordón de sus hijos. Estos cambios van acompañados de un aumento de las actividades GPx y GR y de las concentraciones de selenio y glutatión durante el embarazo y de un aumento de GSSG y una disminución de la actividad GPx en cordón. Esta mejora de las defensas antioxidantes podría ayudar a prevenir/y o reducir el estrés oxidativo adicional generado en el periodo gestacional. Sin embargo, la influencia del aporte de AGPI-CL *n*-3 todavía es controvertida y son necesarios nuevos estudios para determinar el efecto del pescado y de los AGPI *n*-3 sobre el estrés oxidativo.

Influencia de la ingesta de salmón sobre las concentraciones plasmáticas de adipoquinas,

biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular durante el embarazo

En nuestro estudio, los niveles de adipoquinas junto con el perfil de biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular no se vieron afectados en las mujeres embarazadas después de la ingesta de dos porciones de salmón a la semana (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). No obstante, la concentración de sICAM-1 hallada en el grupo Salmón fue menor que en el grupo Control, desde la semana 20 de gestación hasta la semana 38. Los cambios observados en la glucosa y los lípidos plasmáticos durante el embarazo, así como en la insulina, fueron consistentes con informes previos (Butte *et al.*, 2000; Catalano *et al.*, 2007; Paradisi *et al.*, 2002) y no se detectaron mayores efectos del consumo de salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Las adipoquinas son sustancias bioactivas derivadas del tejido adiposo, como la adiponectina y la leptina. Además, citoquinas como el TNF- α y la IL-6 igualmente pueden ser secretadas por este tejido (Briana *et al.*, 2009). La adiponectina y también la leptina, parecen intervenir en el embarazo normal, así como en sus complicaciones (Mazaki-Tovi *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2006; Miehle *et al.*, 2012). La adiponectina regula la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa (Catalano *et al.*, 2006; Mazaki-Tovi *et al.*, 2007), está implicada en el metabolismo lipídico y tiene un efecto protector en situaciones de inflamación (Ballantyne *et al.*, 2005). El desarrollo de enfermedades como la diabetes gestacional o la preeclampsia (Mazaki-Tovi *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2006; Miehle *et al.*, 2012) se ha relacionado con las concentraciones de adiponectina en plasma sanguíneo. La información existente respecto al embarazo normal es contradictoria. Algunos autores han descrito que las concentraciones plasmáticas de adiponectina permanecen sin cambios durante el embarazo (Cortelazzi *et al.*, 2007; Mazaki-Tovi *et al.*, 2007), lo que podría entenderse como un mecanismo protector contra el aumento gradual de la resistencia a la insulina. En cambio, en SiPS y, como han relatado también otros autores (Catalano *et al.*, 2006), la secreción de adiponectina materna disminuyó de forma progresiva durante el curso del embarazo, en todas las gestantes. Este resultado respecto a los niveles de adiponectina sería coherente con la disminución de la sensibilidad a la insulina característica de este estado, como consecuencia del aumento progresivo de masa grasa. En lo que se refiere al efecto AGPI-CL *n*-3 sobre esta adipoquina, en varios trabajos se ha descrito un aumento de las concentraciones plasmáticas de adiponectina después de la administración de aceite de

pescado en individuos obesos (Puglisi *et al.*, 2011; Itoh *et al.*, 2007); en cambio, el efecto de la intervención con los AGPI-CL *n*-3 sobre los niveles plasmáticos de adiponectina durante el embarazo no está claro. Así, y de acuerdo con lo descrito por Rytter *et al.* (2011) recientemente, en SiPS no observamos un aumento en la concentración plasmática de adiponectina en nuestras voluntarias embarazadas después de la ingesta de salmón.

Otra adipoquina, la leptina, es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina mejorando la secreción de esta hormona, la utilización de glucosa, la síntesis de glucógeno y el metabolismo lipídico (Wauters *et al.*, 2000). Las concentraciones plasmáticas de leptina tienden a aumentar hacia el tercer trimestre de la gestación y, en el parto, descienden hasta los niveles basales previos al embarazo (Highman *et al.*, 1998). Existen importantes evidencias que demuestran que la placenta, en lugar del tejido adiposo materno, contribuye al aumento de la concentración de leptina durante el embarazo (Briana *et al.*, 2009). Además, el feto también contribuye a la producción de leptina comenzando su producción en el segundo trimestre (Lepercq *et al.*, 2001), aunque en mucho menor medida que la placenta. Una posible función del aumento de las concentraciones de leptina plasmática durante el embarazo es facilitar la movilización de las reservas de grasa de la madre para aumentar su disponibilidad y mantener la transferencia de los sustratos lipídicos a través de la placenta (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006). Sin embargo, una elevada secreción de leptina durante el embarazo se ha asociado tanto con la obesidad como con la diabetes *mellitus* de tipo gestacional o la preeclampsia (Jansson *et al.*, 2008; Miehle *et al.*, 2012). De acuerdo con otros trabajos previos (Miehle *et al.*, 2012; Sattar *et al.*, 1998; Highman *et al.*, 1998), en SiPS encontramos un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de leptina a través de la gestación en los dos grupos del estudio, sin observarse diferencias entre ambos; por lo que el consumo de dos porciones de pescado graso no afectó a sus niveles. En otras situaciones tanto fisiológicas como patológicas, tampoco está claro el efecto de los aceites de pescado en la modulación de las concentraciones de leptina en plasma, tal y como describen Puglisi *et al.* (2011), por lo que se requieren nuevos estudios para aclarar este efecto.

La formación de la placenta es un proceso que va acompañado de una compleja modulación de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular, las moléculas de adhesión y otros factores que controlan todo el proceso. Las citoquinas se producen localmente en los tejidos en desarrollo y están presentes en los fluidos cérvico-vaginales y amnióticos (Saito, 2001; Bowen *et al.*, 2002). Estos acontecimientos se vieron

reflejados en el plasma materno de las voluntarias de SiPS, ya que se detectó una concentración significativamente más elevada de la quimioquina IL-8 con la progresión del embarazo (García-Rodríguez *et al.* 2012b), una característica que ha sido observada también por otros autores (Sharma *et al.*, 2007). Por otro lado, la modulación de la IL-6 durante el embarazo no está bien establecida. Mientras que en gestantes se ha descrito un aumento de la IL-6 (Vassiliadis *et al.*, 1998), en SiPS no encontramos un incremento de las concentraciones plasmáticas de esta citoquina (García-Rodríguez *et al.* 2012b), como tampoco lo observaron Makhseed *et al.* (2003). Además, de acuerdo con muchos otros autores (Vassiliadis *et al.*, 1998; Makhseed *et al.*, 2003; Laham *et al.*, 1994) la concentración de TNF- α permaneció estable a lo largo del embarazo. El efecto de dietas enriquecidas en AGPI-CL *n*-3 sobre el perfil de citoquinas durante el embarazo no se ha descrito previamente, aunque el suministro de cápsulas ricas en estos ácidos grasos ha demostrado un descenso en su producción en algunos estudios en voluntarios adultos sanos (Meydani *et al.*, 1991; Krauss-Etschmann *et al.*, 2008). La intervención dietética con pescado graso en nuestro grupo de mujeres embarazadas no mostró un efecto sobre las concentraciones plasmáticas de citoquinas (García-Rodríguez *et al.* 2012b). A diferencia de otros trabajos, los AGPI-CL *n*-3 proporcionados por el salmón se corresponden con una ingesta diaria equivalente a 500 mg de EPA y DHA/día, por lo que la razón de que no hayamos detectado cambios, podría ser la pequeña cantidad suministrada de estos AG en comparación con otros estudios que han utilizado suplementos de aceite de pescado, en los cuales se han proporcionado estos AG en una cantidad mucho mayor que el salmón (Meydani *et al.*, 1991; Krauss-Etschmann *et al.*, 2008).

La MCP-1 es una quimioquina con capacidad para atraer a los leucocitos, los cuales se infiltran en sitios de inflamación (Melgarejo *et al.*, 2009). Aunque el comportamiento de la MCP-1 durante el embarazo puede ser de gran interés por tratarse de un estado de inflamación sistémica, hay pocos datos disponibles al respecto. En nuestro estudio, hemos observado un aumento significativo durante el embarazo en ambos grupos de mujeres (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). Además, la información existente en relación con el impacto de los AGPI-CL *n*-3 sobre los niveles de MCP-1 también es limitada. A pesar de la capacidad de los AGPI-CL *n*-3 para modular la respuesta inflamatoria *in vitro* (Wang *et al.*, 2009), Ambrig *et al.* (2006) no observaron cambios en la respuesta de MCP-1 en sujetos sanos, al igual que nosotros en las voluntarias embarazadas (García-Rodríguez *et al.*, 2012). Asimismo, se carece de datos sobre el impacto de los AGPI *n*-3

derivados de pescado en los niveles plasmáticos de esta quimioquina durante el embarazo.

Por otro lado, HGF es una quimioquina que causa proliferación en varios tejidos, incluyendo al trofoblasto, y se cree que juega un importante papel en los procesos tanto de implantación como de placentación (Ferretti *et al.*, 2007); al mismo tiempo, tiene carácter antiinflamatorio (Ito *et al.*, 2008). Hay muy pocos trabajos que proporcionen información sobre los niveles de HGF durante el embarazo y, los que hay, conducen a resultados conflictivos. Los niveles de HGF pueden aumentar durante el embarazo (Clarck *et al.*, 1998), o no diferir entre mujeres embarazadas y las que no lo están (Watanabe *et al.*, 2006). Como Clarck *et al.* (1998), en nuestras voluntarias observamos un aumento significativo en la concentración de HGF durante el periodo gestacional, tanto en el grupo Control como en el de Salmón (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). Que nosotros sepamos, no existe información en relación con el efecto de AGPI-CL *n*-3 sobre los niveles de HGF en el organismo y en nuestro trabajo no encontramos diferencias debidas a la intervención dietética (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Por último, NGF es una molécula neurotrófica clásica, implicada en las respuestas inmunitaria e inflamatoria y, recientemente, descrita también como adipoquina (Trayhurn *et al.*, 2004). En SiPS, los niveles de NGF permanecieron constantes durante el embarazo en ambos grupos de mujeres embarazadas, por lo que tampoco detectamos un efecto de la dieta sobre los niveles de esta molécula (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). La relación entre la concentración de NGF, los cambios fisiológicos durante el embarazo y el suministro de AGPI-CL *n*-3 es un campo que requiere futuras investigaciones, ya que hasta la fecha no se han encontrado datos publicados.

Por otra parte, en nuestro estudio observamos que las concentraciones de moléculas de adhesión al endotelio vascular como sE-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1 aumentaron de forma significativa durante el embarazo (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). La sE-selectina interviene en la fase inicial de rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio en el proceso inflamatorio. ICAM-1 y VCAM-1 participan como intermediarios en la migración de los leucocitos a las células endoteliales y están sobre-expresados en las respuestas inmunitaria e inflamatoria (Madan *et al.*, 2009; Saarelainen *et al.*, 2006). A pesar de los cambios metabólicos y reguladores que tienen lugar durante el embarazo (Saarelainen *et al.*, 2006), hacia el final del mismo se produce un aumento de la función

endotelial, que podría dar explicación a nuestros resultados. Por otra parte, estudios previos han demostrado que los AGPI-CL *n-3* que se encuentran en el pescado graso y en los aceites de pescado, pueden disminuir la expresión de estas moléculas en diversas poblaciones (Rangel-Huerta *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, Abe *et al.* (1998) demostraron una reducción de la concentración de sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina después del suministro durante 8 semanas de 2.2 g de EPA y 1.8 g de DHA/día en hombres diabéticos e hipertriglicéridémicos de mediana edad. Sin embargo, no se han encontrado trabajos con embarazadas como voluntarias. Previamente, se ha observado que el aumento de la ingesta de salmón durante el embarazo es capaz de amortiguar la activación de células endoteliales aisladas de las venas del cordón umbilical, recolectadas a partir de la descendencia al nacer, por activación con LPS, ya que disminuye la expresión de ICAM-1 en la misma población del estudio (van den Elsen *et al.*, 2011). Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de sICAM-1 fue menor en el grupo salmón durante la gestación (García-Rodríguez *et al.*, 2012b), lo que sugiere que la ingesta de este pescado graso contribuye a mantener unos niveles de esta molécula de adhesión celular reducidos. La razón por la que la concentración plasmática de sVCAM-1 también fue menor en la semana 20 del periodo gestacional, pudo deberse al hecho de que, después de dividir a las embarazadas del estudio de forma aleatoria, se descubrió que el consumo de pescado graso fue mayor en el grupo salmón al comienzo del estudio (Miles *et al.*, 2011). No obstante, los efectos podrían ser mayores con dosis más elevadas de AGPI-CL *n-3* que las utilizadas en SiPS.

Otra molécula implicada en la homeostasis vascular es el PAI-1, su función es inhibir la activación del plasminógeno y actúa como proteína de respuesta de fase aguda. Se ha descrito que sus concentraciones plasmáticas aumentan durante el proceso inflamatorio (Skurk *et al.*, 2004). De acuerdo con Coolman *et al.* (2006), en nuestro estudio observamos un aumento de PAI-1 durante el embarazo sin complicaciones. Además, se han descrito incrementos aún mayores en gestaciones complicadas (Mori *et al.*, 2010). Por otro lado, el efecto del suministro con la dieta de AGPI-CL *n-3* sobre los niveles de PAI-1 no está claro. Los resultados encontrados en la literatura son contradictorios, encontrándose descrito un aumento de esta molécula (Hansen *et al.*, 2000), una disminución (Junker *et al.*, 2001) o ningún efecto (Finnegan *et al.*, 2003). Además, no hay datos publicados hasta ahora sobre el efecto de una intervención dietética con AGPI *n-3* sobre las concentraciones plasmáticas de PAI-1 durante el embarazo. Los AGPI-CL *n-3* suministrados a las embarazadas de nuestro estudio a través

del consumo de dos porciones de salmón no modificaron los niveles de este biomarcador (García-Rodríguez *et al.*, 2012b), lo que puede reflejar la importancia biológica del PAI-1 durante la gestación. Por último, a pesar de la contribución de MMP-9 en la degradación de la matriz extracelular coriónica y amniótica (Castellucci *et al.*, 2000), nuestros resultados muestran que la concentración de MMP-9 permaneció estable durante la gestación (García-Rodríguez *et al.*, 2012b). Además, aunque se ha descrito que los AGPI-CL *n-3* disminuyen de forma significativa las concentraciones plasmáticas de MMP-9 (Shinto *et al.*, 2011), no existe información sobre su efecto en mujeres embarazadas. En SiPS no detectamos diferencias significativas después del aporte de las mujeres embarazadas con pescado graso (García-Rodríguez *et al.*, 2012b).

Influencia de la ingesta de salmón sobre las relaciones madre-hijo de adipoquinas, biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular

Todos los parámetros bioquímicos y lipídicos analizados mostraron unos niveles significativamente menores en cordón que en el plasma materno y esto ocurrió en los dos grupos del estudio, de tal forma que la intervención dietética con salmón no afectó de manera significativa a estos parámetros. Igualmente, Schaefer-Graf *et al.* (2011), en comparaciones madre-cordón en un grupo con diabetes gestacional y otro grupo control, observaron menores niveles plasmáticos de glucosa, insulina, TAG y colesterol en cordón, además de un índice HOMA-IR también más pequeño en los dos grupos del estudio. Las diferencias madre-hijo se podrían explicar debido a la escasa actividad lipolítica que presenta el tejido adiposo del recién nacido.

En la sangre de cordón de los recién nacidos de SiPS, nos encontramos con unas concentraciones de adiponectina significativamente más elevadas que en sus madres, tanto en el grupo Control como en el grupo Salmón. En este sentido, otros autores (Mantzoros *et al.*, 2004; Kotani *et al.*, 2004), han confirmado que los recién nacidos presentan unos niveles de adiponectina de dos a tres veces mayores que los adultos. Una posible explicación para este hecho es que los neonatos tienen, significativamente, menos masa grasa que los niños y los adultos, y que ésta consiste fundamentalmente en grasa subcutánea y tejido adiposo marrón, el cual es minoritario en los adultos. Aunque Kotani *et al.* (2004) no determinaron los niveles de adiponectina plasmática maternos, en

nuestro trabajo al igual que en otros estudios (Sivan *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004), se ha demostrado que no existe asociación entre las concentraciones plasmáticas de esta hormona en la madre y la sangre de cordón, lo que indica que la adiponectina presente en la sangre de cordón no deriva de la circulación materna. Por otro lado, Hassink *et al.* (1997), demostraron que los recién nacidos tenían mayor concentración de leptina que sus madres, lo que también hemos observado en SiPS, aunque de forma no significativa. En este caso, también se ha sugerido que el feto puede producir su propia leptina (Lepercq *et al.*, 2001), a pesar de que otros autores han detectado una gran disminución de leptina poco después de nacer (Valūnienė *et al.*, 2007), de tal forma que la placenta sería la principal fuente de producción de leptina para el feto. Como ocurría con la adiponectina y, del mismo modo que Yildiz *et al.* (2002), nosotros tampoco encontramos asociación entre la concentración de leptina plasmática en la madre y en la sangre de cordón.

Se observaron concentraciones plasmáticas de IL-8, IL-6 y TNF- α significativamente más elevados en el plasma de cordón que en las madres, y estas diferencias se detectaron tanto en el grupo Control como en el grupo Salmón. En cambio, Catalano *et al.* (2009) observaron unas concentraciones similares de IL-6 y TNF- α en madres y cordón. Por otro lado, Satar *et al.* (2008), han descrito que las concentraciones de IL-6 e IL-8 fueron menores en plasma de cordón que en las madres, mientras que el TNF- α se mantuvo en unos niveles similares en individuos sanos, siendo aún más elevadas las concentraciones encontradas cuando existe infección (Satar *et al.*, 2008). Por tanto, la información relativa al nivel de citoquinas en condiciones saludables es escasa y contradictoria. En SiPS, el aumento de concentración observado en la sangre de cordón podría deberse a una transferencia a partir de la madre. Sin embargo, Reisenberg *et al.* (1996), hallaron previamente que la IL-8 no se transfiere a través de la placenta, en ninguna dirección. En el trabajo de Zaretsky *et al.* (2004), se observaron los mismos resultados, esta vez para TNF- α . En la misma línea, la IL-6 tampoco sirve como mensajero entre la madre y el feto (Aaltonen *et al.*, 2005). Asimismo, nosotros no detectamos correlaciones significativas madre-hijo, por lo que parece no existir transferencia de ninguna de estas moléculas del lado materno al fetal.

En cuanto a las concentraciones plasmáticas de MCP-1, anteriormente no se ha estudiado su relación en pares madre-cordón. En SiPS, descubrimos una elevada concentración de MCP-1 en el plasma de cordón, en los dos grupos del estudio y

correlaciones significativas entre madres e hijos en relación con esta molécula. Este aumento de MCP-1 en la sangre de cordón umbilical puede deberse al hecho de que en las etapas últimas del embarazo, MCP-1 es liberado predominantemente por tejido embrionario (Denison *et al.*, 1998). No obstante, son necesarios nuevos estudios para conocer mejor el comportamiento de esta molécula en cordón y en relación con la concentración de MCP-1 materna. Que nosotros sepamos, tampoco existe información al respecto sobre los niveles de HGF o NGF. En nuestro trabajo, la concentración de estas moléculas fue significativamente más elevada en los recién nacidos que en las madres y, además, encontramos correlaciones madre-hijo significativas para NGF.

También en SiPS, los valores de las moléculas de adhesión fueron significativamente diferentes entre madres e hijos, ya que en la sangre de cordón observamos concentraciones plasmáticas más elevadas de sE-selectina y sVCAM-1, mientras que el plasma materno presentó una mayor concentración de sICAM-1. En pocos estudios se ha analizado la concentración de las moléculas de adhesión en la circulación fetal o del recién nacido (Krauss *et al.*, 1997; Steinborn *et al.*, 1999). No obstante, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Krauss *et al.* (1997). Aunque parece que estas moléculas no pasan hacia la circulación fetal (Krauss *et al.*, 1997; Steinborn *et al.*, 1999), en nuestro trabajo también encontramos correlaciones para sICAM-1. Los valores de PAI-1 fueron similares entre madres e hijos y no se observaron correlaciones respecto al nivel plasmático de esta molécula, coincidiendo con los resultados de Catarino *et al.* (2008). Sin embargo, en otros estudios como el de Boutsikou *et al.* (2010), se han descrito concentraciones plasmáticas de PAI-1 mayores en la madre que en el feto. Las diferencias encontradas para estas moléculas pueden reflejar una relativa inmadurez de la circulación fetal en comparación con el sistema vascular completamente diferenciado de la madre. Además, la concentración de MMP-9 fue significativamente más elevada en cordón que en la madre y tampoco se observaron correlaciones para este parámetro. Diversas evidencias indican que el trabajo de parto normal en la mujer determina un proceso inflamatorio, caracterizado por el aumento de diversas moléculas como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión y MMPs (Kemp *et al.*, 2009; Briana *et al.*, 2009), aún en ausencia de infección, y esto podría tener alguna influencia sobre los elevados niveles de estas moléculas detectados en cordón.

Los AGPI-CL *n-3* contenidos en las dos porciones de salmón suministradas a las madres cada semana, no afectaron a la concentración de adipoquinas, como tampoco afectaron a los biomarcadores de inflamación o de homeostasis vascular en el plasma de cordón, encontrándose valores similares en los dos grupos del estudio. La información hallada en relación con el efecto de los AGPI-CL *n-3* sobre las distintas moléculas analizadas es escasa. Por ejemplo, en la descendencia de pacientes con diabetes *mellitus* de tipo 2 con una ingesta de 2 g de AGPI-CL al día, se observó una mejora de la función endotelial y una disminución de TNF- α (Rizza *et al.*, 2009). A diferencia de nuestro estudio, el aporte de AGPI-CL *n-3* fue bastante mayor. Además, diversos autores han encontrado una disminución de los niveles de distintos biomarcadores (citoquinas en plasma, entre otros), en relación con el carácter antiinflamatorio de estos AG y el desarrollo de enfermedades como las alergias (Calder *et al.*, 2010; Kremmyda *et al.*, 2011; Dunstan *et al.*, 2003; Krauss-Etschmann *et al.*, 2008), de forma que el suministro de estos AGPI-CL *n-3* durante el embarazo puede tener un efecto protector en la descendencia.

En resumen, nuestros resultados indican que las adipoquinas, junto con los biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular exhibieron cambios específicos dependientes del tiempo durante la segunda mitad del embarazo, aunque no se vieron afectados por el consumo de dos porciones de salmón a la semana. En la sangre de cordón, estos biomarcadores tampoco se vieron afectados de forma negativa tras la ingesta de salmón.

Conclusions

Conclusions

- Pregnant women, who do not regularly eat oily fish, when consuming two portions of salmon per week, increase their intake of EPA and DHA, achieving the recommended minimum intake, and they increase their maternal and fetus' status of EPA and DHA.
- The intake of two portions of salmon per week during pregnancy does not increase oxidative stress, as judged by the markers of oxidative damage to lipids and DNA measured herein.
- Consumption of two portions of salmon per week increases concentrations of selenium and retinol in pregnant women, with a concomitant increase in GPx and GR activities and selenium and glutathione concentrations throughout pregnancy. This enhancement in antioxidant defenses might be helpful to prevent and/or reduce additional oxidative stress during pregnancy.
- Carbohydrate and lipid metabolism, along with plasma adipokines, proinflammatory cytokines and vascular homeostasis biomarkers are not adversely affected after increased consumption of two portions of salmon per week in the pregnant state.
- Consumption of two portions of farmed salmon per week by pregnant women does not adversely affect the antioxidant defense system, carbohydrate and lipid metabolism, adipokines, cytokines or vascular homeostasis biomarkers status of their offspring.

Bibliografía

Bibliografía

- Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol* 2005; 106(4): 802-807.
- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, Smith CW, Ballantyne CM. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(5): 723-731.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
- Al MD, Hornstra G, van der Schouw YT, Bulstra-Ramakers MT, Huisjes HJ. Biochemical EFA status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Hum Dev* 1990; 24(3): 239-248.
- 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(8): 548-553.
- Al MD, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, de Jong AE, Hornstra G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Br J Nutr* 1995; 74(1):55-68.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(10): 1634-1650.
- Ambrig A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(3): 575-581.
- Arab K, Rossary A, Flourie F, Tourneur Y, Steghens JP. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gammaglutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr.* 2006 ; 95(1): 18-26.
- Arikan S, Konukoglu D, Arikan C, Akcay T, Davas I. Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 51(3): 145-149.
- Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(4): 1751-1756.
- Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl* 2005; 6(2): 21-29.
- Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, Singh K, Waters T, Minium J, Presley L, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19(3): 476-482.
- Basu S. F2-Isoprostanes in human health and diseases: From molecular mechanisms to clinical implications *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(8): 1405-1434.
- Basu, S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F2 α : an index for oxidative injury via free radical catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 58(4): 319-325.

- Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q₉, coenzyme Q₉H₂, coenzyme Q₁₀, coenzyme Q₁₀H₂, and vitamin E with a simplified on-line solid phase extraction. *Methods Enzymol* 2004; 378: 156-162.
- Bendich A, Olson JA. Biological actions of carotenoids. *FASEB J* 1989; 3(8): 1927-1932.
- Berggren Söderlund M, Fex GA, Nilsson-Ehle P. Concentrations of retinoids in early pregnancy and in newborns and their mothers. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(3): 633-636.
- Berghaus TM, Demmelmair H, Koletzko B. Fatty acid composition of lipid classes in maternal and cord plasma at birth. *Eur J Pediatr* 1998;157:763-8.
- Bergmann RL, Haschke-Becher E, Klassen-Wigger P, Bergmann KE, Richter R, Dudenhausen JW, Grathwohl D, Haschke F. Supplementation with 200 mg/day docosahexaenoic acid from mid-pregnancy through lactation improves the docosahexaenoic acid status of mothers with a habitually low fish intake and of their infants. *Ann Nutr Metab* 2008; 52(2): 157-166.
- Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 2003; 531(1-2): 37-80.
- Blackburn S. Cytokines in the perinatal and neonatal periods: selected aspects. *J Perinat Neonatal Nurs* 2008; 22(3): 187-190.
- Bonham MP, Duffy EM, Wallace JM, Robson PJ, Myers GJ, Davidson PW, Clarkson TW, Shamlaye CF, Strain JJ. 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; 85(6): 407.
- Borland SE, Robinson S, Crozier, SR, Inskip HM & SWS Study Group. Stability of dietary patterns in young women over a 2-year period. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(1): 119-126.
- Boutsikou T, Mastorakos G, Kyriakakou M, Margeli A, Hassiakos D, Papassotiriou J, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A. Circulating levels of inflammatory markers in intrauterine growth restriction. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 790605.
- Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002; 23(4): 257-273.
- Bowstra H, Dijck-Brouwer DA, Wildeman JA, Tjoonk HM, van der Heide JC, Boersma ER, Muskiet FA, Hadders-Algra M. Long-chain polyunsaturated fatty acids have a positive effect on the quality of general movements of healthy term infants. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(2): 313-318.
- Brenner R, Peluffo RO. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1969; 176(3): 471-479.
- Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci* 2009; 16(10): 921-937.
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zigg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(4): 703-716.
- British Nutrition Foundation. Briefing paper: n-3 fatty acids and health. London: British Nutrition Foundation, 1999.
- Bruinse HW, van den Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 61(1): 31-37.
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, Bracci R. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res* 2002; 52(1): 46-49.

- Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5 Suppl): 1256S-1261S.
- Cachia O, Leger CL, Boulot P, Vernet MH, Michel F, Crastes de Paulet A, Descomps B. Red blood cell vitamin E concentrations in fetuses are related to but lower than those in mothers during gestation. A possible association with maternal lipoprotein (a) plasma levels. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(1): 42-51.
- Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack G, Matellio G, Reuz H, Sangild PT, Schrezenmeir J, Stulnig TM, Thymann T, Wold AE, Koletzko B. Workshop Report: Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *Br J Nutr* 2006; 96(4): 774-790.
- Calder PC, Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Miles EA. Is there a role for fatty acids in early life programming of the immune system? *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3): 373-380.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001; 36(9): 1007-1024.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(8): 885-897.
- Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, Dutta-Roy AK. Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* 1998; 19(5-6): 409-415.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-490.
- Carone D, Loverro G, Greco P, Capuano F, Selvaggi L. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 51(2): 103-109.
- Casadesus G, Smith MA, Basu S, Hua J, Capobianco DE, Siedlak SL, Zhu X, and Perry G. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 2007; 2: 2.
- Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurrò V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(10): 951-958.
- Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, Hauguel-De Mouzon S. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2006; 49(7): 1677-1685.
- Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 2009; 32(6): 1076-1080.
- Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; 109(2 Pt 1): 419-433.
- Catarino C, Rebelo I, Belo L, Rocha S, Castro SB, Patricio B, Quintanilha A, Santos-Silva A. Relationship between maternal and cord blood hemostatic disturbances in preeclamptic pregnancies. *Throm Res* 2008; 123(2): 219-224.
- Caughey GE, Mautzions E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(1): 116-122.
- Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res* 2001; 49(6): 755-762.

- Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, Garcia I, Boget S, Parvaz P, Revol A. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 752(1): 123-132.
- Cetin I, Berti C, Calabrese S. Role of micronutrients in the periconceptional period. *Hum Reprod Update* 2010; 16(1): 80-95.
- Cetin I, Koletzko B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. *Curr Opin Clin Nutr & Metab Care* 2008; 11(3): 297-302.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253(1-2): 269-285.
- Chan TF, Yuan SS, Chen HS, Gun CF, Wu LC, Yeh YT, Chung YF, Jong SB, Su JH. Correlations between umbilical and maternal serum adiponectin levels and neonatal birthweights. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83(2): 165-169.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-605.
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26(8): 2442-2450.
- Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 2001; 85(1): 49-58.
- Clagett-Dame M, DeLuca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 347-381.
- Clandinin MT, Chappell JE, Leon S, Heim T, Swan PR, Chance GW. Intrauterine fatty acid accretion in human brain implications for fatty requirements. *Early Hum Dev* 1980; 4(2): 121-129.
- Clark DE, Salvig JD, Smith SK, Charnock-Jones DS. Hepatocyte growth factor levels during normal and intra-uterine growth-restricted pregnancies. *Placenta* 1998; 19(8): 671-673.
- Connor WE, Lowensohn R, Hatcher L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* 1996; 31(Suppl): S183-S187.
- Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. *Dermatology* 1993; 186(1): 23-31.
- Cooke MS, Evans MD, Burd RM, Patel K, Barnard A, Lunec J, Hutchinson PE. Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. *J Invest Dermatol* 2001; 116(2): 281-285 (a).
- Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(12): 1601-1604 (b)
- Cooke MS, Patel K, Ahmad J, Holloway K, Evans MD, Lunec J. Monoclonal antibody to single-stranded DNA: a potential tool for DNA repair studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(1): 232-238.
- Coolman M, de Groot CJ, Steegers EA, Geurts-Moespot A, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP, Sweep FC. Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1-2): 22-28.
- Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, Cetin I, Cortelazzi R, Beck-Peccoz P, Spada A. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 66(3): 447-453.

- Crawford M. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (1 Suppl): 275S-284S.
- Crozier SR, Inskip HM, Godfrey KM, Robinson SM. Dietary patterns in pregnant women: a comparison of food-frequency questionnaires and 4 d prospective diaries. *Brit J Nutr* 2008; 99(4): 869-875.
- Crozier SR, Robinson SM, Borland SE, Inskip HM & SWS Study Group. Dietary patterns in the Southampton Women's Survey. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(12): 1391-1399.
- Crozier SR, Robinson SM, Godfrey KM, Cooper C, Inskip HM. Women's dietary patterns change little from before to during pregnancy. *J Nutr* 2009; 139(10): 1956-1963.
- Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Basili S, Ciabattini G, Patrono C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 2003; 107(25): 3199-3203.
- De Vriese SR, Dhont M, Christophe AB. FA composition of cholesteryl esters and phospholipids in maternal plasma during pregnancy and at delivery and in cord plasma at birth. *Lipids* 2003;38:1-7.
- Demmelair H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B. Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of ¹³C content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21(1): 31-36.
- Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM, et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy. *Ped Res* 2005;57:76-281.
- Denison FC, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. Cytokine secretion by human fetal membranes, deciduas and placenta at term. *Hum Reprod* 1998; 13(12): 3560-3565.
- Denzlinger C, Kless T, Sagebiel-Kohler S, Lemmen C, Jacob K, Willmanns W, Adam O. Modulation of the endogenous leukotriene production by fish oil and vitamin E. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 11(2): 119-132.
- Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, Djordjevic R, Grubor-Lajsic G. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT, and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16(6): 367-372.
- Drabkin DL. The standardization of hemoglobin measurement. *Am J Med Sci* 1948; 215(1): 110.
- Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(6): 1178-1184.
- Dunstan JA, Mori TA, Barden A, et al Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 442-8.
- Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Holt PG, Calder PC, Taylor AL, Prescott SL. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on maternal and fetal erythrocyte fatty acid composition. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(3): 429-437.
- Dutta-Roy AK. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl): 315S-322S.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 2010; 8(3): 1461-1568.

- El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally Ael-G, Hashem IA, Bakry N. Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(7): 879-883.
- Elias SL, Innis SM. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(4): 807-814.
- Erlebacher A, Zhang D, Parlow AF, Glimcher LH. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest* 2004; 114(1): 39-48.
- Fall CH, Yajnik CS, Rao S, Davies AA, Brown N, Farrant HJ. Micronutrients and fetal growth. *J Nutr* 2003; 133(5 Suppl 2): 1747S-1756S.
- Farina L, Winkelman C. A review of the role of proinflammatory cytokines in labor and noninfectious preterm labor. *Biol Res Nurs* 2005; 6(3): 230.
- Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, FAO Food and Nutrition Paper 91, FAO, Rome, 2010.
- Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007; 13(2): 121-141.
- Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, Gobert M, Durand D. Effect of 6 weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2010; 20(6): 496-506.
- Filaire E, Massart A, Rouveix M, Portier H, Rosado F, Durand D. Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids and antioxidant mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(8): 1829-1839.
- Finnegan YE, Howarth D, Minihane AM, Kew S, Miller GJ, Calder PC, Williams CM. Plant and marine derived (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect blood coagulation and fibrinolytic factors in moderately hyperlipidemic humans. *J Nutr* 2003; 133(7): 2210-2213.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.
- Floyd RL, Jack BW, Cefalo R, Atrash H, Mahoney J, Herrou A, Husten C, Sokol RJ. The clinical content of preconception care: alcohol, tobacco, and illicit drug exposures. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(6 Suppl 2): S333-S339.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(12): 4533-4537.
- Franke C, Demmelmair H, Decsi T, Campoy C, Cruz M, Molina-Font JA, Mueller K, Koletzko B. Influence of fish oil or folate supplementation on the time course of plasma redox markers during pregnancy. *Br J Nutr* 2010; 103(11): 1648-1656.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.
- Fukurama S, Fajita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114(12): 1752-1761.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-454.

- Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnel JP, Chade AR, Lerman LO, Lerman A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(2): H904-911.
- García-Rodríguez CE, Helmersson-Karlqvist J, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda S, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A, Basu S. Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women?-The Salmon in Pregnancy Study. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(11): 2819-2823.
- García-Rodríguez CE, Mesa MD, Olza J, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Noakes PS, Miles EA, Ramírez-Tortosa MC, Liaset B, Frøyland L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Aguilera CM, Helmersson-Karlqvist J, Godfrey KM, Calder PC, Basu S, Gil A. Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women? *Antioxid Redox Signal* 2012, *in press* (a).
- García-Rodríguez CE, Olza J, Aguilera CM, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A. Effect of salmon consumption on plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers during gestation (submitted for publication) (b).
- Gazala E, Sarov B, Hershkovitz E, Edvardson S, Sklan D, Katz M, Friger M, Gorodischer R. Retinol concentration in maternal and cord serum: its relation to birth weight in healthy mother-infant pairs. *Early Hum Dev* 2003; 71(1): 19-28.
- Gibson RA, Makrides M. Polyunsaturated fatty acids and infant visual development: a critical appraisal of randomized clinical trials. *Lipids* 1999; 34(2): 179-184.
- Gil A, Sánchez de Medina F. *Tratado de Nutrición*, 2ª Ed. Editorial médica Panamericana. Madrid, 2010. Tomo I, p 57; pp. 141-142; pp. 468-475.
- Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39(8): 1529-1542.
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(6): 956-968.
- Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S, Barberi I. Causes of oxidative stress in the pre- and postnatal period. *Biol Neonate* 2002; 81(3): 146-157.
- Goldman DW, Pickett WC, Goetzl EJ. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Res Commun* 1983; 117(1): 282-288.
- Grundt H, Nilsen DW, Mansoor MA, Nordøy A. Increased lipid peroxidation during long-term intervention with high doses of n-3 fatty acids (PUFAs) following an acute myocardial infarction. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57(6): 793-800.
- Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2007; 62(5): 335-347.
- Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, Agarwal A. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64(11): 750-759.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-1828.
- Hågå P, EK J, Krau S. Plasma tocopherol levels and vitamin E/beta-lipoprotein relationships during pregnancy and in cord blood. *Am J Clin Nutr* 1982; 36(6): 1200-1204.

- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl): 715S-725S.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell cultura: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142(2): 231-255.
- Hammond VJ, O'Donnell VB. Esterified eicosanoids: generation, characterization and function. *Biochim Biophys Acta* 2011, *in press*.
- Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larque E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008; 27(5): 685-693.
- Hansen J, Grimsgaard S, Nordoy A, Bonna KH. Dietary supplementation with highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid does not influence PAI-1 activity. *Thromb Res* 2000; 98(2): 123-132.
- Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Considine RV, Opentanova I, Dostal K, Spear ML, Leef K, Ash M, Spitzer AR, Funanage VL. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997; 100(1): E1.
- Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290(2): E326-E333.
- Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194(6): 1537-1545.
- Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 2000; 35(7): 763-768.
- Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T, Drevon CA. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics* 2001; 108(5): E82.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years age. *Pediatrics* 2003; 111(1): e39-44.
- Helmersson J, Larsson A, Vessby B, and Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis* 2005; 181(1): 201-207.
- Helmersson J, Vessby B, Larsson A, Basu S. Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 2004; 109(14): 1729-1734.
- Herrera A, Ortega H, Alvino G, Giovannini N, Amusquivar E, Cetin I. Relationship between plasma fatty acid profile and antioxidants vitamins during normal pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(9): 1231-1238.
- Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001; 57(2): 43-56.
- Higdon JV, Liu J, Du SH, Morrow JD, Ames BN, Wander RC. Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)-isoprostanes. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(3): 714-722.
- Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, Wong WW, Catalano PM. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(5): 1010-1015.

- Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 2004; 303(5655): 226-229.
- Holman RT, Johnson SB, Osburn PL. Deficiency of essential fatty acids and membrane fluidity during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(11): 4835-4839.
- Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278(17): 14677-14687.
- Hubel CA, Kagan VE, Kisin ER, McLaughlin MK, Roberts JM. Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(4): 597-609.
- Hung TH, Chen SF, Hsieh TT, Lo LM, Li MJ, Yeh YL. The association between labor and delivery mode and maternal and placental oxidative stress. *Reprod Toxicol* 2011; 31(2): 144-150.
- Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Li MJ, Yeh YL, Chen SF, Hsieh TT. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci* 2010; 17(4): 401-409.
- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de pesca. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, nº 13.
- Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 2008; 1237: 35-43.
- Ishihara M. Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and of patients with toxemia of pregnancy. *Clin Chim Acta* 1978; 84(1-2): 1-9.
- Isosaari P, Hallikainen A, Kiviranta H, Vuorinen PJ, Parmanne R, Koistinen J, Vartiainen T. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers in the edible fish caught from the Baltic Sea and lakes in Finland. *Environ Pollut* 2006; 141(2): 213-225.
- Ito W, Takeda M, Tanabe M, Kihara J, Kato H, Chiba T, Yamaguchi K, Ueki S, Kanehiro A, Kayaba H, Chihara J. Anti-allergic inflammatory effects of hepatocyte growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 Suppl 1: 82-87.
- Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, Kawano H, Yano T, Aoe S, Tayeka H, *et al.* Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(9): 1918-1925.
- Jain SK, McCoy B, Wise R. Vitamin E and the hypercoagulability of neonatal blood. *Clin Chim Acta* 1994; 225(2): 97-103.
- Jansson N, Nilselfelt A, Gellerstedt M, Wennergren M, Rossander-Hulthén L, Powell TL, Jansson T. Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(6): 1743-1749.
- Jauniaux E, Greenough A. Short and long term outcomes of smoking during pregnancy. *Early Hum Dev* 2007; 83(11): 697-698.
- Jhonson LJ, Meacham SL, Kruskall LJ. The antioxidants—vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. *J Agromedicine* 2003; 9(1): 65-82.
- Jonasson S, Hjoberg J, Hedenstierna G, and Basu S. Allergen-induced formation of F2-isoprostanes in a murine asthma model identifies oxidative stress in acute airway inflammation in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009; 80(1): 1-7.

- Julshamn K, Maage A, Norli HS, Grobecker KH, Jorhem L, Fecher P. Determination of arsenic, cadmium, mercury, and lead by inductively coupled plasma/mass spectrometry in foods after pressure digestion: NMKL interlaboratory study. *J AOAC Int* 2007; 90(3): 844-856.
- Junker R, Pieke B, Schulte H, Nofer R, Neufeld M, Assmann G, Wahrburg U. Changes in hemostasis during treatment of hypertriglyceridemia with a diet rich in monounsaturated and n-3 polyunsaturated fatty acids in comparison with a low-fat diet. *Thromb Res* 2001; 101(5): 355-366.
- Jupp J, Hillier JK, Elliot DH, Fine DR, Bateman AC, Jhonson PA, Cazarly AM, Penrose JF, Sampson AP. *Inflam Bowel Dis* 2007; 13(5): 537-546.
- Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsmann JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, and Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005; 38(6): 698-710.
- Karihtala P, Soini Y, Vaskivuo L, Bloigu R, Puistola U. DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine, a novel putative marker of prognostic significance in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(6): 1047-1051.
- Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem* 2008; 313(1-2): 37-44.
- Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(3): 434-439.
- Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition—a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl A: S33-S46.
- Kemp B, von Rango U, Brehme A, Rath W. Amniotic fluid adhesion molecules during parturition at term. *J Perinat Med* 2009; 37(1): 28-31.
- Kiely M, Cogan PF, Kearney PJ, Morrissey PA. Concentrations of tocopherols and carotenoids in maternal and cord blood plasma. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(9): 711-715.
- Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19(4): 487-492.
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; 51(7): 2207-2213.
- Klein CJ. Nutrient requirements for preterm infant formulas. *J Nutr* 2002; 132(6 Suppl 1): 1395S-13577S.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258(5089): 1798-1801.
- Koletzko B, Sauerwald U, Keicher U, Saule H, Wawatschek S, Böhles H, Bervoets K, Feith M, Crozier-Willi G. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. A randomized clinical trial. *Eur J Nutr* 2003; 42(5): 243-253.
- Kotani Y, Yokota I, Kitamura S, Matsuda J, Naito E, Kuroda Y. Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2004; 61(4): 418-423.

- Krauss T, Azab H, Dietrich M, Augustin HG. Fetal plasma levels of circulating endothelial cell adhesion molecules in normal and preeclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 78(1): 41-45.
- Krauss-Etschmann S, Harti D, Rzehak P, Heinrich J, Shadid R, Del Carmen Ramirez-Tortosa M, Campoy C, Pardillo S, Schendel DJ, Decsi T, *et al.* Nutraceuticals for Healthier Life Study Group. Decreased cord blood IL-4, IL-13 and CCR4 and increased TGF-beta levels after fish oil supplementation of pregnant women. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2): 467-470.
- Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Diaper ND, Miles EA, Calder PC. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41(1): 36-66.
- Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001; 14(6 Pt 2): 44S-54S.
- Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K, Rice GE. Tumor necrosis factor alpha during human pregnancy and labour: maternal plasma and amniotic fluid concentrations and release from intrauterine tissues. *Eur J Endocrinol* 1994; 131(6): 607-614.
- Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50(4): 938-948.
- Larque E, Demmelmair H, Berger B, Hasbargen U, Koletzko B. In vivo investigation of the placental transfer of [¹³C] labeled fatty acids in humans. *J Lipid Res* 2003; 44(1): 49-55.
- Larqué E, Krauss-Etschmann S, Campoy C, Hartl D, Linde J, Klingler M, Demmelmair H, Caño A, Gil A, Bondy B, Koletzko B. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(4): 853-861 (a).
- Larqué, E, Demmelmair H, Kingler M, De Jonge S, Bondy B, Koletzko B. Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. *Early Hum Dev* 2006; 82(10): 697-701 (b).
- Lee TH, Menica-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Characterization and biologic properties of 5, 12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotrienes B₅ and the double lipooxygenase product. *J Biol Chem* 1984; 259(4): 2383-2389.
- Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; 27(1): 114-120.
- Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H, Hauguel-de Mouzon S. Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(6): 2409-2413.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 1996; 19(11): 514-520.
- Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 1999; 13(5): 347-352.
- Loverro G, Greco P, Capuano F, Carone D, Cormio G, Selvaggi L. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 70(2): 123-127.
- Madan, JC, Davis JM, Craig WY, Collins M, Alian W, Quinn R, Dammann O. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine* 2009; 47(1): 61-64.
- Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49(5): 308-318.

- Makrides M, Neumann M, Simmer K, Pater J, Gibson R. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *Lancet* 1995; 345(8963): 1463-8.
- Mantzoros C, Petridou E, Alexe DM, Skalkidon A, Dessypris N, Papatoma E, Salvanos H, Shetty G, Gavrila A, Kedikoglou S, Chrousos G, Trichopoulos D. Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborns. *Eur J Endocrinol* 2004; 151(6): 741-746.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 1982; 126(1): 41-51 (b).
- Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(24): 7634-7638 (a).
- Maroz A, Anderson RF, Smith RA, Murphy MP. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(1): 105-109.
- Marriott LD, Robinson SM, Poole J, et al. What do babies eat? Evaluation of a food frequency questionnaire to assess the diets of infants aged 6 months. *Public Health Nutr* 2008; 11(7): 751-756.
- Martínez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 1992; 120(4 Pt 2): S129-S138.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovanni C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16(10): 577-586.
- Matorras R, Perteagudo L, Sanjurjo P, Ruiz JI. Intake of long chain ω_3 polyunsaturated fatty acids during pregnancy and the influence of levels in the mother on newborn levels. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 83(2): 179-184.
- Matorras R, Ruiz JI, Perteagudo L, Barbazan MJ, Diaz A, Valladolid A, Sanjurjo P. Longitudinal study of fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids during pregnancy. *J Perinat Med* 2001; 29(4): 293-297.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-419.
- Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Wiser A, Schiff E, Sivan E. Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *J Perinatol* 2007; 27(2): 77-81.
- Mazaki-Tovi S, Kanety H, Sivan E. Adiponectin and human and human pregnancy. *Curr Diab Rep* 2005; 5(4): 278-281.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049-6055.
- McGrath LT, Brennan GM, Donnelly JP, Johnston GD, Hayes JR, McVeigh GE. Effect of dietary fish oil supplementation on peroxidation of serum lipids in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1996; 121(2): 275-283.
- Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(5): 998-1001.
- Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morril-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* 1991; 121(4): 547-555.

- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(3): 235-248.
- Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and preeclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76(1): 2-11.
- Miles E, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, García-Rodríguez CE, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.
- Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229(1): 189-197.
- Minda H, Larque E, Koletzko B, Decsi T. Systematic review of fatty acid composition of plasma phospholipids of venous cord blood in full-term infants. *Eur J Nutr* 2002; 41(3): 125-131.
- Mistry MD, Williams PJ. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 841749.
- Montgomery C, Speake BK, Cameron A, Sattar N, Weaver LT. Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Br J Nutr* 2003; 90(1): 135-145.
- Montine TJ, Quinn JF, Milatovic D, Silbert LC, Dang T, Sanchez S, Terry E, Roberts LJ, 2nd, Kaye JA, and Morrow JD. Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52(2): 175-179.
- Mori T, Shinohara K, Wakatsuki A, Watanabe K, Fujimaki A. Adipocytokines and endothelial function in preeclamptic women. *Hypertens Res* 2010; 33(3): 250-254.
- Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, Puddey IB. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 1999; 48(11): 1402-1408.
- Mori TA, Puddey IB, Burke V, Croft KD, Dunstan DW, Rivera JH, Beilin LJ. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary prostane excretion. *Redox Rep* 2000; 5(1): 45-46.
- Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(7): 772-781.
- Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Knight M, Linton EA, Dhir S, Anggard EE, and Redman CW. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105(11): 1195-1199.
- Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ 2nd. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990; 184(1): 1-10.
- Morrow JD. The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 2000; 32(3-4): 377-385.
- Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9(1): 9-23.

- Murtas D, Piras F, Minerbas L, Ugalde J, Floris C, Maxia C, Demurtas P, Perra MT, Sirigu P. Nuclear 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as survival biomarker in patients with cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 2010; 23(2): 329-335.
- Nälsén C, Vessby B, Berglund L, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellesse A, Storlien L, Erkkilä A, Ylä-Herttuala S, Tapsell L, Basu S. Dietary (n-3) fatty acids reduce plasma F2-isoprostanes but not prostaglandin F2-alpha in healthy humans. *J Nutr* 2006; 136(5): 1222-1228.
- Nenseter MS, Drevon CA. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(1): 8-13.
- Neuringer M, Connor WE, Van Petten C, Barstad L. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J Clin Invest* 1984; 73(1): 272-276.
- Nève J. Selenium as a "nutraceutical": how to conciliate physiological and supra-nutritional effects for an essential trace element. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5(6): 659-663.
- Nohl H, Gille L, Staniek K. The biochemical, pathophysiological, and medical aspects of ubiquinone function. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 394-409.
- O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intercellular signaling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* 2008; 409(3): 635-649.
- Olsen SF, Hansen HS, Sandstrom B, Jensen B. Erythrocyte levels compared with reported dietary intake of marine n-3 fatty acids in pregnant women. *Br J Nutr* 1995; 73(3): 387-395.
- Olsen SF, Østerdal ML, Salvig JD, et al. Duration of pregnancy in relation to seafood intake during early and mid pregnancy: prospective cohort. *Eur J Epidemiol* 2006; 21:749-58.
- Olsen SF, Secher NJ. Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ* 2002; 324:447-50.
- Olsen SF, Sørensen JD, Secher NJ, et al. Randomised controlled trial of effect of fish-oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet* 1992; 339:1003-7.
- Oostenbrug GS, Mensink RP, Al MD, van Houwelingen AC, Hornstra G. Maternal and neonatal plasma antioxidant levels in normal pregnancy, and the relationship with fatty acid unsaturation. *Br J Nutr* 1998; 80(1): 67-73.
- Opinión del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) relativa a la propuesta de la Comisión Europea (CE) sobre Alegaciones Nutricionales de Ácidos Grasos Omega-3 en alimentos efectuada por la Comisión Europea y a las consideraciones sobre la misma aportadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). *Revista del Comité Científico de la AESAN*, nº 3.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicoretta P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(7): 281-285.
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Antal M, Manninen A, Godfrey K, Lopez-Jaramillo P, Hornstra G. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51(4): 232-242.
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Hornstra G. The effect of supplementation with docosahexaenoic and arachidonic acid derived from single cell oils on plasma and erythrocyte fatty acids of pregnant women in the second trimester. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63(5): 323-328.

- Palan PR, Shaban DW, Martino T, Mikhail MS. Lipid-soluble antioxidants and pregnancy: maternal serum levels of coenzyme Q₁₀, alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in preeclampsia and normal pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 2004; 58(1): 8-13
- Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free Radic Res* 2009; 43(6): 546-552.
- Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Bartoli GM. N-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(3): 297-304.
- Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G. Selenoproteins and maternal nutrition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151(4): 361-372.
- Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy: association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2002; 25(3): 560-564.
- Peter Stein T, Scholl TO, Schluter MD, Leskiw MJ, Chen X, Spur BW, Rodriguez A. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res* 42(10): 841-848, 2008.
- Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67(3): 291-300.
- Prescott SL, Dunstan J.A. Prenatal fatty acid status and immune development: The pathways and the evidence. *Lipids* 2007; 42(9): 801-810.
- Puglisi MJ, Hasty AH, Saraswathi V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 2011; 22(2): 101-108.
- Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *Br J Nutr* 2012, *in press*.
- Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KW, Calder PC. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(2): 331-342.
- Reisenberger K, Egarter C, Vogl S, Sternberg B, Kiss H, Husslein P. The transfer of interleukin-8 across the human placenta perfused in vitro. *Obstet Gynecol* 1996; 87(4): 613-616.
- Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev* 2011; 21(2): 73-80.
- Rizza S, Tesauro M, Cardillo C, Galli A, Iantorno M, Gigli F, Sbraccia P, Federici M, Quon MJ, Lauro D. Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2009; 206(2): 569-574.
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4): 505-513.
- Robinson JG, Stone NJ. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 2006; 98(4A): 39i-49i.
- Robinson S, Godfrey K, Osmond C, Cox V, Barker D. Evaluation of a food frequency questionnaire used to assess nutrient intakes in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50(5): 302-308.
- Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* 1996; 96(7): 693-702.

- Rytter D, Schmidt EB, Bech BH, Christensen JH, Henriksen TB, Olsen SF. Fish oil supplementation during late pregnancy does not influence plasma lipids or lipoprotein levels in young adult offspring. *Lipids* 2011; 46(12): 1091-1099.
- Saarelainen H, Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Heiskanen N, Lyyra-Laitinen T, Viikari JS, Vanninen E, Heinonen S. Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. *Circ J* 2006; 70(6): 768-772.
- Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* 2001; 52(1-2): 15-33.
- Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47(2): 87-103.
- Saker H, Soulimane Mokhtari N, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 141(2): 95-99.
- Sanjurjo P, Matorras R, Perteagudo L. Influence of fatty fish intake during pregnancy in the polyunsaturated fatty acids of erythrocyte phospholipids in the mother at labor and newborn infant. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74(8): 594-598.
- Sanjurjo P, Ruiz-Sanz JI, Jimeno P, Aldamiz-Echevarría L, Aquino L, Matorras R, Esteban J, Banqué M. Supplementation with docosahexaenoic acid in the last trimester of pregnancy: maternal-fetal biochemical findings. *J Perinat Med* 2004; 32(2): 132-136.
- Sastry PS. Lipids in the nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 1985; 24(2): 69-176.
- Satar M, Turhan E, Yapicioglu H, Narli N, Ozgunen FT, Cetiner S. Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture of membranes and its relationship with morbidity and mortality. *Eur Cytokine Netw* 2008; 19(1): 37-41.
- Sattar N, Greer IA, Pirwani I, Gibson J, Wallace AM. Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77(3): 278-283.
- Schaefer-Graf VM, Meitzner K, Ortega-Senovilla H, Graf K, Vetter K, Abou-Dakn M, Herrera E. Differences in the implications of maternal lipids on fetal metabolism and growth between gestational diabetes mellitus and control pregnancies. *Diabet Med* 2011; 28(9): 1053-1059.
- Schechter AN. Haemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112(10): 3927-3938.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E₁ and protein D₁ activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 2007; 447(7146): 869-874.
- Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brummer J, Gutzki FM, Berger J, Frolich JC, Boger RH. Urinary 8-iso-prostaglandin F₂alpha as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* 2004; 109(7): 843-848.
- Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. London: The Stationary Office, 2004.
- Sellmayer A, Koletzko B. Long chain polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in infants: Physiological and pathophysiological aspects, an open question. *Lipids* 1999; 34(2): 199-205.
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with anti-inflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000; 192(8): 1197-1204.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002; 196(8): 1025-1037.

- Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1): 21-30.
- Sheridan J, Wang LM, Tosetto M, Sheahan K, Hyland J, Fennelly D, O'Donoghue D, Mulcahy H, O'Sullivan J. Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100(2): 381-388.
- Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002; 160(1): 91-102.
- Shinto L, Marracci G, Bumgarner L, Ladav V. The effects of omega-3 fatty acids on matrix metalloproteinase-9 production and cell migration in human immune cells: implications for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis* 2011; doi: 10.4061/2011/134592.
- Shoji H, Franke C, Campoy C, Rivero M, Demmelmair H, Koletzko B. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid supplementation on oxidative stress levels during pregnancy. *Free Radic Res* 2006; 40(4): 379-384.
- Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(3): 324-328.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365(9461): 785-799.
- Sies H, Stahl W. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6 Suppl): 1315S-1324S.
- Sigalov AB, Stern LJ. Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* 1998; 433(3): 196-200.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(3): 438-463.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002; 21(6): 495-505.
- Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, Prineas RJ, Vessby B, Basu S, Tracy R, and Jacobs DR, Jr. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. *Circulation* 2005; 111(15): 1985-1991.
- Singh U, Jialai I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1031: 195-203.
- Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C, Efraty Y, Schiff E, Hemi R, Kanety H. Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(12): 5656-5660.
- Skarza A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines, and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11:59.
- Skouroliaou M, Konstantinou D, Koutri K, Kakavelaki C, Stathopoulou M, Antoniadis M, Xemelidis N, Kona V, Markantonis S. A double-blind, randomized clinical trial of the effect of omega-3 fatty acids on the oxidative stress of preterm neonates fed through parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(9): 940-947.
- Skurk T, Hauner H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(11): 1357-1364.
- Smuts CM, Borod E, Peebles J, Carlson SE. High-DNA eggs: feasibility as a means to enhance circulating DHA in mother and infant. *Lipids* 2003; 38(4): 407-414.

- Spector AA. Essentiality of fatty acids. *Lipids* 1999; 34 Suppl: S1-S3.
- Sprecher H, Luthria LD, Mohamed BS, Bay-Kousheva SP. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 1995; 36(12): 2471-2477.
- Steinborn A, Sohn C, Heger S, Niederhut A, Hildebrand R, Kaufmann M. Labour-associated expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in placental endothelial cells indicates participation of immunological processes in parturition. *Placenta* 1999; 20(7): 567-573.
- Strobel M, Tinz J, Biesalski HK. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr* 2007; 46 Suppl 1: 11-20.
- Sunaga N, Kohno T, Shinmura K, Saitoh T, Matsuda T, Saito R, Yokota J. OGG1 protein suppresses G:C→T:A mutation in a shuttle vector containing 8-hydroxyguanine in human cells. *Carcinogenesis* 2001; 22(9): 1355-1362.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108(1): 15-23.
- Svennerholm L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res* 1986; 9(5): 570-579.
- Szitaryi P, Koletzko B, Mydlilova A, Demmelmair H. Metabolism of ¹³C-labeled linoleic acid in newborn infants during the first week of life. *Pediatr Res* 45(5 Pt 1): 669-673.
- Tara F, Maamouri G, Rayman MP, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, Yazarli O, Ouladan S, Tavallaie S, Azimi-Nezhad M, Shakeri MT, Boskabadi H, Oladi M, Sangani MT, Razavi BS, Ferns G. Selenium supplementation and the incidence of preeclampsia in pregnant Iranian women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010; 49(2): 181-187.
- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Fieldmann M, Maini RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 38-47.
- Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged > 55 years. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(3): 539-548.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108(1): 15-23.
- Titova OE, Ayvazova EA, Bichkaeva FA, Brooks SJ, Chumakova GN, Schiöth HB, Benedict C. The influence of active and passive smoking during pregnancy on umbilical cord blood levels of vitamins A and E and neonatal anthropometric indices. *Br J Nutr* 2012, in press.
- Tosun N, Celik H, Acvi B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23(8): 880-886.
- Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1): 4-15.
- Trayhurn P, Wood JS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3): 347-355.
- Trebble TM, Wootton SA, Miles EA, Mullee M, Arden NK, Ballinger AB, Stroud MA, Burdge GC, Calder PC. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(3): 376-382.
- Tsuchihashi H, Kigoshi M, Iwatsuki M, Niki E. Action of beta-carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 323(1): 137-147.

- Uauy R, Dangour AD. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr Rev* 2006; (5 Pt 2): S24-S33.
- Uauy R, Hoffman D, Peirano P, Birch D, Birch E. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 2001; 36(9): 885-895.
- Uauy R, Mena P, Rojas C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc Nutr Soc* 2000; 59(1): 3-15.
- Valsamakis G, Kanaka-Gautenbein C, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G. Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092: 138-147.
- Valūniene M, Verkauskiene R, Boguszewski M, Dahlgren J, Lasiene D, Lasas L, Wikland KA. Leptin levels at birth and in early postnatal life in small-and appropriate-for-gestational-age infants. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43(10): 784-791.
- Van den Elsen LW, Noakes PS, van der Maarel MA, Kremmyda LS, Vlachava M, Diaper ND, Miles EA, Eussen SR, Garssen J, Willemsen LE, Wilson SJ, Godfrey KM, Calder PC. Salmon consumption by pregnant women reduces ex vivo umbilical cord endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1418-1425.
- Van Hinsberg VW. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95(2): 198-201.
- Van Houwelingen AC, Sorensen JD, Hornstra G, Simonis MMG, Boris J, Olsen SF, Secher NJ. Essential fatty acid status in neonates after fish-oil supplementation during late pregnancy. *Br J Nutr* 1995; 74(5): 723-731.
- Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 2004; 116(4): 491-497.
- Vassiliadis S, Ranella A, Papadimitriou L, Makrygiannakis A, Athanassakis I. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators Inflamm* 1998; 7(2): 69-72.
- Velzing-Aarts FV, van der Klis FR, van der Dijks FP, van Bensekom CK, Landman H, Capello JJ, Muskiet FA. Effect of three low-dose FO supplements, administered during pregnancy, on neonatal long-chain polyunsaturated fatty acid status at birth. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 65(1): 51-57.
- Voss A, Reinhart M, Sprecher H. Differences in the interconversion between 20- and 22-carbon (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1127(1): 33-40.
- Wang S, Wu D, Lamon-Fava S, Matthan NR, Honda KL, Lichtenstein AH. In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *Br J Nutr* 2009; 102(4): 497-501.
- Watanabe T, Sakata Y, Matsubara S, Yamagishi T, Nagaike K, Kuwata T, Suzuki M. Changes in plasma levels of hepatocyte growth factor and its associated factors during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(1): 10-14.
- Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 2000; 143(3): 293-311.
- Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248(13): 4793-4796. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 1930-1935.

- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tatarani PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 1930-1935.
- Weyland KH, Kang JX, Wiedenmann B, Baumgart DC. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13(6): 797-799.
- Wiecek A, Adamczak M, Chudek J. Adiponectin-an adipokine with unique metabolic properties. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(4): 981-988.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339(1-2): 1-9.
- Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(3): 260-274.
- Yeum KJ, Ferland G, Patry J, Russell RM. Relationship of plasma carotenoids, retinol and tocopherols in mothers and newborn infants. *J Am Coll Nutr* 1998; 17(5): 442-447.
- Yildiz L, Avci B, Ingeç M. Umbilical cord and maternal blood leptin concentrations in intrauterine growth retardation. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(11): 1114-1117.
- Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol* 2004; 103(3): 546-550.
- Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, de Courten M. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. *Ann NY Acad Sci* 1999; 892: 25-44.

Anexos

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de los análisis de laboratorio realizados como parte del programa <i>The Salmon in Pregnancy Study</i> (SiPS) y los centros responsables de las distintas determinaciones.....	58
Tabla 2. Características de las mujeres participantes en SiPS y de sus embarazos.....	75
Tabla 3. Frecuencia de consumo semanal de pescado y productos del mar en el grupo Control y el grupo Salmón durante el tiempo del estudio.....	77
Tabla 4. Ingestas de los AGPI-CL <i>n</i> -3 a partir de marisco, de pescado graso y del resto de la dieta en los grupos Control y Salmón, calculadas a partir del FFQ de la semana 34 del embarazo.....	77
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) durante el embarazo, en las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón).....	81
Tabla 6. Perfil de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón).....	83
Tabla 7. Coeficientes de correlación entre los perfiles de ácidos grasos en membranas de eritrocitos (% respecto al peso total) de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos.....	84
Tabla 8. Biomarcadores de oxidación lipídica y del DNA en mujeres embarazadas en distintos momentos (semanas 20, 34 y 38) del periodo gestacional en relación con el grupo (Control vs. Salmón).....	85
Tabla 9. Actividades de las enzimas antioxidantes y concentración de glutatión y Se en eritrocitos de mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón).....	88

Tabla 10. Niveles plasmáticos de retinol, α - y γ -tocoferol, β -caroteno y CoQ ₁₀ en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón, dos veces a la semana (grupo Salmón).....	89
Tabla 11. Actividades de las enzimas del sistema de defensa antioxidante y concentraciones de antioxidantes no enzimáticos en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón).....	91
Tabla 12. Coeficientes de correlación entre las concentraciones de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos.....	93
Tabla 13. Concentraciones plasmáticas de los biomarcadores del metabolismo glucídico y lipídico en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón, dos veces a la semana (grupo Salmón).....	95
Tabla 14. Concentraciones plasmáticas de algunos biomarcadores del metabolismo glucídico y lipídico analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos y sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón).....	97
Tabla 15. Coeficientes de correlación entre los parámetros bioquímicos generales del metabolismo glucídico y lipídico de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos.....	103
Tabla 15. Concentraciones plasmáticas de adipoquinas y de los biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular analizados en la sangre de cordón de los recién nacidos y en sus madres, que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón).....	104

Tabla 16. Coeficientes de correlación entre los niveles plasmáticos de adipoquinas y biomarcadores de inflamación y de homeostasis vascular de las madres que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o dos porciones de salmón a la semana (grupo Salmón) y la sangre de cordón de sus recién nacidos.....104

Índice de Figuras

Figura 1. Síntesis de ácidos grasos	30
Figura 2. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante	38
Figura 3. Metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos durante la segunda mitad de la gestación	43
Figura 4. Papel de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico en la inflamación	49
Figura 5. Diagrama de afluencia de sujetos a lo largo del estudio	56
Figura 6. Recolección de muestras en los distintos momentos del estudio	61
Figura 7. Método de determinación de antígenos diversos utilizando un sistema LINCoplex	70
Figura 8. Concentración de (A) EPA y (B) DHA en plasma materno en los grupos Control y Salmón	79
Figura 9. Concentraciones de (A) adiponectina y (B) leptina en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón).....	98
Figura 10. Concentraciones de (A) IL-8 (B) IL-6 (C) TNF- α (D) MCP-1 (E) HGF y (F) NGF en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón).....	99
Figura 11. Concentraciones de (A) sE-selectina (B) sICAM-1 (C) sVCAM-1 (D) tPAI-1 y (E) MMP-9 en mujeres embarazadas que consumieron su dieta habitual (grupo Control) o salmón dos veces a la semana (grupo Salmón).....	101

Publicaciones

Artículo I

The Salmon in Pregnancy Study: study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood¹⁻⁴

Elizabeth A Miles, Paul S Noakes, Lefkothea-Stella Kremmyda, Maria Vlachava, Norma D Diaper, Grethe Rosenlund, Heidi Urwin, Parveen Yaqoob, Adrien Rossary, Marie-Chantal Farges, Marie-Paule Vasson, Bjørn Liaset, Livar Frøyland, Johanna Helmersson, Samar Basu, Erika Garcia, Josune Olza, Maria D Mesa, Concepcion M Aguilera, Angel Gil, Sian M Robinson, Hazel M Inskip, Keith M Godfrey, and Philip C Calder

ABSTRACT

Background: Oily fish provides marine n-3 (omega-3) fatty acids that are considered to be important in the growth, development, and health of the fetus and newborn infant.

Objectives: The objectives were to increase salmon consumption among pregnant women and to determine the effect on maternal and umbilical cord plasma marine n-3 fatty acid content.

Design: Women ($n = 123$) with low habitual consumption of oily fish were randomly assigned to continue their habitual diet or were provided with 2 portions of farmed salmon/wk to include in their diet from week 20 of pregnancy until delivery.

Results: Median weekly consumption frequency of study salmon in the salmon group was 1.94 portions, and total fish consumption frequency was 2.11 portions/wk in the salmon group and 0.47 portions/wk in the control group ($P < 0.001$). Intakes of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) from the diet, from seafood, and from oily fish were higher in the salmon group (all $P < 0.001$). Percentages of EPA and DHA in plasma phosphatidylcholine decreased during pregnancy in the control group (P for trend = 0.029 and 0.008, respectively), whereas they increased in the salmon group (P for trend for both < 0.001). EPA and DHA percentages were higher in maternal plasma phosphatidylcholine at weeks 34 and 38 of pregnancy and in umbilical cord plasma phosphatidylcholine in the salmon group ($P < 0.001$ for all).

Conclusion: If pregnant women, who do not regularly eat oily fish, eat 2 portions of salmon/wk, they will increase their intake of EPA and DHA, achieving the recommended minimum intake; and they will increase their and their fetus' status of EPA and DHA. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT00801502. *Am J Clin Nutr* doi: 10.3945/ajcn.110.001636.

INTRODUCTION

Seafoods, especially oily fish, are rich sources of the longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFAs) eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). Examples of oily fish are salmon, sardines, pilchards, mackerel, herring, trout, and fresh tuna. The average content of EPA plus DHA in an adult portion of oily fish is between 1 and 3.5 g, depending mainly on the type of fish (1, 2).

The UK government recommends that all adults consume ≥ 2 portions of fish/wk, at least one of which should be oily (2); this

has been translated into a minimum recommended intake of 450 mg EPA plus DHA/d for adults (2). The guideline range for oily fish intake among pregnant women in the United Kingdom is 1 or 2 portions/wk, with the upper limit being imposed because of concern about contaminants in some species of fish (2). Others have recommended an intake of 200 mg DHA/d for pregnant and lactating women (3). The European Food Safety Authority recently recommended 250 mg EPA plus DHA/d for healthy adults, with an additional 100–200 mg DHA/d for pregnant women (4). The Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) recommends that pregnant women consume

¹ From the Institute of Human Nutrition and Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom (EAM, PSN, L-SK, MV, NDD, SMR, HMI, KMG, and PCC); the Skretting Aquaculture Research Centre, Stavanger, Norway (GR); the Hugh Sinclair Unit of Human Nutrition, Department of Food and Nutritional Sciences, The University of Reading, Reading, United Kingdom (HU and PY); EA 4233, Laboratory of Biochemistry, Molecular Biology, and Nutrition, University of Auvergne, Clermont-Ferrand, France (AR, M-CF, and M-PV); the National Institute of Nutrition and Seafood Research, Bergen, Norway (BL and LF); Oxidative Stress and Inflammation, Department of Public Health and Caring Sciences, Faculty of Medicine, University of Uppsala, and the Center of Excellence-Inflammation, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden (JH and SB); the Institute of Nutrition and Food Technology, Centre for Biomedical Research, University of Granada, Granada, Spain (EG, JO, MDM, CMA, and AG); the Southampton Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit, University of Southampton, Southampton, United Kingdom (SMR, HMI, and KMG); and the Southampton NIHR Nutrition, Diet & Lifestyle Biomedical Research Unit, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, United Kingdom (KMG and PCC).

² Presented at the conference "The Power of Programming: Developmental Origins of Health and Disease," held in Munich, Germany, 6–8 May 2010.

³ Supported by the European Commission under Framework 6: Sustainable aquafeeds to maximize the health benefits of farmed fish for consumers (Aquamax; FOOD-CT-2006-16249).

⁴ Address correspondence to PC Calder, Institute of Human Nutrition and Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Institute of Developmental Sciences Building, MP887 Southampton General Hospital, Tremona Road, Southampton SO16 6YD, United Kingdom. E-mail: pcc@soton.ac.uk.

doi: 10.3945/ajcn.110.001636.

a minimum of 300 mg EPA plus DHA/d, of which ≥ 200 mg should be DHA (5).

The UK National Diet and Nutrition Survey reports low consumption of oily fish by adults (6), including women (7), and a correspondingly low intake of LC n-3 PUFAs (2). It is recognized that provision of DHA to the fetus and neonate is important for growth and development, especially of the visual and central nervous systems (1, 2, 8). EPA and DHA may also be important for optimal development and functioning of the vascular, cardiac, and immune systems (9–12). Thus, a higher consumption of fish, especially oily fish, in pregnancy may be linked to better health outcomes in the offspring in infancy and childhood; and the protective effect of oily fish is linked to the nutrients that it contains, particularly LC n-3 PUFAs (2). Possible protective effects of early LC n-3 PUFA exposure have been examined in supplementation studies with fish oil (13–15). However, to the best of our knowledge there are no published intervention trials with fish during pregnancy.

The Salmon in Pregnancy Study (SiPS) is a randomized controlled trial of oily fish (in this case farmed salmon) in pregnant women. The SiPS specifically focuses on pregnant women whose offspring are at high risk of developing atopic disease, with one aim being to identify whether there is an effect on atopy outcomes in the offspring. The aim of this article is to describe the design of the SiPS, the characteristics of the included women, the composition of the salmon used in the intervention, the outcomes that will be reported from the study, the intake of fish and the status of EPA and DHA in maternal plasma and in umbilical cord plasma, and selected pregnancy outcomes in the 2 groups.

STUDY DESIGN AND METHODS USED

Study design and characteristics of the included subjects

The SiPS is a single-blind, randomized controlled trial of increased consumption of farmed salmon by pregnant women from week 20 of gestation until the end of their pregnancy. All procedures were approved by the Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee (approval no. 07/Q1704/43). The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki, and all women gave written informed consent. The SiPS is registered at www.clinicaltrials.gov (clinical trials identifier NCT00801502).

A randomly selected sample of pregnant women ($n = 689$) within the catchment area of the Princess Anne Hospital, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, United Kingdom, received general information about the SiPS when they received their postal invitations to attend the hospital for a routine ultrasound appointment to occur at approximately week 12 of gestation. Women who expressed an interest in the SiPS ($n = 383$) provided written informed consent at their week 12 appointment to enable screening for habitual consumption of fish and family history of atopy, allergy, or asthma (the primary outcome of the SiPS relates to atopy and its manifestations in infants born to women enrolled in the SiPS). Those women who reported low habitual consumption of oily fish (< 2 portions/mo excluding canned tuna) and a family history of atopy, allergy, or asthma (one or more first-degree relatives of the infant affected by atopy, asthma, or allergy) received a detailed information sheet about the SiPS. Those who remained interested ($n = 156$)

were further screened for inclusion into the SiPS. Inclusion criteria were as follows: age 18–40 y; < 19 wk gestation; healthy, uncomplicated singleton pregnancy; infant at risk of atopy (one or more first-degree relatives of the baby affected by atopy, asthma, or allergy by self-report); consuming < 2 portions of oily fish/mo (excluding canned tuna); not using fish-oil supplements currently or in the previous 3 mo. Exclusion criteria were as follows: age < 18 or > 40 y; > 19 wk gestation; no first-degree relatives of the infant affected by atopy, asthma, or allergy; consuming > 2 portions of oily fish/mo (excluding canned tuna); use of fish-oil supplements within previous 3 mo; participation in another research study; known diabetic; or presence of any autoimmune disease, learning disability, terminal illness, or mental health problems. Women fulfilling the inclusion and exclusion criteria were recruited into the SiPS at their routine ultrasound clinic at week 19/20 (hereafter referred to as week 20) of gestation if they remained interested in the study. Women attended this clinic in a fasted state and provided written informed consent to enable their participation in SiPS. Ultimately, 123 women were recruited (**Figure 1**). At the clinic, women provided a blood sample (added to heparin) and a urine sample and completed a 100-item food-frequency questionnaire (FFQ) covering food intake over the preceding 12 wk (16–20).

The recruited women were randomly assigned to 1 of 2 groups; random assignment was according to a random number table. Women in one group ($n = 61$), referred to as the control group, were asked to continue their habitual diets; these women received the information sheet that described the possible health benefits of consuming oily fish during pregnancy and the government recommendation that pregnant women consume 1 or 2 oily fish meals/wk (2). They also received a cookbook providing recipes for healthy eating during pregnancy. Women in the salmon group ($n = 62$) were asked to incorporate 2 portions of salmon into their diet per week from study entry until they gave birth. They also received a cookbook that provided recipes for preparing and cooking salmon. The salmon (*see below*) was delivered to the homes of these women in individual frozen and vacuum-packed portions (150 g) on a monthly basis; sufficient portions were provided for each woman and her partner. Women in both groups received a diary in which to record any seafood consumed during the course of the study and the nature of its preparation and cooking.

The women attended a clinic at week 32–34 of gestation (hereafter referred to as week 34) and at week 38 of gestation while in a fasted state. At these clinics, the women provided a blood sample (added to heparin) and a urine sample; at week 34 they again completed the FFQ, and at week 38 they provided a fecal sample. Umbilical cord blood was collected and added to heparin at the births of their infants. Umbilical cord tissue and placental tissue were collected and stored frozen. The progress of women through the study is shown in **Figure 1**. The characteristics of the women and their pregnancies are provided in **Table 1**. There were no differences between the 2 groups with respect to age, height, and weight at study entry or with respect to skin-prick test positivity.

Women provided samples of breast milk at days 1, 5, 14, and 28 after giving birth, and infant feces were collected at days 7, 14, 28, and 84. Infant body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry ≤ 14 d of birth. Women completed a FFQ at 3 mo after parturition. At the infant's age of 6 mo, infants, their mothers, and, where possible, their fathers attended

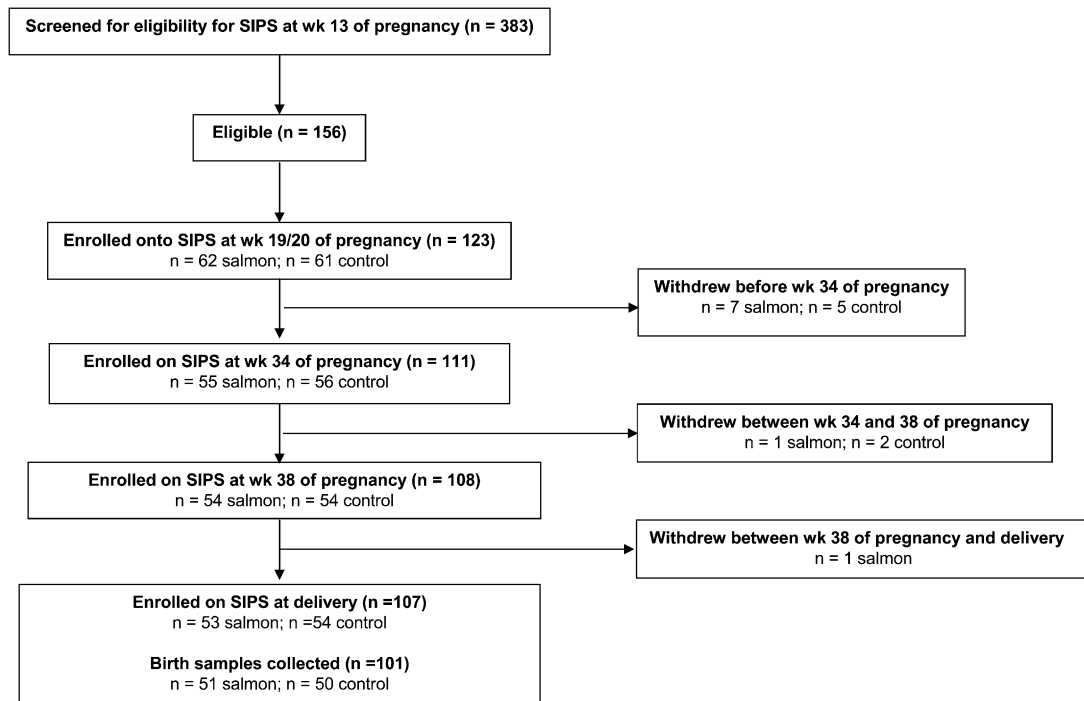


FIGURE 1. CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) diagram showing the flow of subjects through the study. SIPS, Salmon in Pregnancy Study.

a clinic at the Wellcome Trust Clinical Research Facility, Southampton General Hospital. At this visit, a FFQ (21) was completed for the infants ($n = 86$) who then underwent skin-prick testing for a range of common allergens (house dust mite, egg, cow milk protein, salmon, common grasses, common trees, cat, dog, common fungi, penicillin) and assessment for atopic dermatitis and its severity (22). A small blood sample (<5 mL) was collected from the infants and added to heparin. Mothers ($n = 86$) and fathers ($n = 75$) also underwent skin-prick testing.

Salmon

Salmon for use in the SiPS were raised at Skretting Aquaculture Research Centre, Stavanger, Norway. Their diet contained: fish meal (298.6 g/kg), soya concentrate (141.3 g/kg), maize gluten (99.5 g/kg), wheat gluten (29.9 g/kg), wheat (120.1 g/kg), southern hemisphere fish oil (132.1 g/kg), rapeseed oil (132.1 g/kg), flaxseed oil (33.5 g/kg), DL-methionine (0.32 g/kg), L-lysine (0.9 g/kg), monocalcium phosphate (5.64 g/kg), and vitamin and mineral mix (6.25 g/kg). The dietary ingredients used were selected to be low in contaminants. Salmon were farmed until they averaged 4 kg in weight and were then killed; a total of 2280 kg (gutted) of salmon were produced. They were then fileted into 150-g portions and the filets frozen individually in vacuum-sealed bags in Norway, from where they were shipped to Southampton and stored at -30°C until delivery to the women. Women then stored the filets in their home freezer until the day of cooking. Detailed nutrient and contaminant content of sample filets was determined at the National Institute of Nutrition and Seafood Research, Bergen, Norway. Each 150-g salmon portion contained (on average) 30.5 g protein, 16.4 g fat, 0.57 g EPA, 0.35 g docosapentaenoic acid (22:5n-3), 1.16 g DHA, 3.56 g total n-3 PUFA, 4.1 mg α -tocopherol, 1.6 mg γ -tocopherol, 6 μg vitamin A (sum of all reti-

nols), 14 μg vitamin D₃, and 43 μg selenium; variance in content of all nutrients among several analyzed portions was $<5\%$ for protein and fat; $<10\%$ for individual fatty acids, α -tocopherol, and γ -tocopherol; and $<20\%$ for vitamin A, vitamin D₃, and selenium. Thus, 2 portions of salmon/wk would typically provide 3.45 g EPA +DHA, 28 μg vitamin D₃, and 86 μg selenium. For comparison,

TABLE 1

Characteristics of the women enrolled in the Salmon in Pregnancy Study and of their pregnancies¹

	Control		Salmon	
	<i>n</i>	Values	<i>n</i>	Values
Age (y)	61	28.4 ± 0.6	62	29.5 ± 0.5
Height (cm)	61	165.6 ± 0.9	62	165.4 ± 0.8
Weight (kg)	61	71.3 ± 2.0	62	67.5 ± 1.6
First pregnancy (<i>n</i>)	61	23	62	27
Skin-prick test positive (<i>n</i>) ²	38	21	48	31
Duration of pregnancy (d)	54	277 ± 2	53	282 ± 1
Mode of delivery (<i>n</i>)	54	—	53	—
Normal vaginal	35	—	35	—
Elective section	2	—	3	—
Emergency section	7	—	5	—
Instrumental	10	—	10	—
Infants				
Birth weight (g)	54	3425 ± 82	53	3449 ± 72
Head circumference at birth (cm)	54	34.7 ± 0.2	53	34.5 ± 0.2
Apgar score at 1 min	54	8.5 ± 0.2	53	8.5 ± 0.2
Apgar score at 5 min	54	9.1 ± 0.1	53	9.1 ± 0.1

¹ All values are means ± SEMs unless otherwise indicated. There were no significant differences between groups.

² Not all women agreed to be skin prick tested: in the Control group, 38 women were tested and 21 were positive, whereas in the Salmon group, 48 women were tested and 31 were positive.

average weekly intakes among typical (nonpregnant) women in the United Kingdom aged 20–40 y are as follows: <1.4 g EPA +DHA (2), and probably much less than this (23); 18.9 μg vitamin D (7); and 273 μg selenium (24). The content of contaminants (per 150-g salmon portion) was as follows: 52.5 pg dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs), 0.492 μg total dichlorodipheyl trichloroethanes, 51 μg arsenic, 0.15 μg cadmium, 3.45 μg mercury, and 0.15 μg lead. In comparison, wild salmon from the Pacific Ocean have been reported to have concentrations of 0.1–0.4 pg dioxin and dioxin-like PCBs/g (25), which would equate to 15–60 pg/150-g portion, whereas wild salmon from the contaminated Baltic Sea had concentrations of 3.3–17 pg dioxins/g (26), which would equate to 495–2550 pg/150-g portion. In one study, the dioxin and dioxin-like PCB content of salmon farmed on commercial fish oil was 0.9–2.9 pg/g (25), which would equate to 135–435 pg/150-g portion. The contaminants in the study salmon used in the SiPS provided <12.5% of the FAO/WHO provisional tolerable weekly intake for dioxin and dioxin-like PCBs, <11.5% for arsenic, <0.00000008% for cadmium, 0.0000025% for mercury, and <0.00000002% for lead.

FFQ

The FFQ used to assess the diet of the women was a modification of one validated for use in pregnant women in Southampton (16–20) and included questions of consumption frequency of different types of fish: “oily fish,” “non-oily fish” (including canned tuna), “fish fingers and fish dishes,” and “shellfish.” Categories of consumption frequency were as follows: “more than once a day,” “once a day,” “3–6 times per week,” “1–2 times per week,” “once a fortnight,” “once a month,” “once every 2–3 mo,” and “never.”

Laboratory analyses

The laboratory analyses to be conducted as part of the SiPS and the center responsible for those measurements are listed in Supplemental Table 1 under “Supplemental data” in the online issue.

Plasma phosphatidylcholine fatty acid composition

Maternal and umbilical cord blood was collected and added to heparin, and plasma was prepared by centrifugation and stored at -80°C until analysis. Total lipid was extracted with chloroform/methanol (2:1 vol/vol); butylated hydroxytoluene was added to the extraction as antioxidant. Phosphatidylcholine, which typically contributes $\approx 75\%$ of plasma phospholipid, was isolated by solid phase extraction on aminopropylsilica cartridges. Plasma phosphatidylcholine fatty acid methyl esters were generated by reaction with methanol containing 2% (vol/vol) sulphuric acid at 50°C for 2 h. Fatty acid methyl esters were separated by chromatography on a BPX-70 column (30 m \times 220 μm ; film thickness: 0.25 μm ; SGE Europe, Milton Keynes, United Kingdom) fitted to a Hewlett-Packard HP6890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Avondale, PA) and run under standard conditions described elsewhere (27). Fatty acid methyl esters were identified by comparison with retention times of standards run previously and they were quantified by using ChemStation software (Hewlett-Packard).

Sample size, data presentation, and statistical analysis

The SiPS was powered according to an anticipated increase in maternal plasma phosphatidylcholine EPA content and an anticipated reduction in sensitization to egg in the infants at 6 mo of

age; the latter outcome is not reported here. It was calculated that a sample size of 50 women/group would have 93% power to detect a 50% higher plasma phosphatidylcholine EPA content in the salmon group than in the control group (ie, EPA as 0.75% of fatty acids compared with 0.5% of fatty acids).

Data are presented as means \pm SEMs or as medians and interquartile range as appropriate. Data for seafood and LC n-3 PUFA intake were compared between groups by Mann-Whitney *U* test. Data for maternal plasma phosphatidylcholine EPA and DHA were compared over time (weeks 20, 34, and 38) and between groups by 2-factor repeated-measures analysis of variance (time and treatment group as factors). Pairwise comparisons between groups for maternal plasma phosphatidylcholine EPA and DHA at a particular time point and between groups for umbilical cord plasma phosphatidylcholine EPA and DHA were made by using unpaired Student's *t* test. All statistical tests were performed by using SPSS version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL), and in all cases a value of $P < 0.05$ was taken to indicate significance.

RESULTS

Intake of fish, EPA, and DHA

The FFQ at week 20 confirmed the women's self-reported low intake of oily fish. The 34-wk FFQ showed that all women in the salmon group reported having oily fish 1–2 times/wk, which was interpreted as 1.5 times/wk (Table 2). Thus, at 34 wk gestation, the salmon group consumed oily fish significantly more frequently than did the control group (medians: 1.5 and 0 times/wk for salmon and control groups, respectively; $P < 0.001$) (Table 2). The change in oily fish intake from week 20 to week 34 of gestation was significantly different between the 2 groups (-0.04 and 1.21 times/wk for the control and salmon groups, respectively; $P < 0.001$). At 34 wk gestation, intakes of EPA, DHA, and EPA plus DHA from the whole diet, from seafood, and from oily fish were significantly higher in the salmon group than in the control group (all $P < 0.001$) (Table 3). According to data derived from the FFQ, the mean daily intake of EPA plus DHA from total fish increased by 270 mg in the salmon group and decreased by 12 mg in the control group ($P < 0.001$).

The fish diaries showed that the median weekly consumption frequency of study salmon in the salmon group was 1.94 portions, whereas the median weekly oily fish consumption frequency in the control group was 0 portions ($P < 0.001$). Total fish consumption frequency was 2.11 portions/wk for the salmon group and 0.47 portions/wk for the control group ($P < 0.001$). The fish diaries showed that 80% of the volunteers in the salmon group consumed 2 (or more) portions of study salmon/wk for 81% of the weeks during intervention. Also, 24.5% of the volunteers in the salmon group consumed ≥ 2 portions of study salmon/wk for every week from week 21 to week 38 of gestation. Fish consumption data from the fish diaries was used to calculate daily intakes of EPA and DHA: median daily intakes from total fish were 162 mg EPA, 326 mg DHA, and 491 mg EPA plus DHA for the salmon group; and 10 mg EPA, 16 mg DHA, and 24 mg EPA plus DHA for the control group during the intervention (all $P < 0.001$).

Pregnancy outcomes

The duration of pregnancy was an average of 5 d longer in the salmon group, but this was not significantly different from the

TABLE 2Weekly consumption frequency of seafood in the control and salmon groups during the study period¹

Seafood group	Data from FFQ at week 34			Data from fish diaries averaged over weeks 21–38		
	Control (n = 54)	Salmon (n = 55)	P	Control (n = 47)	Salmon (n = 49)	P
Non-oily fish	0.25 (0.08, 1.5)	0.5 (0.25, 1.5)	0.204	0.33 (0.06, 0.56)	0.17 (0.06, 0.33)	0.036
Fish fingers and fish dishes	0.18 (0, 0.5)	0.1 (0, 0.25)	0.866	0 (0, 0.11)	0 (0, 0)	0.002
Oily fish	0 (0, 0.14)	1.5 (1.5, 1.5)	<0.001	0 (0, 0.07)	1.94 (1.87, 2.00)	<0.001
Shellfish	0 (0, 0)	0 (0, 0.1)	0.076	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.507

¹ All values are median numbers of times per week; interquartile ranges in parentheses. FFQ, food-frequency questionnaire. P values were derived from a Mann-Whitney U test comparing the 2 groups.

duration in the control group (Table 1). Mode of delivery, infant birth weight, infant head circumference at birth, and infant well-being immediately after birth, as judged by Apgar score, were not different between groups (Table 1).

Plasma phosphatidylcholine EPA and DHA

There was a significant effect of treatment group and a significant group × time interaction on the proportion of both EPA and DHA in maternal plasma phosphatidylcholine ($P < 0.001$ for all). The percentages of EPA and DHA in plasma phosphatidylcholine decreased during pregnancy in the control group (P for trend = 0.029 and 0.008, respectively), whereas they increased in the salmon group (P for trend < 0.001 for both) (Figure 2). EPA and DHA in maternal plasma phosphatidylcholine were different between the groups at weeks 34 and 38 of pregnancy ($P < 0.001$ for all; Figure 2). Changes in the percentages of EPA and DHA in plasma phosphatidylcholine between weeks 20 and 34 and weeks 20 and 38 of gestation were significantly different between groups ($P < 0.001$ for all).

The percentages of both EPA and DHA in umbilical cord plasma phosphatidylcholine were significantly higher in the salmon group than in the control group (EPA: 0.32 ± 0.2 and 0.63 ± 0.04 for the control and salmon groups, respectively; $P < 0.001$; DHA: 6.4 ± 0.2 and 7.4 ± 0.2 for the control and salmon groups, respectively; $P = 0.001$).

DISCUSSION

The SiPS aimed to increase the intake of salmon by pregnant women who do not normally consume oily fish with the aim of increasing their intake of LC n–3 PUFAs (and other key nutrients) to enhance their status of LC n–3 PUFAs and that of

their fetus and neonate. It is hypothesized that the increased exposure to LC n–3 PUFAs would have effects on the maternal and fetal immune systems, as reported by others after early exposure to LC n–3 PUFAs from fish oil (13–15, 28), and reduce the risk of atopy in infancy (14). The salmon used was produced specifically for use in this study by aquaculture and provided 1.8 g EPA plus DHA, 2.08 g LC n–3 PUFAs, and 3.56 g total n–3 PUFAs/portion. Importantly, the ingredients used for the salmon feed were selected to be low in contaminants, so that as well as being rich in LC n–3 PUFAs, the salmon used here was very low in the full range of possible contaminants.

It was calculated that if the women in the salmon group consumed the desired 2 portions/wk they would take in 3.6 g EPA plus DHA from this source each week; on the basis of estimates of intake of EPA plus DHA among adults in the United Kingdom, this would likely increase the women's intake of EPA plus DHA by ≥18-fold and possibly more than this. Indeed, using the data available from the FFQ and the fish diaries, intake of EPA plus DHA was ≈20-fold higher in the salmon group than in the control group during intervention. It is evident from these data that consumption of 2 portions of oily fish/wk, with the EPA and DHA content of the salmon used here, will allow pregnant women to achieve the current recommendations for intake of LC n–3 PUFAs (2–5).

Previous studies have reported that high fish or LC n–3 PUFA intake is associated with longer duration of pregnancy (29–31). Here, pregnancy was ≈5 d longer in the salmon group than in the control group, which fits with differences previously reported. However, the difference was not significant, probably due to the small sample size, which limits power to detect this difference as significant. Other key pregnancy outcomes such as birth weight, infant head circumference at birth, and infant health immediately after birth were not different between groups.

TABLE 3Intakes of long-chain n–3 polyunsaturated fatty acids from the total diet, seafood, and oily fish in the control and salmon groups calculated by using a food-frequency questionnaire at week 34 of gestation¹

	Total diet			Seafood			Oily fish		
	Control	Salmon	P	Control	Salmon	P	Control	Salmon	P
EPA	12 (3, 35)	134 (128, 146)	<0.001	12 (3, 35)	133 (128, 146)	<0.001	0 (0, 15)	122 (122, 122)	<0.001
DHA	20 (6, 67)	269 (261, 298)	<0.001	20 (5, 63)	267 (259, 298)	<0.001	0 (0, 27)	249 (249, 249)	<0.001
EPA+DHA	30 (9, 103)	403 (309, 444)	<0.001	30 (8, 97)	403 (387, 444)	<0.001	0 (0, 41)	371 (371, 371)	<0.001

¹ All values are median milligrams per day; interquartile ranges in parentheses. n = 54 and 55 in the control and salmon groups, respectively. EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid. P values were derived from a Mann-Whitney U test comparing the 2 groups.

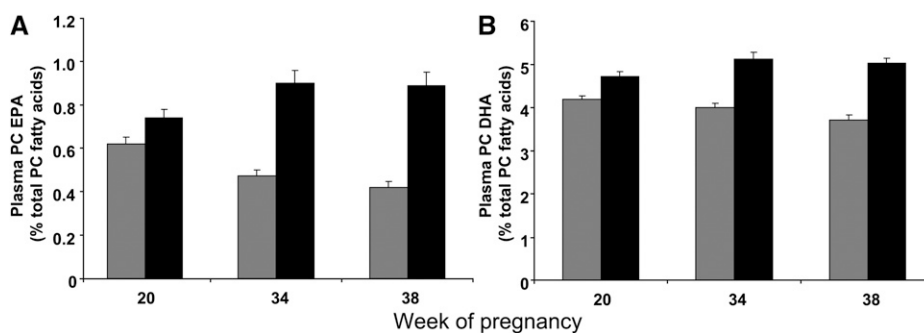


FIGURE 2. Mean (\pm SEM) concentrations of maternal blood plasma phosphatidylcholine (PC) eicosapentaenoic acid (EPA) (A) and docosahexaenoic acid (DHA) (B) in the control and salmon groups. Values are shown in g/100 g total fatty acids. Control group, gray bars; salmon group, black bars. Two-factor repeated-measures ANOVA indicated a significant effect of group ($P < 0.001$) but not of time and a significant group \times time interaction ($P < 0.001$) for EPA and significant effects of group ($P < 0.001$) and time ($P = 0.003$) and a significant group \times time interaction ($P < 0.001$) for DHA.

The decline in the percentage of EPA and DHA in plasma phosphatidylcholine over the course of pregnancy in the control group is entirely consistent with data reported previously (32–34), and indeed the percentage values for EPA and DHA reported here are very similar to those reported previously for plasma phospholipids during pregnancy in Dutch, Belgian, and German women (32–35). In contrast to the observations in the control group, not only did EPA and DHA not decline in plasma phosphatidylcholine in the salmon group but they increased. At 34 and 38 wk of pregnancy, the percentage of EPA in plasma phosphatidylcholine in the salmon group was $\approx 100\%$ higher than in the control group, whereas DHA was $\approx 25\%$ higher. Plasma phosphatidylcholine from umbilical cord blood showed higher EPA and DHA in the salmon group, indicating enhanced transfer of these functionally important fatty acids to the fetus, presumably as a result of the higher concentration in the maternal circulation. The higher percentage of EPA and DHA in the fetal circulation in the salmon group may result in better visual, neural, and immune development in those infants. The percentages of other fatty acids, including arachidonic acid, and the fatty acid composition of other plasma lipids and of erythrocytes and leukocytes in maternal and umbilical cord blood will be reported in future publications, as will immune and clinical outcomes in the infants.

In conclusion, this study shows that if pregnant women who do not normally consume oily fish eat salmon twice per week they will significantly increase their intake of LC n–3 PUFAs; they will meet current dietary recommendations for DHA and LC n–3 PUFAs; they will enhance their status of EPA and DHA, preventing the pregnancy-associated decline in these key fatty acids; and they will increase the status of EPA and DHA in their fetus and neonate.

We thank the staff of the Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit and the Princess Anne Hospital for the assistance in carrying out the SiPS. We also thank all of the subjects and their families.

The authors' responsibilities were as follows—EAM, HMI, KMG, and PCC: were responsible for designing the study and had overall responsibility for all aspects of the study; GR: was responsible for producing the study salmon; L-SK, MV, and NDD: recruited and screened volunteers, carried out the intervention, and collected the blood samples and anthropometric measurements, questionnaire, and compliance data; L-SK and MV: carried out dietary analysis under the supervision of SMR; L-SK, MV, PSN, HU, AR, M-CF, BL, JH, EG, JO, MDM, and CMA: carried out the laboratory analysis (most of which is not reported here), supervised by EAM, PY, M-PV, LF,

SB, AG, and PCC; EAM, L-SK, MV, and PCC: conducted the statistical analysis of the data reported here; PCC: wrote the draft of the manuscript; and all authors: contributed to and approved the final version of the manuscript. GR is employed by a company that produces feed for farmed salmon. None of the other authors had any personal or financial conflicts of interest.

REFERENCES

1. British Nutrition Foundation. Briefing paper: n–3 fatty acids and health. London, United Kingdom: British Nutrition Foundation, 1999.
2. Scientific Advisory Committee on Nutrition & Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. London, United Kingdom: The Stationary Office, 2004.
3. Cetin I, Koletzko B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:297–302.
4. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 2010;8:1461.
5. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and fatty acids in Human Nutrition. Fat and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization, 2010.
6. Department of Health and Food Standards Agency. National Diet and Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years. London, United Kingdom: The Stationary Office, 2004.
7. Department of Health and Food Standards Agency. National Diet and Nutrition Survey: NDNS headline results from year 1 of the Rolling programme (2008/2009). London, United Kingdom: The Stationary Office, 2009.
8. Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 2008;1237:35–43.
9. Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, et al. Workshop report: early nutrition and immunity—progress and perspectives. *Br J Nutr* 2006;96:774–90.
10. Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, et al. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;Dec 9 (Epub ahead of print; DOI:10.1007/S12016-009-8186-2).
11. Prescott SL, Dunstan JA. Prenatal fatty acid status and immune development: the pathways and the evidence. *Lipids* 2007;42:801–10.
12. Calder PC, Kremmyda LS, Vlachava M, et al. Is there a role for fatty acids in early life programming of the immune system? *Proc Nutr Soc* 2010;69:373–80.
13. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, et al. Maternal fish oil supplementation reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:442–8.
14. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1178–84.
15. Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM, et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy. *Pediatr Res* 2005;57:276–81.

16. Crozier SR, Inskip HM, Godfrey KM, Robinson SM. Dietary patterns in pregnant women: a comparison of food-frequency questionnaires and 4 d prospective diaries. *Br J Nutr* 2008;99:869–75.
17. Borland SE, Robinson S, Crozier SR, Inskip HM; SWS Study Group. Stability of dietary patterns in young women over a 2-year period. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:119–26.
18. Crozier SR, Robinson SM, Borland SE, Inskip HM; SWS Study Group. Dietary patterns in the Southampton Women's Survey. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1391–9.
19. Robinson S, Godfrey K, Osmond C, Cox V, Barker D. Evaluation of a food frequency questionnaire used to assess nutrient intakes in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:302–8.
20. Crozier SR, Robinson SM, Godfrey KM, Cooper C, Inskip HM. Women's dietary patterns change little from before to during pregnancy. *J Nutr* 2009;139:1956–63.
21. Marriott LD, Robinson SM, Poole J, et al. What do babies eat? Evaluation of a food frequency questionnaire to assess the diets of infants aged 6 months. *Public Health Nutr* 2008;11:751–6.
22. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. *Dermatology* 1993;186:23–31.
23. Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PRC. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 2003;38:391–8.
24. Department of Health. Dietary Reference Values for food, energy, and nutrients for the United Kingdom. London, United Kingdom: The Stationary Office, 1991.
25. Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 2004;303:226–9.
26. Isosaari P, Hallikainen A, Kiviranta H, et al. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers in the edible fish caught from the Baltic Sea and lakes in Finland. *Environ Pollut* 2006;141:213–25.
27. Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged > 55 years. *Am J Clin Nutr* 2001;73:539–48.
28. Krauss-Etschmann S, Hartl D, Rzehak P, et al; Nutraceuticals for Healthier Life Study Group. Decreased cord blood IL-4, IL-13, and CCR4 and increased TGF-beta levels after fish oil supplementation of pregnant women. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:464–70.
29. Olsen SF, Secher NJ. Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ* 2002;324:447–50.
30. Olsen SF, Østerdal ML, Salvig JD, et al. Duration of pregnancy in relation to seafood intake during early and mid pregnancy: prospective cohort. *Eur J Epidemiol* 2006;21:749–58.
31. Olsen SF, Sørensen JD, Secher NJ, et al. Randomised controlled trial of effect of fish-oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet* 1992;339:1003–7.
32. Al MDM, van Houwelingen AC, Kester ADM, 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.
33. Otto SJ, Houwelingen AC, Antal M, et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:232–42.
34. De Vriese SR, Dhont M, Christophe AB. FA composition of cholesteryl esters and phospholipids in maternal plasma during pregnancy and at delivery and in cord plasma at birth. *Lipids* 2003;38:1–7.
35. Berghaus TM, Demmelmair H, Koletzko B. Fatty acid composition of lipid classes in maternal and cord plasma at birth. *Eur J Pediatr* 1998;157:763–8.

Artículo II

Does Increased Intake of Salmon Increase Markers of Oxidative Stress in Pregnant Women? The Salmon in Pregnancy Study

Cruz E. García-Rodríguez,¹⁻³ Johanna Helmersson-Karlqvist,^{1,4} María Dolores Mesa,³ Elizabeth A. Miles,⁵ Paul S. Noakes,⁶ Maria Vlachava,⁵ Lefkothea-Stella Kremmyda,⁵ Norma D. Diaper,⁵ Keith M. Godfrey,⁵⁻⁷ Philip C. Calder,^{5,7} Ángel Gil,³ and Samar Basu^{1,2,8}

Abstract

The Salmon in Pregnancy Study provided two meals of salmon per week to pregnant women from week 20 of gestation; the control group maintained their habitual diet low in oily fish. Salmon is a rich source of marine n-3 fatty acids. Since marine n-3 fatty acids may increase oxidative stress, we investigated whether increased salmon consumption could affect markers of oxidative stress in mid and late pregnancy. Urinary 8-iso-prostaglandin F_{2α}, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, and plasma lipid peroxide concentrations did not change from week 20 to 38 of pregnancy and were not altered by increased consumption of salmon. Thus, increased intake of salmon during pregnancy does not increase oxidative stress, as judged by the markers of oxidative damage to lipids and DNA measured herein. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2819–2823.

Introduction

OXIDATIVE STRESS is considered to cause damage to macromolecules and cells and to contribute to various pathologies. Polyunsaturated fatty acids are susceptible to oxidative damage (7), and several markers of such damage have been described including F₂-isoprostanes and lipid peroxides (LPO). F₂-isoprostanes are a family of prostaglandin derivatives generated *in vivo* by free radical-induced peroxidation of arachidonic acid (6). One major F₂-isoprostane, 8-iso-prostaglandin F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}), is increased in several situations associated with oxidative stress, including atherosclerosis, diabetes, obesity, cigarette smoking, neurodegenerative diseases, and asthma, and is currently regarded as one of the most reliable biomarkers of *in vivo* oxidative stress (1, 8). The extent of lipid peroxidation can also be estimated by the amount of primary peroxidation products such as LPO. Another marker of oxidative stress, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), is produced by oxidation of the

nucleoside deoxyguanosine and is subsequently excreted directly into the urine, and is a sensitive marker to study oxidative DNA damage.

Increased intake of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA), which are highly unsaturated, as dietary supplements has been reported to result in enhanced lipid peroxidation in healthy adults, in smokers, in type-2 diabetics, in myocardial infarction survivors, and in pregnant women. Oily fish, such as salmon, are a rich dietary source of n-3 LCPUFA, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3), and docosahexaenoic acid

Innovation

Marine n-3 fatty acids may increase oxidative stress. The Salmon in Pregnancy Study provided two meals of salmon per week to pregnant women from week 20 of gestation until parturition. No increase in markers of oxidative stress was seen compared with a control group of pregnant women consuming their habitual diet.

¹Oxidative Stress and Inflammation, Department of Public Health and Caring Sciences, Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

²Centre of Excellence-Inflammation, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden.

³Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Biomedical Research Center, Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix," Granada University, Granada, Spain.

⁴Clinical Chemistry, Department of Medical Sciences, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden.

⁵Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom.

⁶Southampton Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit, University of Southampton, Southampton, United Kingdom.

⁷Southampton NIHR Nutrition, Diet and Lifestyle Biomedical Research Unit, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, United Kingdom.

⁸EA 4233: Nutrition, Cancerogenesis and Anti-Tumor Therapy, Laboratory of Biochemistry, Molecular Biology, and Nutrition, University d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

(DHA, 22:6 n-3). Despite their potential to be nonenzymatically peroxidized, n-3 LCPUFA are associated with benefits to human health especially with regard to early visual and neural development and reducing cardiovascular morbidity and mortality (2). As a result of this there are recommendations to increase intake of n-3 LCPUFA especially from oily fish (9). In the United Kingdom it is recommended that all individuals consume at least one portion of oily fish per week and the guideline range for pregnant women is one or two portions per week (9). These recommendations are based mainly upon the provision of health promoting n-3 LCPUFA and do not consider the possible effect of increases in n-3 LCPUFA on oxidative damage that may not be beneficial to health.

Epidemiological data suggest that early exposure to oily fish (e.g., during pregnancy or infancy) is associated with lower risk of atopy and allergic disorders in children (4). The Salmon in Pregnancy Study (SiPS) is the first intervention trial with oily fish during pregnancy and focuses on pregnant women whose offspring are at increased risk of developing atopic diseases (5). The SiPS provided an opportunity to investigate for the first time whether increased oily fish intake in pregnancy increases oxidative stress, as indicated by increased concentrations of 8-iso-PGF_{2x} and 8-OHdG in urine and of LPO in plasma.

Salmon Intake and Its Consequences for Oxidative Stress

Results for the different indicators of oxidative stress are shown in Table 1. Urinary concentrations of 8-iso-PGF_{2x} were not significantly altered during pregnancy. However, there was a group effect on urinary 8-iso-PGF_{2x} concentrations, which were significantly lower in the salmon group than in the control group ($p=0.021$). Comparison between the two groups at 20, 34, and 38 weeks showed a trend toward a difference, with values in the salmon group being lower ($p=0.05$, $p=0.164$, and $p=0.094$, at weeks 20, 34, and 38, respectively). When 8-iso-PGF_{2x} concentrations at baseline (i.e., week 20) were used as a covariant, the group effect failed to remain significant ($p=0.350$). Thus, urinary 8-iso-PGF_{2x} did not change from week 20 to 38 of pregnancy and was not affected by increased intake of salmon. It is not clear why urinary 8-iso-PGF_{2x} concentrations were lower in the salmon

TABLE 2. GENERAL CHARACTERISTICS OF WOMEN AT 20 WEEKS OF PREGNANCY AND BIRTHWEIGHTS OF THEIR NEONATES ACCORDING TO GROUP (CONTROL vs. SALMON)

	Control group (n=61)	Salmon group (n=62)
<i>Pregnant women</i>		
Age at entry (years)	28.4±0.6	29.5±0.5
Body height (cm)	165.6±0.9	165.4±0.8
Body weight (kg)	71.4±2.0	67.4±1.6
Body mass index (kg/m ²)	26.0±0.6	24.7±0.6
<i>Smoking habits</i>		
	<i>n</i>	<i>n</i>
Never	31	34
Past	21	24
Current	9	4
<i>Offspring</i>		
Birth weight (g)	3425±82	3449±72

group at week 20 of pregnancy: age and smoking habits were not different between groups (Table 2) and body mass index was not different, although it tended to be lower in the salmon group (Table 2). Although the women were randomized to the two groups, there may have been some small dietary difference between those groups. Plasma LPO and urinary 8-OHdG levels did not change during pregnancy and were not different between the two groups (Table 1).

It has been reported that F₂-isoprostanes are increased in pregnant women compared to nonpregnant women, suggesting that normal pregnancy may be a state of mild-oxidative stress (1). In a Japanese population, F₂-isoprostane levels were higher in plasma and urine in the third trimester of pregnancy compared to the nonpregnant state. Further, a progressive increase in urinary F₂-isoprostanes was seen throughout uncomplicated pregnancy in Swedish women. In a recent study, an increase of plasma total isoprostanes in the third trimester of pregnancy compared to nonpregnant control women was observed. Nevertheless, some other studies reported that F₂-isoprostane levels do not change significantly during pregnancy. Differences between studies may be due to the method used for determination of isoprostanes or related to the exact timing of sample collection during gestation. In the present study there was no increase in F₂-isoprostanes from week 20 of pregnancy. Thus, any effect of pregnancy on

TABLE 1. LIPID AND DNA OXIDATION BIOMARKERS IN PREGNANT WOMEN AT DIFFERENT TIME POINTS (WEEKS 20, 34, AND 38 OF GESTATION) AND ACCORDING TO GROUP (CONTROL vs. SALMON)

	Group						p-Value		
	Control			Salmon			Source of variation		
	20 weeks	34 weeks	38 weeks	20 weeks	34 weeks	38 weeks	Group (G)	Time (T)	Interaction G×T
Isoprostanes/creatinine (nmol/mmol)	0.86±0.04	0.92±0.05	1.05±0.07	0.80±0.04	0.90±0.05	0.90±0.05	0.021 ^a	0.402	0.813
LPO (μmol/L)	1163±61	1182±66	1138±87	979±43	1065±51	967±57	0.120	0.441	0.443
8-OHdG/creatinine (ng/mg)	39.83±2.92	46.83±3.80	38.90±3.95	45.82±3.67	39.88±2.90	37.43±2.65	0.775	0.223	0.145

Values are expressed as mean ± standard error of mean.

^aStatistically significant difference ($p<0.05$) between groups using a general linear model. When F₂-isoprostanes at week 20 were used as a covariant, no significant differences were seen between groups ($p=0.350$). $n=54$ for the salmon supplemented group; $n=54$ for the control group.

8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; LPO, lipid peroxide.

increasing oxidative stress (as indicated by urinary 8-iso-PGF_{2x}) may have occurred before week 20 of gestation.

Cross-sectional studies have reported higher levels of LPO and/or thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during pregnancy. Longitudinal studies have shown that levels of lipid hydroperoxides and/or TBARS increase with advancing gestational age. However, in the current study the levels of plasma LPO did not differ significantly between time points and were unaffected by eating salmon. Once again, this suggests that any effect of pregnancy on oxidative stress affecting lipids may be established by week 20 of pregnancy.

Hung *et al.* (3) measured urinary 8-OHdG in women with uncomplicated pregnancies and found increased levels with advancing gestation. However, in the current study there was no significant change in urinary 8-OHdG levels from week 20 of pregnancy.

Thus, the current study suggests that any effect of pregnancy on oxidative stress in healthy uncomplicated pregnancies is established by week 20 of gestation and that increased consumption of salmon beyond that time point, which is consistent with current United Kingdom advice, does not increase oxidative stress as detected by the three markers used herein.

In the current study eating salmon and thereby increasing intake of n-3 LCPUFA (by the equivalent of about 500 mg/day) during pregnancy was not associated with increased oxidative stress as indicated by urinary 8-iso-PGF_{2x} and plasma LPO concentrations. There was a lower urinary 8-iso-PGF_{2x} concentration in the salmon group, but this was due to this difference being apparent at study entry (*i.e.*, at week 20 of pregnancy). Studies of n-3 LCPUFA supplementation in nonpregnant adults have reported an increase in markers of lipid peroxidation such as plasma TBARS, and at least one study in pregnant women has also demonstrated this. However, the current study suggests that increasing n-3 LCPUFA intake from salmon in pregnant women does not raise a concern about increased oxidative stress, at least beyond week 20 of pregnancy. There are at least three reasons why n-3 LCPUFA from salmon twice per week does not increase the concentrations of markers of oxidative stress, whereas n-3 LCPUFA supplements can. The first reason is related to dose or intake level. In the SiPS the n-3 LCPUFA were provided from salmon on 2 days per week resulting in an equivalent daily intake of about 500 mg EPA plus DHA per day. Many studies using fish oil supplements have provided several grams of EPA plus DHA each day, providing a much greater amount of substrate for *in vivo* lipid peroxidation. Second, there may be an inherent difference between providing n-3 LCPUFA in a purified oil in capsules compared with providing them within a food matrix as was done in SiPS. Third, capsules have been given in studies usually without any change in background diet and so the increase in n-3 LCPUFA intake occurs without a change in intake of antioxidant nutrients, other than vitamin E, which is typically present in fish oil capsules. However in SiPS, the salmon provided a range of nutrients involved in antioxidant defenses (see Ref. 5), including α -tocopherol, γ -tocopherol, vitamin A, and selenium, making a significant contribution to increased intake of these nutrients. Thus, in addition to increased intake of n-3 LCPUFA, the salmon used in SiPS provided an increased intake of antioxidant nutrients, which might act to counter any effect of n-3 LCPUFA in increasing oxidative stress.

Concluding Remarks and Future Directions

Under the conditions of the SiPS, our observations lead to the conclusions that increases in oxidative stress do not occur beyond week 20 of pregnancy and that increased intake of oily fish from 20 weeks of gestation until the time of delivery, which is consistent with current United Kingdom advice, does not enhance oxidative stress as indicated by the three markers measured herein. Apart from the risk of atopy to their unborn child, the women studied in the SiPS were healthy and had uncomplicated pregnancies; the role of oxidative stress in more complicated pregnancies and the impact of increased oily fish intake in such situations requires future study. Further, the effect of oily fish from earlier in and before pregnancy requires further study.

(A fully referenced discussion may be viewed as Supplementary Data; Supplementary Data are available online at www.liebertonline.com/ars)

Notes

Subjects and methodology

Subjects. The study design, the subjects, and their characteristics, aspects of their diet, and their compliance have been described in detail elsewhere (5). In brief, a total of 123 pregnant women in the area of Princess Anne Hospital (Southampton, United Kingdom) were enrolled in the study. Inclusion criteria were age 18 to 40 years; <19 weeks of gestation; healthy uncomplicated singleton pregnancy; baby at risk of atopy (one or more first-degree relatives of the baby affected by atopy, asthma, or allergy by self-report); consuming <2 portions of oily fish per month excluding tinned tuna; and not using fish oil supplements currently or in the previous 3 months. Exclusion criteria were age <18 or >40 years; >19 weeks of gestation; no first-degree relatives of the baby affected by atopy, asthma, or allergy; consuming >2 portions of oily fish (excluding tinned tuna) per month; use of fish oil supplements within previous 3 months; participation in another research study; known diabetic; presence of any auto-immune disease; learning disability; terminal illness; and mental health problems. All procedures were approved by the Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee (07/Q1704/43). The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki, and all women gave written informed consent. The SiPS is registered at www.clinicaltrials.gov (NCT00801502).

Study design

Recruited women were randomly assigned to one of two groups. Women in the control group ($n=61$) were asked to continue their habitual diet and women in the salmon group ($n=62$) were asked to incorporate two portions of farmed-salmon (150 g/portion) into their diet per week from study entry (week 20) until they gave birth. Farmed salmon for use in the SiPS were raised using dietary ingredients selected to contain low levels of contaminants. Each 150 g salmon portion contained (on average) 30.5 g protein, 16.4 g fat, 0.57 g EPA, 0.35 g docosapentaenoic acid, 1.16 g DHA, 3.56 g total n-3 PUFA, 4.1 mg α -tocopherol, 1.6 mg γ -tocopherol, 6 μ g vitamin A, 14 μ g vitamin D₃, and 43 μ g selenium. Thus, two portions of salmon per week would typically provide 3.45 g EPA+DHA, 28 μ g vitamin D₃, and 86 μ g selenium. The

contaminants provided <12.5% of the FAO/WHO provisional tolerable weekly intake for dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls, <11.5% for arsenic, <0.00000008% for cadmium, 0.0000025% for mercury, and <0.00000002% for lead.

Fifteen subjects were not able to complete the study for various reasons (delivery before appointment, cancelled because of feeling tired, busy, or some sort of injury), leaving a total of 54 subjects in the control group and 54 subjects in the salmon group. The two groups did not differ in age, height, weight, or birth weight of offspring as earlier reported (5) (Table 2).

Fasting blood and first morning urine samples were collected at weeks 20, 34, and 38 of gestation. Samples were stored frozen at -70°C until analysis.

Measurement of urinary 8-iso-PGF_{2x} concentrations

Urinary samples were analyzed for 8-iso-PGF_{2x} by a highly specific and validated radioimmunoassay as described previously. The cross-reactivity of the 8-iso-PGF_{2x} antibody with 15-keto-13, 14-dihydro-8-iso-PGF_{2x}, 8-iso-PGF_{2β}, PGF_{2x}, 15-keto-PGF_{2x}, 15-keto-13, 14-dihydro-PGF_{2x}, TXB₂, 11β-PGF_{2x}, 9β-PGF_{2x}, and 8-iso-PGF_{3x} was 1.7%, 9.8%, 1.1%, 0.01%, 0.01%, 0.1%, 0.03%, 1.8%, and 0.6%, respectively. The detection limit of the assay was 23 pmol/L. The urinary levels of 8-iso-PGF_{2x} were adjusted for urinary creatinine concentration.

Measurement of plasma LPO concentrations

A colorimetric commercial assay kit (Oxystat; Biomedica, Vienna, Austria) was used to determine the concentration of total LPO in EDTA-plasma samples. Briefly, the peroxide concentration was determined by reaction of the biological peroxides with peroxidase and a subsequent color-reaction using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrate. After addition of sulfuric acid as stop solution, the colored liquid was measured photometrically at 450 nm. A calibrator was used to calculate the concentration of circulating biological peroxides in the sample, with a detection limit of 7 μmol/L.

Measurement of urinary 8-OHdG concentrations

The level of urinary 8-OHdG was determined by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (JAICA, Fukuroi, Japan). In brief, 50 μl of primary monoclonal antibody and 50 μl of sample or standard were added to microtiter plates, which were precoated with 8-OHdG, incubated at 37°C for 1 h, and washed with 250 μl of phosphate-buffered saline (PBS). One hundred microliters of HRP-conjugated secondary antibody was then added to each well, incubated at 37°C for 1 h, and washed with 250 μl of PBS. One hundred microliters of enzyme substrate was then added to each well and allowed to react at room temperature for 15 min. The reaction was terminated with 100 μl of 1 N phosphoric acid. Absorbance of each well was read at 450 nm by a microplate reader. The determination range was 0.125–10 ng/ml. The concentration of 8-OHdG was adjusted to urinary levels of creatinine (expressed as ng/mg creatinine).

Measurement of urinary creatinine concentrations

Creatinine concentrations in urine samples were measured on a Konelab 20 instrument (Thermo Clinical Lab Systems, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Statistical analysis

Results are given as mean ± standard error of mean. Normal distribution of data was examined using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences between treatment groups over time were evaluated using a general linear model of variance for repeated measures. *A posteriori* Bonferroni tests were performed to evaluate specific differences between groups at each time of gestation. Percentages of smoking categories (never, past, and current smoking) between groups were compared using a Chi-square test. All statistical analyses were performed with the Statistical Package of Social Science (SPSS) 15.0 for Windows. *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

The SiPS was supported by the European Commission under Framework 6: Sustainable aquafeeds to maximize the health benefits of farmed fish for consumers (Aquamax; FOOD-CT-2006-16249). The Swedish Society for Medical Research is acknowledged for support.

References

1. Basu S. F2-Isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 10: 1405–1434, 2008.
2. Calder PC and Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med* 121: 148–157, 2009.
3. Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Li MJ, Yeh YL, Chen SF, and Hsieh TT. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci* 17: 401–409, 2010.
4. Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Diaper ND, Miles EA, and Calder PC. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega 3-fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1007/s12016-009-8186-2.
5. Miles E, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, Garcia E, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Robinson SM, Inskip HM, Godfrey KM, and Calder PC. The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2010 (in press).
6. Morrow JD, Harris TM, and Roberts LJ, 2nd. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 184: 1–10, 1990.
7. Nenseter MS and Drevon CA. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 7: 8–13, 1996.
8. Roberts LJ and Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 28: 505–513, 2000.
9. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN)/Committee on Toxicity (COT). Advice on Fish Consumption: Benefits and Risks. The Stationery Office, London, 2004. Available at www.food.gov.uk.

Address correspondence to:

Prof. Samar Basu

EA 4233: Nutrition, Cancerogenesis and Anti-Tumor Therapy

Laboratory of Biochemistry, Molecular Biology, and Nutrition

University d' Auvergne

28, Place Henri-Dunant BP 38

63001 Clermont-Ferrand

France

E-mail: samar.basu@u-clermont1.fr

Date of first submission to ARS Central, June 20, 2011; date of acceptance, June 20, 2011.

Abbreviations Used

8-iso-PGF_{2x} = 8-iso-prostaglandin F_{2x}

8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

DHA = docosahexaenoic acid

EPA = eicosapentaenoic acid

LPO = lipid peroxides

n-3 LC-PUFA = n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids

PBS = phosphate-buffered saline

SiPS = Salmon in Pregnancy Study

TBARS = thiobarbituric acid reactive substances

Artículo III

Antioxidants & Redox Signaling

Antioxidants & Redox Signaling: <http://mc.manuscriptcentral.com/liebert/ARS>

Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women?

Journal:	<i>Antioxidants & Redox Signaling</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	News and Views
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>GARCIA-RODRIGUEZ, CRUZ; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Department of Biochemistry and Molecular Biology II Dolores Mesa, Maria; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Department of Biochemistry and Molecular Biology II OLZA, JOSUNE; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center (CIBM), Department of Biochemistry and Molecular Biology II Vlachava, Maria; Institute of Human Nutrition and Development Origins of Health and Disease, Kremmyda, Lefkothea-Stella; Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Diaper, Norma; Institute of Human Nutrition and Development Origins of Health and Disease, NOAKES, PAUL; Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Miles, Elisabeth; Institute of Human Nutrition and Development Origins of Health and Disease, Ramirez-Tortosa, MCarmen; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Department of Biochemistry and Molecular Biology II Liasset, Bjørn; National Institute of Nutrition and Seafood Research, Frøyland, Livar; National Institute of Nutrition and Seafood Research, Rossary, Adrien; EA 4233, University d'Auvergne, Clermont University, CRNH Auvergne, CLARA,, Farges, Marie-Chantal; EA 4233, University d'Auvergne, Clermont University, CRNH Auvergne, CLARA,, Vasson, Marie-Paule; Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand AGUILERA, CONCEPCION; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center (CIBM), Department of Biochemistry and Molecular Biology II Helmersson, Johanna; Clinical Nutrition and Metabolism, Department of Public Health and Caring Sciences, Uppsala University Godfrey, Keith; Southampton Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit, University of Southampton; Southampton NIHR Nutrition, Diet & Lifestyle Biomedical Research Unit, Southampton University Hospitals NHS Trust; Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton,</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	Calder, Philip; Institute of Human Nutrition and Development Origins of Health and Disease, ; Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Basu, Samar; Clinical Nutrition and Metabolism, Department of Public Health and Caring Sciences; Gil, Angel; Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Department of Biochemistry and Molecular Biology II
Keyword:	Free Radicals, Lipids, Nutrition, Stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

ESSENTIAL For Peer Review only

García-Rodríguez *et al.*, 2011

NEWS & VIEWS

Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women?

Cruz E. García-Rodríguez¹, María D Mesa¹, Josune Olza¹, Maria Vlachava², Lefkothea Stella Kremmyda², Norma D. Diaper², Paul S. Noakes², Elizabeth A. Miles², María Carmen Ramírez-Tortosa¹, Bjørn Liaset³, Livar Frøyland³, Adrien Rossary⁴, Marie-Chantal Farges⁴, Marie-Paule Vasson^{4,5}, Concepcion M. Aguilera¹, Johanna Helmersson-Karlqvist^{6,7}, Keith M. Godfrey^{2,8,9}, Philip C. Calder^{2,9}, Samar Basu^{4,6}, Ángel Gil¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Granada, Spain

² Developmental Origins of Health and Disease Division, School of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom

³ National Institute of Nutrition and Seafood Research, Bergen, Norway

⁴ EA 4233, University d’Auvergne, Clermont University, CRNH Auvergne, CLARA, Clermont-Ferrand, France

⁵ Clinical Nutrition Department, Anticancer Institute Jean-Perrin, Clermont-Ferrand, France

⁶ Oxidative Stress and Inflammation, Department of Public Health and Caring Sciences, Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala, Sweden, and Centre of Excellence-Inflammation, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden

García-Rodríguez *et al.*, 2011

⁷ Clinical Chemistry, Department of Medical Sciences, Uppsala University Hospital,
Uppsala, Sweden

⁸ Southampton Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit, University of
Southampton, Southampton, United Kingdom

⁹ Southampton NIHR Nutrition, Diet & Lifestyle Biomedical Research Unit,
Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, United Kingdom

Address correspondence to:

Cruz E. García-Rodríguez

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (INyTA)

Centro de Investigación Biomédica (CIBM)

Universidad de Granada

Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla

Granada, Spain.

Tel: +34 958 241000 Ext. 20379

Fax: +34 958 819132

Email: erikagr@ugr.es

Funding: Supported by the European Commission under Framework 6: Sustainable aquafeeds to maximize the health benefits of farmed fish for consumers (Aquamax; FOOD-CT-2006-16249).

Running title: Antioxidant Defense System and Salmon in Pregnancy

García-Rodríguez *et al.*, 2011

50 **KEYWORDS:** Antioxidants; omega 3, fatty acids; oxidative stress; pregnancy; fish
51 oils.

52

53

García-Rodríguez *et al.*, 2011

54 **Abstract**

55 Salmon is a rich source of marine *n*-3 fatty acids, which may increase oxidative stress
56 and, in turn, could affect the antioxidant defense system in blood plasma and
57 erythrocytes of pregnant women. The Salmon in Pregnancy Study provided two meals
58 of salmon per week to pregnant women from week 20 of gestation; the control group
59 maintained their habitual diet low in oily fish. Higher selenium and retinol plasma
60 concentrations were observed after dietary salmon supplementation. Besides, a
61 concomitant increase in selenium and glutathione concentration as well as glutathione
62 peroxidase and reductase activities, were detected as pregnancy progressed. However,
63 tocopherols, retinol, β -carotene and coenzyme Q₁₀ decreased in late pregnancy.
64 Collectively, our findings lead to the hypothesis that increased farmed salmon intake
65 may increase antioxidant defenses during pregnancy. Clinical trials identifier
66 NCT00801502.

67

García-Rodríguez *et al.*, 2011

68 **Introduction**

69 Reactive oxygen species (ROS) are generated during normal aerobic metabolism and
70 increased levels are present during oxidative stress as a consequence of an imbalance
71 between the formation and inactivation of these species. The antioxidant defense
72 system provides protection to avoid ROS-induced damage of cellular components. The
73 capacity of this defense system is determined by a dynamic interaction between
74 individual components, which include vitamins A, E, and β -carotene, coenzyme Q₁₀
75 (CoQ₁₀), glutathione and several antioxidant enzymes. The most important enzymatic
76 antioxidants are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase
77 (GR) and glutathione peroxidase (GPx), with selenium as part of several selenium-
78 proteins such as GPx.

79 Normal pregnancy is accompanied by a high metabolic demand and elevated
80 requirements for tissue oxygen, which results in increased oxidative stress (8). If
81 oxidative stress is a risk of pregnancy, then the mother's diet (specifically, the intakes of
82 antioxidants, polyunsaturated fatty acids and other unknown beneficial radical
83 scavenging compounds) may play a role in modifying that process. The Salmon in
84 Pregnancy Study (SiPS) is the first intervention trial with oily fish, rich in *n*-3 long
85 chain-polyunsaturated fatty acids (*n*-3 LCPUFA), during pregnancy, and focuses on
86 pregnant women whose offspring are at high risk of developing atopic diseases (6).
87 Epidemiological data suggest that early exposure to oily fish (*e.g.* during pregnancy or
88 infancy) is associated with lower risk of atopy and allergic disorders in children (5).
89 However, LCPUFAs are susceptible to peroxidation due to their high degree of
90 unsaturation. Therefore, increased dietary consumption of *n*-3 LCPUFA might enhance
91 oxidative stress with potential untoward effects during pregnancy. Thus, the hypothesis
92 of the present study was that the consumption of two portions of salmon per week

García-Rodríguez *et al.*, 2011

93 during gestation would increase oxidative stress and, in turn, would affect the
94 antioxidant defense system (ADS). Nonetheless, we have recently reported that
95 increased salmon intake did not result into an increased oxidative stress in the same
96 study population (by measurement of F₂-isoprostanes, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
97 and lipid hydroperoxides) (4).

98 Indeed, the aim of this work, part of the SiPS, was to compare the ADS in plasma and
99 erythrocytes of women with and without increased salmon consumption from week 20
100 of pregnancy. Particularly, we compared the concentration of plasma tocopherols,
101 retinol, β -carotene and CoQ₁₀, as well as glutathione and selenium along with the
102 activities of the key antioxidant enzymes CAT, SOD, GR and GPx in erythrocytes.

104 **Salmon intake and its consequences for the antioxidant defense system**

105 As reported previously (6), the two groups did not differ in age, height, weight or birth
106 weight of offspring or with respect to skin prick test positivity (**Supplementary Table
107 S1**). Further, pregnant women from SiPS increased their intakes of *n*-3 LCPUFA,
108 enhanced their status of EPA and DHA and increased the status of EPA and DHA in
109 their fetuses and neonates, after intake of two portions of salmon per week (6).

110 Erythrocyte antioxidant enzymatic activities and selenium and glutathione levels in
111 pregnant women are shown in **Table 1**. Erythrocyte SOD, CAT and GR activities did
112 not differ between groups. However, GPx activity was significantly higher in the
113 salmon group compared to the control group (P=0.042). Values in the salmon group
114 were higher although not significantly (P=0.409, P=0.087 and P=0.176, at weeks 20, 34
115 and 38, respectively). When erythrocyte GPx activity at baseline (*i.e.* week 20), was
116 used as a covariate, GPx activity tended to be higher in the salmon group (P=0.063).

117 Unlike other dietary factors, intakes of oily fish and indeed of *n*-3 LCPUFA were by

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 118 chance slightly, but significantly, different between groups at baseline (6). Erythrocyte
4
5 119 selenium concentration was significantly higher in the salmon group compared to the
6
7 120 control group ($P < 0.001$). Comparison between groups at 20, 34 and 38 weeks of
8
9 121 gestation showed significant differences for selenium, with values in the salmon group
10
11 122 being higher ($P = 0.042$, $P < 0.001$ and $P = 0.018$, respectively). When week 20 selenium
12
13 123 concentration was used as a covariate, significant differences between groups were
14
15 124 retained ($P = 0.001$). Erythrocyte glutathione (reduced, oxidized, and total) concentrations
16
17 125 were similar between groups. Erythrocyte GPx and GR activities along with selenium
18
19 126 and glutathione (reduced, oxidized and total) concentrations increased significantly
20
21 127 during pregnancy (P ranging between < 0.001 and 0.029), while SOD and CAT
22
23 128 activities did not change.

24
25
26
27 129 Plasma retinol, α - and γ -tocopherol, β -carotene and CoQ₁₀ levels in pregnant women
28
29 130 are shown in **Table 2**. Plasma retinol was significantly higher in the salmon group
30
31 131 compared to the control group ($P = 0.002$). Significant differences were found between
32
33 132 groups at weeks 34 and 38 for retinol, with higher values in the salmon group ($P = 0.032$
34
35 133 and 0.003 , respectively). Significant differences between groups were retained when
36
37 134 week 20 retinol was used as a covariate ($P = 0.008$). None of the other non-enzymatic
38
39 135 antioxidants analyzed differed significantly between groups. During pregnancy, α - and
40
41 136 γ -tocopherol, retinol, β -carotene and CoQ₁₀ (oxidized, reduced and total) decreased
42
43 137 significantly (P ranging from 0.002 to < 0.001).

44
45
46
47 138 No interactions were seen for any of the parameters determined when group and time
48
49 139 effects were analyzed together.

50
51
52 140

53
54 141 Erythrocyte SOD, CAT, GR and GPx activities together with glutathione
55
56 142 concentrations, remained similar after salmon supplementation, although activation of
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 143 these protective systems may occur by LCPUFAs (1). A difference in selenium
4
5 144 concentration was seen between groups at baseline, due the fact that oily fish intake was
6
7 145 by chance slightly, but significantly different, between groups at week 20 (6). However,
8
9
10 146 we also found significantly higher erythrocyte selenium concentrations in the salmon
11
12 147 group in mid pregnancy, reflecting an effect of salmon intake on selenium
13
14 148 concentration. This elevated selenium plasma level might be an underlying factor to the
15
16 149 increase observed for GPx activity in the salmon group, despite not being significant.
17
18
19 150 Dietary selenium intake or supplementation has been related to higher antioxidant
20
21 151 enzymatic activity and lower lipid peroxidation. In contrast, selenium deficiency leads
22
23 152 to a decline in tissue levels of selenium-dependent antioxidant enzymes and thereby
24
25 153 oxidative stress conditions develop (9). Several authors have indicated that
26
27 154 supplementation with *n*-3 LCPUFA enhanced oxidative stress at dietary intakes higher
28
29 155 than that contained in the fish supplied in our study (the equivalent of about 500
30
31 156 mg/day). In this way, Filaire *et al.* (3) observed that *n*-3 LCPUFA supplementation
32
33 157 increased oxidative stress; however, it decreased when antioxidants were added in
34
35 158 combination with *n*-3 LCPUFAs. In fact, as mentioned earlier, we did not find increased
36
37 159 oxidative stress in our study population after salmon supplementation (4). Together with
38
39 160 *n*-3 LCPUFA, oily fish supplies antioxidants, which may prevent increased oxidative
40
41 161 stress after increased fish intake in pregnant women. In the present study, plasma
42
43 162 vitamin E levels were similar in both control and salmon-supplemented groups. Since
44
45 163 vegetable oils are the main source of vitamin E, the quantity of this vitamin provided by
46
47 164 fish was relatively small. A similar behavior to vitamin E was found for β -carotene,
48
49 165 without differences between groups. Beta-carotene is the precursor of retinol, essentially
50
51 166 important for growth and development of cells and tissues. Plasma retinol concentration
52
53 167 was significantly higher in the salmon group compared to the control group despite
54
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

168 retinol concentration was also different between groups at baseline (6). The higher
169 retinol plasma concentration in the salmon-supplemented group might be explained as a
170 consequence of intake of salmon, since this fish is known to be rich in retinol. CoQ₁₀
171 levels were not affected by salmon intake. Therefore, *n*-3 LCPUFA may have both pro-
172 oxidant and antioxidant properties depending on experimental conditions, dosage and
173 the antioxidant contents of the background diet and of supplements provided.

174

175 Another important finding of this study was that erythrocyte GPx and GR activities
176 along with glutathione and selenium concentration increased significantly in mid and
177 late pregnancy. Besides, SOD and CAT activities were not different across the three
178 time points studied. Information concerning the changes of these enzymes during
179 normal pregnancy is conflicting and scarce. According to our results, it seems that GPx
180 and GR enzymes have a major role in the elimination of blood peroxides generated
181 during pregnancy. The enhanced maternal components of the ADS observed in our
182 study population, suggests a response of the antioxidant defenses to pregnancy-induced
183 increases in oxidative stress (8). Our results also showed a significant decrease in all
184 plasma non-enzymatic antioxidant concentrations beyond week 20 of pregnancy. This
185 decline has been reported by others (7) and might be an indication of a higher level of
186 oxidative stress towards the end of gestation as well as the increased maternal blood
187 volume. The role of retinol and its metabolites in reproduction and embryonic
188 development have been clearly established (2), and low cord and maternal serum retinol
189 have been associated with poor vitamin A status, which in turn may affect fetal growth.
190 The decline in plasma retinol levels during late pregnancy may reflect its enhanced
191 transfer to and utilization by the fetus. Preservation of fetal retinol levels at the expense

García-Rodríguez *et al.*, 2011

192 of a decline on the maternal side is of pivotal importance for appropriate pregnancy
193 outcome and increased consumption of salmon could contribute to it.

194

195 **Concluding remarks and future directions**

196 Under the conditions of the SiPS, our findings lead to the conclusion that increased
197 consumption of salmon may raise selenium and retinol concentrations in pregnant
198 women, with a concomitant increase in GPx and GR activities and selenium and
199 glutathione concentrations, throughout pregnancy. This elevation in antioxidant
200 defenses might be helpful to prevent and/or reduce additional oxidant stress during
201 pregnancy. However, the influence of *n*-3 LCPUFA supplementation is still
202 controversial and further research is needed to explore how fish and their *n*-3 PUFAs
203 may affect oxidative stress.

204

205 **Innovation**

206 Marine *n*-3 fatty acids may increase oxidative stress. The Salmon in Pregnancy Study
207 provided two meals of salmon per week to pregnant women from week 20 of gestation
208 until parturition. An increase in antioxidant defenses was observed compared with a
209 control group of pregnant women consuming their habitual diet.

210

211 **Notes**

212 **Subjects and methodology**

213 ***Subjects***

214 The study design, the subjects and their characteristics, aspects of their diet, and their
215 compliance have been described in detail elsewhere (6, **Supplementary Table S1**). **The**
216 **SiPS is a single-blind, randomized, controlled trial of increased consumption of farmed**

García-Rodríguez *et al.*, 2011

217 salmon by pregnant women from week 20 of gestation until the end of their pregnancy.
218 **Supplementary Figure S1** shows the progress of women through the study. In brief, a
219 total of 123 pregnant women in the area of Princess Anne Hospital (Southampton, UK)
220 were enrolled in the study. Inclusion criteria were aged 18 to 40 y; < 19 weeks
221 gestation; healthy uncomplicated singleton pregnancy; baby at risk of atopy (one or
222 more first degree relatives of the baby affected by atopy, asthma or allergy by self
223 report); consuming < 2 portions of oily fish per month excluding tinned tuna; not using
224 fish oil supplements currently or in the previous 3 months. All procedures were
225 approved by the Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee
226 (07/Q1704/43). The study was conducted according to the principles of the Declaration
227 of Helsinki and all women gave written informed consent. The SiPS is registered at
228 www.clinicaltrials.gov (NCT00801502).

230 ***Study design***

231 Recruited women were randomly assigned to one of two groups; randomization was
232 according to a random number table. Women in the control group (n=61) were asked to
233 continue their habitual diet and women in the salmon group (n=62) were asked to
234 incorporate two portions of farmed-salmon (150 g/portion) into their diet per week from
235 study entry (week 20) until they gave birth. Farmed salmon for use in the SiPS was
236 raised using dietary ingredients selected to contain low levels of contaminants. Each
237 150 g salmon portion contained (on average) 30.5 g protein, 16.4 g fat, 0.57 g EPA,
238 0.35 g DPA, 1.16 g DHA, 3.56 g total *n*-3 PUFA, 4.1 mg α -tocopherol, 1.6 mg γ -
239 tocopherol, 6 μ g vitamin A, 14 μ g vitamin D₃, and 43 μ g selenium. Thus, two portions
240 of salmon per week would typically provide 3.45 g EPA + DHA, 28 μ g vitamin D₃ and
241 86 μ g selenium. Contaminants contributed < 12.5% of the FAO/WHO provisional

García-Rodríguez *et al.*, 2011

242 tolerable weekly intake for dioxin and dioxin-like PCBs, < 11.5% for arsenic, <
243 0.00000008% for cadmium, 0.0000025% for mercury and < 0.00000002% for lead.

244 Fifteen subjects were not able to complete the study for various reasons (delivery
245 before appointment, cancelled because of feeling tiredness, busy or some sort of
246 injury), leaving a total of 54 subjects in the control group and 54 subjects in the salmon
247 group. As reported previously (6), the two groups did not differ in age, height, weight
248 or birth weight of offspring or with respect to skin prick test positivity (**Supplementary**
249 **Table S1**). No adverse events or negative health effects were observed or reported
250 during this study.

251 Fasting maternal venous blood samples for the laboratory analyses were collected at
252 week 20 of gestation, before the intervention started, at week 34 and at week 38. After
253 centrifugation, aliquots of plasma and washed erythrocytes were frozen immediately
254 and stored at -80°C until analyzed. Women also completed a 100-item food frequency
255 questionnaire (FFQ) covering food intake over the preceding twelve weeks.

257 *Analytical procedures*

258 *Determination of enzymatic antioxidant activities*

259 Erythrocyte CAT, SOD and GR activities were assayed spectrophotometrically and
260 expressed as nmol/(l·g Hb), U/mg Hb and U/g Hb, respectively. Erythrocyte GPx
261 activity was determined spectrophotometrically by the coupled enzyme procedure with
262 tert-butyl hydroperoxide as substrate and is expressed as U/g Hb. Haemoglobin
263 concentration in the blood samples was determined spectrophotometrically by the
264 colorimetric cyanmethemoglobin method, using Sigma Diagnostic reagents.

266 *Determination of non-enzymatic antioxidant concentrations*

García-Rodríguez *et al.*, 2011

267 Plasma concentrations of α - and γ -tocopherol, retinol and CoQ₁₀ were determined by
268 high pressure liquid chromatography coupled to an electrochemical detector (HPLC-
269 EC), after extraction with 1-propanol. β -carotene was also determined after extraction
270 with 1-propanol in a HPLC system attached to a multi-wavelength ultraviolet detector
271 set at 450 nm. All compounds were identified by predetermining the retention times of
272 individual standards. As all of them are lipid soluble, concentrations are given by ml of
273 plasma and in relation to total plasma lipids.

274

275 Plasma triacylglycerols, phospholipids and total cholesterol were measured
276 spectrophotometrically using commercial enzymatic assay kits from Spinreact (Girona,
277 Spain) (*Triglycerides*, Ref. 1001311, *Phospholipids*, Ref. 1001140; *Total cholesterol*,
278 Ref. 1001091), according to the manufacturer's protocols and the results were
279 standardized using standard solutions for triacylglycerols, phospholipids and total
280 cholesterol calibration.

281

282 Erythrocyte selenium was determined by inductively-coupled plasma mass
283 spectrometry on an Agilent 7500 ICPMS. Selenium (⁷⁸Se) concentration in red blood
284 cell samples was calculated using an external standard calibration. Frozen RBC were
285 thawed and aliquots of ~0.5 g were weighed. Selenium is expressed as $\mu\text{g Se/kg RBC}$.

286

287 Erythrocyte glutathione content was measured by HPLC with fluorescence detection at
288 420 nm, and is expressed as $\mu\text{mol/g Hb}$.

289

290 ***Statistical analysis***

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 291 Results are given as mean \pm standard error of mean (SEM). Conformity to a normal
4
5 292 distribution was examined using the Kolmogorov-Smirnov test. It was calculated that a
6
7 293 sample size of 50 women per group would have 93% power with a type I error of alpha
8
9 294 <0.05 . Differences for each variable between treatment groups over time were evaluated
10
11 295 using a general linear model of variance for repeated measures. *A posteriori* Bonferroni
12
13 296 tests were performed to evaluate specific differences within groups between the
14
15 297 considered gestational periods. When initial values were different, the statistical
16
17 298 analyses were corrected using baseline values as a covariant. Mean comparisons for
18
19 299 GPx, selenium and retinol at each gestational period were determined by a posteriori
20
21 300 Bonferroni tests. All statistical analyses were performed with the Statistical Package of
22
23 301 Social Science (SPSS) 15.0 for Windows. P-values <0.05 were considered statistically
24
25 302 significant.

26
27
28
29 303 (A fully referenced methodology may be view as supplemental text online)
30
31
32 304

33
34 305 **Acknowledgments:** This study was supported by the European Union Commission
35
36 306 under Framework 6: Sustainable aquafeeds to maximize the health benefits of farmed
37
38 307 fish for consumers (AQUAMAX; FOOD-CT-2006-16249) and the Swedish Society of
39
40 308 Medical Research. The authors thank the staff and volunteers who assisted with this
41
42 309 study. We gratefully acknowledge the technical contribution from Maria Borja and
43
44 310 Laura Campaña. Cruz E. Garcia-Rodriguez is the recipient of a fellowship from the
45
46 311 Spanish Ministry of Education.
47
48

49 312
50
51 313 **Conflict of interest statement:** None of the authors has any personal or financial
52
53 314 conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the
54
55 315 paper.
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 316 **List of abbreviations**

4
5 317 Antioxidant defense system (ADS); catalase (CAT); coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀); DL-
6
7 318 dithiothreitol (DTT); docosahexaenoic acid (DHA); eicosapentaenoic acid (EPA);
8
9 319 glutathione reductase (GR); glutathione peroxidase (GPx); high pressure liquid
10
11 320 chromatography coupled to an electrochemical detector (HPLC-EC); hydrogen peroxide
12
13 321 (H₂O₂); metaphosphoric acid (MPA); *n*-3 long chain-polyunsaturated fatty acid (*n*-3
14
15 322 LCPUFA); *ortho*-phthalaldehyde (OPA); oxidized glutathione (GSSG); reactive oxygen
16
17 323 species (ROS); red blood cell (RBC); reduced glutathione (GSH); reduced nicotinamide
18
19 324 adenine dinucleotide phosphate (NADPH); Salmon in Pregnancy Study (SiPS);
20
21 325 superoxide dismutase (SOD).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

References

1. Arab K, Rossary A, Flourie F, Tourneur Y, Steghens JP. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gammaglutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr* 2006 ; 95(1): 18-26.
2. Clagett-Dame M, DeLuca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 347-381.
3. Filaire E, Massart A, Rouveix M, Portier H, Rosado F, Durand D. Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids and antioxidant mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(8): 1829-1839.
4. García-Rodríguez CE, Helmersson-Karlqvist J, Mesa MD, Miles EA, Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda S, Diaper ND, Godfrey KM, Calder PC, Gil A, Basu S. Does increased intake of salmon increase markers of oxidative stress in pregnant women?-The Salmon in Pregnancy Study. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(11): 2819-2823.
5. Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Diaper ND, Miles EA, Calder PC. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega 3-fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41(1): 36-66.
6. Miles E, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, Garcia E, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.

García-Rodríguez *et al.*, 2011

7. Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F₂-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free Radic Res* 2009; 43(6): 546-552.
8. Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(3): 324-328.
9. Tara F, Maamouri G, Rayman MP, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, Yazarlu O, Ouladan S, Tavallaie S, Azimi-Nezhad M, Shakeri MT, Boskabadi H, Oladi M, Sangani MT, Razavi BS, Ferns G. Selenium supplementation and the incidence of preeclampsia in pregnant Iranian women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010; 49(2): 181-187.

Table 1. Erythrocyte antioxidant enzymatic activities and selenium and glutathione levels in pregnant women consuming their habitual diet (Control) or consuming salmon twice per week (Salmon).

	Group						P Value		
	Control (n=54)			Salmon (n=54)			Source of variation		
	20 weeks	34 weeks	38 weeks	20 weeks	34 weeks	38 weeks	Group (G)	Time (T)	Interaction (G x T)
<i>CAT</i> (nmol/l · g Hb)	2.96 ± 0.14	2.70 ± 0.12	2.85 ± 0.13	2.83 ± 0.11	2.99 ± 0.16	2.98 ± 0.13	0.345	0.904	0.156
<i>SOD</i> (U/mg Hb)	1.46 ± 0.09	1.42 ± 0.11	1.46 ± 0.13	1.38 ± 0.10	1.33 ± 0.10	1.43 ± 0.11	0.867	0.058	0.875
<i>GR</i> (U/g Hb)	2.70 ± 0.13	2.87 ± 0.14	3.30 ± 0.24	2.74 ± 0.13 ^a	2.91 ± 0.12 ^a	3.36 ± 0.23 ^b	0.634	0.008	0.973
<i>GPx</i> (U/g Hb)	445 ± 21 ^{ab}	407 ± 21 ^a	515 ± 34 ^b	479 ± 19 ^a	456 ± 26 ^a	578 ± 34 ^b	*0.042	<0.001	0.740
<i>Selenium</i> (µg/kg RBC)	119 ± 5 ^a	154 ± 5 ^b	126 ± 4 ^a	135 ± 6 ^a	180 ± 6 ^b	143 ± 6 ^a	*<0.001	<0.001	0.118
<i>GSH</i> (mmol/l)	1.69 ± 0.03 ^a	1.79 ± 0.04 ^b	1.75 ± 0.04 ^{ab}	1.70 ± 0.03	1.78 ± 0.03	1.71 ± 0.05	0.640	0.029	0.409
<i>GSSG</i> (mmol/l)	0.16 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.03 ^b	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.221	0.005	0.320
<i>Total glutathione</i> (mmol/l)	1.85 ± 0.03 ^a	1.97 ± 0.04 ^b	1.99 ± 0.04 ^b	1.90 ± 0.03	1.95 ± 0.03	1.93 ± 0.04	0.882	0.007	0.057

Values are expressed as mean ± SEM. *Statistical significant differences (P<0.05) between groups using a general linear model of variance. When GPx activity and selenium concentration at week 20 were used as a covariate, significant differences between groups were seen only for selenium (P=0.001). Different letters denotes statistical differences between time points within the study groups (P<0.05). CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

Table 2. Plasma retinol, α - and γ -tocopherol, β -carotene and CoQ10 levels in pregnant women consuming their habitual diet (Control) or consuming salmon twice per week (Salmon).

	Group						P Value		
	Control (n=54)			Salmon (n=54)			Source of variation		
	20 week	34 week	38 week	20 week	34 week	38 week	Group (G)	Time (T)	Interaction (G x T)
<i>α-tocopherol</i> (μ M)	29.66 \pm 1.50	27.35 \pm 2.15	26.20 \pm 1.52	28.28 \pm 1.47	26.38 \pm 1.97	25.20 \pm 1.50	0.725	0.178	0.254
<i>γ-tocopherol</i> (μ M)	2.90 \pm 0.19 ^a	2.19 \pm 0.23 ^b	1.56 \pm 0.20 ^b	2.66 \pm 0.17 ^a	2.00 \pm 0.23 ^a	1.39 \pm 0.13 ^b	0.456	<0.001	0.599
<i>β-carotene</i> (μ M)	1.71 \pm 0.15 ^a	1.60 \pm 0.15 ^a	1.46 \pm 0.14 ^b	2.04 \pm 0.14 ^a	2.04 \pm 0.15 ^a	1.72 \pm 0.16 ^b	0.126	<0.001	0.801
<i>Retinol</i> (μ M)	1.06 \pm 0.06 ^a	0.85 \pm 0.04 ^b	0.86 \pm 0.04 ^b	1.20 \pm 0.06 ^a	1.06 \pm 0.06 ^{ab}	1.07 \pm 0.06 ^b	*0.002	0.002	0.861
<i>CoQ₁₀</i> (μ M)	0.44 \pm 0.03 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.25 \pm 0.01 ^c	0.42 \pm 0.03 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.25 \pm 0.02 ^c	0.471	<0.001	0.353
<i>CoQ₁₀H₂</i> (μ M)	1.07 \pm 0.06 ^a	0.95 \pm 0.11 ^{ab}	0.70 \pm 0.08 ^b	0.99 \pm 0.07 ^a	0.84 \pm 0.11 ^{ab}	0.61 \pm 0.06 ^b	0.440	<0.001	0.833
<i>Total CoQ₁₀</i> (μ M)	1.52 \pm 0.08 ^a	1.18 \pm 0.11 ^b	0.95 \pm 0.11 ^b	1.42 \pm 0.10 ^a	1.06 \pm 0.11 ^{ab}	0.87 \pm 0.07 ^b	0.447	<0.001	0.741
<i>α-tocopherol/total lipids</i> (ng/mg)	2993 \pm 158 ^a	2630 \pm 203 ^b	2313 \pm 123 ^b	2985 \pm 150 ^a	2730 \pm 209 ^{ab}	2288 \pm 106 ^b	0.781	0.004	0.169
<i>γ-tocopherol/total lipids</i> (ng/mg)	293 \pm 20 ^a	212 \pm 23 ^b	139 \pm 19 ^b	279 \pm 16 ^a	205 \pm 23 ^a	125 \pm 11 ^b	0.707	<0.001	0.486
<i>β-carotene/total lipids</i> (ng/mg)	221 \pm 20 ^a	198 \pm 18 ^a	164 \pm 17 ^b	272 \pm 18 ^a	263 \pm 20 ^a	200 \pm 18 ^b	0.124	<0.001	0.565
<i>Retinol/total lipids</i> (ng/mg)	72 \pm 5 ^a	56 \pm 3 ^b	51 \pm 2 ^b	86 \pm 4 ^a	72 \pm 4 ^b	67 \pm 4 ^b	*0.001	<0.001	0.859
<i>CoQ₁₀/total lipids</i> (ng/mg)	92 \pm 6 ^a	41 \pm 2 ^b	44 \pm 3 ^b	91 \pm 7 ^a	43 \pm 2 ^b	47 \pm 3 ^b	0.961	<0.001	0.412
<i>CoQ₁₀H₂/total lipids</i> (ng/mg)	219 \pm 14 ^a	186 \pm 21 ^b	127 \pm 16 ^b	209 \pm 16 ^a	175 \pm 23 ^a	114 \pm 11 ^b	0.652	<0.001	0.645
<i>Total CoQ₁₀/total lipids</i> (ng/mg)	311 \pm 19 ^a	229 \pm 22 ^b	171 \pm 17 ^b	299 \pm 21 ^a	221 \pm 24 ^a	161 \pm 13 ^b	0.740	<0.001	0.535

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Values are expressed as mean \pm SEM. *Statistical significant differences ($P < 0.05$) between groups using a general linear model of variance. When retinol at week 20 was used as a covariate, significant differences were retained ($P = 0.008$). Different letters denotes statistical differences between time points within the study groups ($P < 0.05$). CoQ₁₀, coenzyme Q₁₀; CoQ₁₀H₂, reduced coenzyme Q₁₀.

CONFIDENTIAL. For Peer Review only

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1 **Supplementary Data**

3 **Subjects and methodology**

4 The study design, the subjects and their characteristics, aspects of their diet, and their
5 compliance have been described in detail elsewhere (15, **Supplementary Table S1**).

6 The Salmon in Pregnancy Study (SiPS) is a single-blind, randomized, controlled trial of
7 increased consumption of farmed salmon by pregnant women from week 20 of gestation
8 until the end of their pregnancy. All procedures were approved by the Southampton and
9 South West Hampshire Research Ethics Committee (07/Q1704/43). The study was
10 conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and all women
11 gave written informed consent. The SiPS is registered at www.clinicaltrials.gov
12 (NCT00801502).

13 A randomly selected sample of pregnant women (n=689) within the catchment area of
14 the Princess Anne Hospital, Southampton University Hospitals NHS Trust,
15 Southampton, UK received general information about the SiPS when they received their
16 postal invitations to attend the hospital for a routine ultrasound appointment to occur at
17 about week 12 of gestation. Women who expressed an interest in the SiPS (n=383)
18 provided written informed consent at their week 12 appointment to enable screening for
19 habitual consumption of fish and family history of atopy, allergy or asthma (the primary
20 outcome of the SiPS relates to atopy and its manifestations in the babies born to women
21 enrolled in the SiPS). Those women who reported low habitual consumption of oily fish
22 (< 2 portions per month excluding tinned tuna) and a family history of atopy, allergy or
23 asthma (one or more first degree relatives of the baby affected by atopy, asthma or
24 allergy) received a detailed information sheet about the SiPS. Those who remained
25 interested (n=156) were further screened for inclusion into the SiPS. Inclusion criteria

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 26 were aged 18 to 40 y; < 19 weeks gestation; healthy uncomplicated singleton
4
5 27 pregnancy; baby at risk of atopy (one or more first degree relatives of the baby affected
6
7 28 by atopy, asthma or allergy by self report); consuming < 2 portions of oily fish per
8
9
10 29 month excluding tinned tuna; not using fish oil supplements currently or in the previous
11
12 30 3 months. Women fulfilling the inclusion criteria were recruited into the SiPS at their
13
14 31 routine ultrasound clinic at week 19/20 (hereafter referred to as week 20) of gestation if
15
16 32 they remained interested in the study. Women attended this clinic in the fasted state and
17
18 33 provided written informed consent to enable their participation in SiPS. Ultimately, 123
19
20 34 women were recruited (**Supplemental Figure S1**). At this clinic, women provided a
21
22 35 blood sample and a urine sample and completed a 100-item food frequency
23
24 36 questionnaire (FFQ) covering food intake over the preceding twelve weeks (3, 6-8, 16).
25
26
27 37 The recruited women were randomly assigned to one of two groups; randomization was
28
29 38 according to a random number table. Women in one group (n= 61), referred to as the
30
31 39 control group, were asked to continue their habitual diet; women in the salmon group
32
33 40 (n=62) were asked to incorporate two portions of salmon into their diet per week from
34
35 41 study entry until they gave birth.
36
37
38 42 The women attended a clinic at week 32 to 34 of gestation (hereafter referred to as week
39
40 43 34) and at week 38 of gestation, on both occasions in the fasted state. At these clinics
41
42 44 the women provided a blood sample and at week 34 they again completed the FFQ.
43
44 45 **Supplemental Figure S1** shows the progress of women through the study and
45
46 46 **Supplemental Table S1** provides the characteristics of the women and their
47
48 47 pregnancies. There were no differences between the two groups with respect to age,
49
50 48 height and weight at study entry or with respect to skin prick test positivity, as described
51
52 49 previously (15).
53
54
55

56 50 *Salmon*
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 51 Salmon for use in the SiPS were reared at Skretting Aquaculture Research Centre,
4
5 52 Stavanger, Norway. Their diet contained (g/kg): fish meal (298.6), soya concentrate
6
7 53 (141.3), maize gluten (99.5), wheat gluten (29.9), wheat (120.1), Southern Hemisphere
8
9 54 fish oil (132.1), rapeseed oil (132.1), flaxseed oil (33.5), DL-methionine (0.32), L-lysine
10
11 55 (0.9), monocalcium phosphate (5.64), and vitamin and mineral mix (6.25). The dietary
12
13 56 ingredients used were selected to be low in contaminants. Salmon were farmed until
14
15 57 they averaged 4 kg in weight and were then killed; a total of 2280 kg (gutted) of salmon
16
17 58 were produced. They were then filleted into 150 g portions and the fillets frozen
18
19 59 individually in vacuum sealed bags in Norway, from where they were shipped to
20
21 60 Southampton and stored at -30°C until delivery to the women. Women then stored the
22
23 61 fillets in their home freezer until the day of cooking. Detailed nutrient and contaminant
24
25 62 content of sample fillets was determined at the National Institute of Nutrition and
26
27 63 Seafood Research, Bergen, Norway. Each 150 g salmon portion contained (on average)
28
29 64 30.5 g protein, 16.4 g fat, 0.57 g EPA, 0.35 g docosapentaenoic acid (22:5 *n*-3), 1.16 g
30
31 65 DHA, 3.56 g total *n*-3 PUFA, 4.1 mg α -tocopherol, 1.6 mg γ -tocopherol, 6 μ g vitamin A
32
33 66 (sum of all retinols), 14 μ g vitamin D3, and 43 μ g selenium; variance in content of all
34
35 67 nutrients among several analysed portions was < 5% for protein and fat, < 10% for
36
37 68 individual fatty acids, α -tocopherol and γ -tocopherol, and < 20% for vitamin A, vitamin
38
39 69 D3 and selenium. Thus, two portions of salmon per week would typically provide 3.45
40
41 70 g EPA+DHA, 28 μ g vitamin D3 and 86 μ g selenium. Content of contaminants (per 150
42
43 71 g salmon portion) was: 52.5 pg dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls
44
45 72 (PCBs), 0.492 μ g total dichlorodipheyl trichloroethanes, 51 μ g arsenic, 0.15 μ g
46
47 73 cadmium, 3.45 μ g mercury and 0.15 μ g lead. In comparison, wild salmon from the
48
49 74 Pacific Ocean have been reported to have levels of 0.1 to 0.4 pg/g of dioxin and dioxin-
50
51 75 like PCBs (11), which would equate to 15 to 60 pg per 150 g portion, while wild salmon
52
53
54
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

76 from the contaminated Baltic Sea had levels of 3.3 to 17 pg/g of dioxins (12), which
77 would equate to 495 to 2550 pg per 150 g portion. In one study, the dioxin and dioxin-
78 like PCB content of salmon farmed on commercial fish oil was 0.9 to 2.9 pg/g (11),
79 which would equate to 135 to 435 pg per 150 g portion. The contaminants in the study
80 salmon used in the SiPS provided < 12.5 % of the FAO/WHO provisional tolerable
81 weekly intake for dioxin and dioxin-like PCBs, < 11.5% for arsenic, < 0.00000008% for
82 cadmium, 0.0000025% for mercury and < 0.00000002% for lead.

83

84 ***Food frequency questionnaire***

85 The FFQ used to assess the diet of the women was a modification of one validated for
86 use in pregnant women in Southampton (3, 6-8, 16) and included questions of
87 consumption frequency of different types of fish: 'oily fish', 'non-oily fish' (including
88 tinned tuna), 'fish fingers and fish dishes', and 'shellfish'. Categories of consumption
89 frequency were: 'more than once a day', 'once a day', '3-6 times per week', '1-2 times
90 per week', 'once a fortnight', 'once a month', 'once every 2-3 months', 'never'.

91

92 ***Analytical procedures***

93 ***Determination of enzymatic antioxidant activities***

94 Hemoglobin concentration in the blood samples was determined spectrophotometrically
95 by the colorimetric cyanmethemoglobin method (9), using Sigma Diagnostic reagents.

96 *Assay of CAT activity.* Biochemical analysis of CAT (EC 1.11.1.6) activity in
97 erythrocytes was performed as defined by Aebi (1). Briefly, after adjusting hemoglobin
98 concentration of the original sample to 1 g/l (by the method of Drabkin (9)), 10 µl of
99 sample was added to 90 µl of the Buffer C (phosphate buffer 50 mM, pH 7.0) in a 96-
100 well plate. Then, 50 µl of hydrogen peroxide (H₂O₂) 30 mM were added. In the

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 101 ultraviolet range, H₂O₂ shows a continual increase in absorption with decreasing
4
5 102 wavelength. The decomposition of H₂O₂ can be followed directly by the decrease in
6
7 103 absorbance at 240 nm. The blank is prepared with 150 µl of Buffer C. The difference in
8
9 104 absorbance per unit time is a measure of the CAT activity. Enzyme activity was
10
11 105 expressed as nmol/(l· g Hb).

12
13 106 *Assay of SOD activity.* SOD (EC 1.15.1.1) catalyzes the dismutation of the
14
15 107 superoxide radical into H₂O₂. SOD activity was determined by using xanthine and
16
17 108 xanthine oxidase to generate superoxide radicals. These radicals oxidize the
18
19 109 cytochrome c, generating color measured at 450 nm. The presence of SOD competes
20
21 110 with cytochrome c in this reaction with the superoxide radical (14). After adjusting
22
23 111 hemoglobin concentration of the original sample to 1 g/l (9), a previous extraction of
24
25 112 the supernatant was made with ClCH₃ and EtOH. 40 µl of the supernatant were
26
27 113 mixed in 240 µl of reagent A (Ferricytochrome c 50 µM, (Horse heart cytochrome c,
28
29 114 superoxide dismutase-free, Sigma type III), xanthine 1 mM, sodium carbonate buffer
30
31 115 (20 mM pH 10.0), containing 0.1 M EDTA) into a 96-well plate and incubated for 90
32
33 116 s. Then, 20 µl of reagent B (Xanthine oxidase 15 mU/ml) were added and the
34
35 117 absorbance was read at 450 nm during 3 min. One unit of SOD is defined as the
36
37 118 amount of enzyme that reduces a 50% of spontaneous cytochrome. A calibration
38
39 119 curve was prepared with standard solutions of SOD (0.75-15 U/ml). The results were
40
41 120 expressed as U/mg Hb.

42
43 121 *Assay of GR activity.* GR (EC 1.6.4.2) activity was determined by measuring the rate of
44
45 122 reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidation in the
46
47 123 presence of oxidized glutathione (GSSG) (4). After adjusting hemoglobin concentration
48
49 124 of the original sample to 10 g/l (9), 30 µl of sample were added to 205 µl of the GSSG
50
51 125 solution (3.7 mM, Sigma G-4376) in a phosphate buffer 147 mM with 0.47 mM EDTA
52
53
54
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 126 pH 7.2, in a 96-well plate. After an incubation of 5 min at 37°C, 40 μ l of NADPH₂ (2.25
4
5 127 mM) in NaHCO₃ (0.1%) were added. The absorbance was monitored for another 5 min.
6
7 128 In the ultraviolet range NADPH shows a continual increase in absorption with
8
9
10 129 decreasing wavelength which can be followed directly at 340 nm. The blank is prepared
11
12 130 with 30 μ L of water. One unit of enzymatic activity is defined as the amount of GR that
13
14 131 catalyzes the transformation of 1 μ mol of substrate NADPH per min. The results were
15
16 132 expressed as U/g Hb.

17
18 133 *Assay of GPx.* Total activity of GPx (EC 1.11.1.9) was determined by the coupled
19
20 134 enzyme procedure with tert-butyl hydroperoxide as substrate (10). After adjusting
21
22 135 hemoglobin concentration of the original sample to 10 g/l (9), 25 μ l of sample were
23
24 136 added to 125 μ l of phosphate buffer (100 mmol/l, 1mmol EDTA/l, pH 7.4); sodium
25
26 137 azide 0.1 M (500:10); 25 μ l of enzyme glutathione reductase (2.4 U/ml, cat. no. G-4751;
27
28 138 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in phosphate buffer 0.1 M; 25 μ l of GSH 10 mM
29
30 139 (Sigma, G-4251) in phosphate buffer 0.1 M and 25 μ l of NADPH₂ (1.25 mM, Sigma,
31
32 140 N-1630) in NaHCO₃ (0.1%) in a 96-well plate, which was incubated 3 min at 37°C.
33
34 141 Then, 25 μ l of tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH, 12 mM) in water were added as start
35
36 142 reagent. The absorbance was monitored for another 5 min. The non-enzymatic reaction
37
38 143 rate is correspondingly assessed by replacing the enzyme sample by buffer. In the
39
40 144 presence of glutathione reductase and NADPH, the oxidized glutathione is immediately
41
42 145 converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. The
43
44 146 decrease in absorbance at 340 nm was measured at 37°C. One unit of enzymatic activity
45
46 147 is defined as the amount of GPx that catalyzes the transformation of 1 μ mol of substrate
47
48 148 NADPH per min. The results were expressed as U/g Hb.
49
50
51
52
53
54
55

56 150 ***Determination of non-enzymatic antioxidant concentrations***
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 151 CoQ was assayed by high pressure liquid chromatography-electrochemical detection
4
5 152 (HPLC-EC), following Battino *et al.* (2). The HPLC system consisted of a Beckman
6
7 153 System Gold 125 pump (Beckman Instruments, Fullerton, CA), a Water 717 plus
8
9 154 autosampler (Milford, MA, USA), and a stainless-steel column (15 cm long and 4.6 mm
10
11 155 I.D.) packed with 3mm ODS Supelcosil, an ESA Coulochem III electrochemical
12
13 156 detector, a model 5020 guard cell and a model 5011 analytical cell. Chromatograms
14
15 157 were integrated using the Gold Beckman System. The mobile phase consisted of 20 mM
16
17 158 lithium perchlorate, 10 mM perchloric acid, 20 % ethanol, 80 % methanol at 1 ml/min;
18
19 159 electrode 1 was set at -0.50 V, electrode 2 was set at +0.35 V. Briefly, 100 μ l of the
20
21 160 sample were precipitated with 300 μ l of 1-propanol and vortexed for 60 s. After
22
23 161 centrifugation at 11200 g for 10 min in a bench-top centrifuge for Eppendorf vials, 30 μ l
24
25 162 of supernatant was injected into the HPLC. Alpha- and γ -tocopherols were also
26
27 163 analyzed by HPLC-EC, using the same system and column as for coenzyme Q analysis.
28
29 164 The mobile phase consisted of lithium 20 mM perchlorate, 10 mM perchloric acid, 10%
30
31 165 purified water, 90% acetonitrile at 1.5 ml/min; electrode 1 was set at -0.50 V and
32
33 166 electrode 2 was set at +0.40 V. Next, 100 μ l of sample were precipitated with 300 μ l of
34
35 167 1-propanol, vortexed, and centrifuged as for CoQ. Then, 50 μ l of supernatant was
36
37 168 injected into the HPLC for retinol detection and 15 μ l for tocopherol detection. Beta-
38
39 169 carotene was determined after extraction with 1-propanol and 50 μ l of sample were
40
41 170 injected into a HPLC (Waters 2695) system. Detection of β -carotenes was carried out
42
43 171 with a Nova-Pak[®] C18 Cartridge (4 μ m, 4.6x250mm, Waters) preceded by a Nova-Pak[®]
44
45 172 C18 guard column (4 μ m, 3.9x20mm, Waters), attached to a multiwavelength ultraviolet
46
47 173 detector (996 Diodo, Waters) set at 450 nm. All compounds were identified by
48
49 174 predetermining the retention times of individual standards. As all of them are lipid
50
51 175 soluble, concentrations are given by ml of plasma and in relation to total plasma lipids.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 176 Plasma triacylglycerols, phospholipids and total cholesterol were measured
4
5 177 spectrophotometrically using commercial enzymatic assay kits from Spinreact (Girona,
6
7 178 Spain) (*Triglycerides*, Ref. 1001311, *Phospholipids*, Ref. 1001140; *Total cholesterol*,
8
9
10 179 Ref. 1001091), according to the manufacturer's protocols and the results were
11
12 180 standardized using standard solutions for triacylglycerols, phospholipids and total
13
14 181 cholesterol calibration.

15
16
17 182

18 183 Erythrocyte selenium was determined by inductively-coupled plasma mass spectrometry
19
20 184 on an Agilent 7500 ICPMS, as previously described by Julshamn *et al.* (13). Briefly, 0.5
21
22 185 ml of H₂O₂ and 2 ml of ultrapure nitric acid were added to 0.5 g of red blood cells
23
24 186 (RBC) and the mixture was heated. After cooling, the digested RBCs were diluted to a
25
26 187 volume of 10 ml. The selenium (⁷⁸Se) concentration in the red blood cell samples was
27
28 188 calculated using an external standard calibration. Frozen RBC were thawed and aliquots
29
30 189 of ~0.5 g were weighed. Selenium is expressed as µg Se/kg RBC.

31
32
33
34 190

35
36 191 Erythrocyte GSH content was measured by HPLC with fluorescence detection at 420
37
38 192 nm, as described by Cereser *et al.* (5) and is expressed as µmol/g Hb. Before analysis,
39
40 193 RBC were thawed and lysed in 25 mM phosphate buffer (pH 6). Hemolysate (50 µl)
41
42 194 was immediately treated with 50 µl of 25 mM DL-dithiothreitol (DTT) solution for total
43
44 195 GSH (GSHt) determination by a reduction step and another 50 µl was immediately
45
46 196 treated with 50 µl of 25 mM phosphate buffer for reduced GSH determination. After 5
47
48 197 min at room temperature, 50 µl of 1 mM glutathione ethyl ester as internal standard was
49
50 198 added in both assay. The derivatized samples were deproteinized by adding 850 µl of
51
52 199 6% metaphosphoric acid (MPA) (w/v). Precipitated proteins were removed by
53
54 200 centrifugation (5 min, 10 000 g, 4°C). 100 µl of MPA supernatant were neutralized and
55
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

1
2
3 201 diluted by addition of 300 μ l of 25 mM phosphate buffer (pH 6). 50 μ l of the previous
4
5 202 step were derivatized 15 min at room temperature with 50 μ l of *ortho*-phthalaldehyde
6
7 203 (OPA) solution. Samples were at last neutralized and diluted by addition of 200 μ l of 25
8
9 204 mM phosphate buffer (pH 6). 20 μ l were injected into the HPLC system for GSH
10
11 205 determination. The HPLC separation of GSH–OPA adducts was achieved on an Gemini
12
13 206 C-18 reversed-phase silica column (150*4.60 mm; 5 μ particle size) from Phenomenex
14
15 207 (Le Pecq, France) maintained at 37°C, followed by fluorimetric detection at 420 nm
16
17 208 after excitation at 340 nm. The HPLC system consisted of a Dionex P680 pump
18
19 209 (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France), a Dionex RF2000 fluorescence detector and a
20
21 210 Dionex ASI100 autosampler. Derivatives were eluted using an acetonitrile gradient
22
23 211 from 10% to 50% in a 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6, for 5 min followed by a
24
25 212 tray at 50% of acetonitrile for 5 min. The flow-rate during elution was 0.5 ml per min.
26
27
28
29 213 The column was then re-equilibrated to the initial conditions for 15 min before the next
30
31 214 injection. Integration of chromatograms was accomplished using software Chromeleon
32
33 215 from Dionex (Version 6.80). GSH content were calculated using a standard curve
34
35 216 established under the same conditions. The GSSG concentration was obtained from
36
37 217 subtraction of the GSH from the GSht values.
38
39
40
41
42

219 ***Statistical analysis***

43
44
45 220 Results are given as mean \pm standard error of mean (SEM). Conformity to a normal
46
47 221 distribution was examined using the Kolmogorov-Smirnov test. Differences for each
48
49 222 variable between treatment groups over time were evaluated using a general linear
50
51 223 model of variance for repeated measures. The general lineal model of variance for
52
53 224 repeated measures design test differences between groups (treatment), differences over
54
55 225 the passage of time (time), and interaction of treatment per time. “Repeated measure” is
56
57
58
59
60

García-Rodríguez *et al.*, 2011

226 a term used when the same subjects participate in all conditions of an experiment. This
227 type of design has several advantages. Most important, it reduces the unsystematic
228 variability in the design and so provides greater power to detect effects (17). It has been
229 proven that the *a posteriori* Bonferroni method, as used in the present study to evaluate
230 specific differences within groups between the considered gestational periods, is
231 extremely robust in terms of power, although slightly conservative, and controls alpha
232 error levels regardless of the manipulation (17). Unlike other dietary factors, intakes of
233 oily fish and indeed of *n*-3 LCPUFA were by chance slightly, but significantly, different
234 between groups at baseline (6). Therefore, when differences were detected at baseline, a
235 covariance approach was performed and changes between 20, 34 and 38 weeks for
236 different parameters were determined in both groups. Additionally, mean comparisons
237 for GPx, selenium and retinol at each gestational period were determined by *a*
238 *posteriori* Bonferroni-tests.

239 It was calculated that a sample size of 50 women per group would have 93% power
240 with a type I error of $\alpha < 0.05$. The type I error rate and the statistical power of a test
241 are linked. Therefore, there is always a trade-off. If a test is conservative (the
242 probability of a type I error is small), then it is likely to lack statistical power (the
243 probability of a type II error will be high). Therefore, it is important that multiple
244 comparison procedures control the type I error rate but without a substantial loss in
245 power. The *a posteriori* Bonferroni test, as commented earlier and used in the present
246 study, is the most appropriate test for multiple comparisons, as it controls the type I
247 error rate very well but it provides a good power, particularly when the number of
248 comparisons is small (in our case, three gestational time comparisons within each
249 group). Moreover, the ANOVA for repeated measures is also “more economical”,
250 because fewer subjects are required. Accordingly, it was calculated that a sample size of

García-Rodríguez *et al.*, 2011

251 50 women per group would have 93% power with an alpha error of 0.05. Therefore, the
252 statistical tests performed are likely able to detect an effect if it actually exists ($P < 0.05$),
253 with a relatively low type II error beta ($P = 0.07$).

254 All statistical analyses were performed with the Statistical Package of Social Science
255 (SPSS) 15.0 for Windows. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

García-Rodríguez *et al.*, 2011

Supplementary References

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
2. Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q9, coenzyme Q9H2, coenzyme Q10, coenzyme Q10H2, and vitamin E with a simplified on-line solid phase extraction. *Methods Enzymol* 2004; 378: 156-162.
3. Borland SE, Robinson S, Crozier, SR, Inskip HM & SWS Study Group. Stability of dietary patterns in young women over a 2-year period. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(1): 119-126.
4. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-490.
5. Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, Garcia I, Boget S, Parvaz P, Revol A. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 752(1): 123-132.
6. Crozier SR, Inskip HM, Godfrey KM, Robinson SM. Dietary patterns in pregnant women: a comparison of food-frequency questionnaires and 4 d prospective diaries. *Brit J Nutr* 2008; 99(4): 869-875.
7. Crozier SR, Robinson SM, Borland SE, Inskip HM & SWS Study Group. Dietary patterns in the Southampton Women's Survey. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(12): 1391-1399.
8. Crozier SR, Robinson SM, Godfrey KM, Cooper C, Inskip HM. Women's dietary patterns change little from before to during pregnancy. *J Nutr* 2009; 139(10): 1956-1963.

García-Rodríguez *et al.*, 2011

9. Drabkin DL. The standardization of hemoglobin measurement. *Am J Med Sci* 1948; 215(1): 110.
10. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.
11. Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 2004; 303(5655): 226-229.
12. Isoaari P, Hallikainen A, Kiviranta H, Vuorinen PJ, Parmanne R, Koistinen J, Vartiainen T. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers in the edible fish caught from the Baltic Sea and lakes in Finland. *Environ Pollut* 2006; 141(2): 213-225.
13. Julshamn K, Maage A, Norli HS, Grobecker KH, Jorhem L, Fecher P. Determination of arsenic, cadmium, mercury, and lead by inductively coupled plasma/mass spectrometry in foods after pressure digestion: NMKL interlaboratory study. *J AOAC Int* 2007; 90(3): 844-856.
14. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049-6055.
15. Miles E, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, Vasson M-P, Liaset B, Froyland L, Helmersson J, Basu S, Garcia E, Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Gil A, Calder PC. The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.

García-Rodríguez *et al.*, 2011

16. Robinson S, Godfrey K, Osmond C, Cox V, Barker D. Evaluation of a food frequency questionnaire used to assess nutrient intakes in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50(5): 302-308.
17. Field A. *Discovering statistics using SPSS for Windows*, SAGE Publications, London, 2003. Chapter 9, pp. 323-374.

García-Rodríguez *et al.*, 2011

Supplementary Table S1. Characteristics of the women enrolled into the SiPS and of their pregnancies.

	Control		Salmon	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
Age (y)	61	28.4 ± 0.6	62	29.5 ± 0.5
Height (cm)	61	165.6 ± 0.9	62	165.4 ± 0.8
Weight (kg)	61	71.3 ± 2.0	62	67.5 ± 1.6
First pregnancy (n)	61	23	62	27
Skin prick test positive (n)	38	21	48	31
Duration of pregnancy (d)	54	277 ± 2	53	282 ± 1
Mode of delivery (n):	54		53	
Normal vaginal		35		35
Elective section		2		3
Emergency section		7		5
Instrumental		10		10
Birth weight (g)	54	3425 ± 82	53	3449 ± 72
Head circumference at birth (cm)	54	34.7 ± 0.2	53	34.5 ± 0.2
Apgar score at 1 minute	54	8.5 ± 0.2	53	8.5 ± 0.2
Apgar score at 5 minutes		9.1 ± 0.1		9.1 ± 0.1

Values are mean ± SEM, unless otherwise indicated. There were no significant differences between groups.

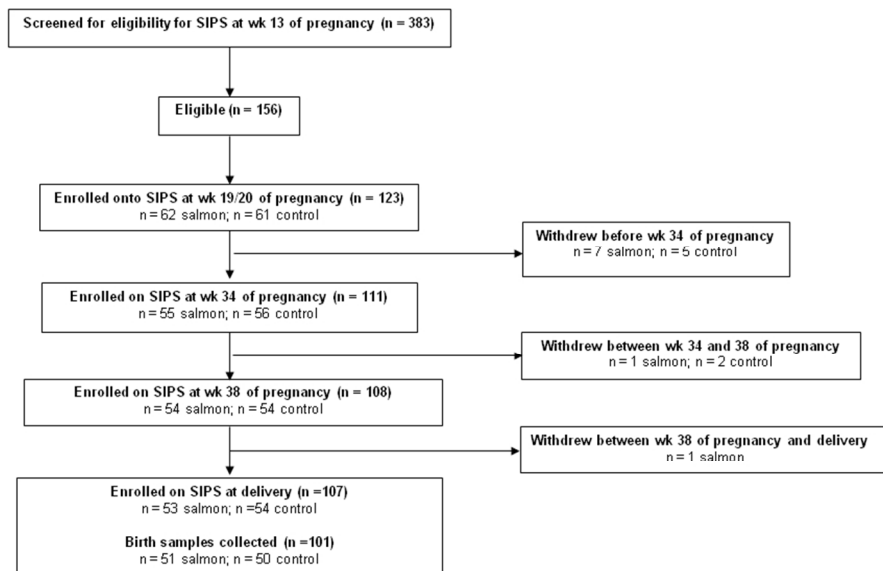
García-Rodríguez *et al.*, 2011

Supplementary Figure S1. CONSORT diagram showing the flow of subjects through the study.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONFIDENTIAL - For Peer Review only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



254x190mm (96 x 96 DPI)

Peer Review only

Artículo IV

THE JOURNAL OF NUTRITION

Official Publication of the American Society for Nutrition

The Journal of Nutrition
NUTRITION/2012/158139
Version 1

Effect of salmon consumption on plasma inflammatory and vascular
homeostasis biomarkers during gestation

CRUZ E GARCIA-RODRIGUEZ, JOSUNE OLZA, CONCEPCION M
AGUILERA, MARIA D MESA, ELIZABETH A MILES, PAUL S
NOAKES, MARIA VLACHAVA, LEFKOTHEA-STELLA KREMMYDA,
NORMA D DIAPER, KEITH GODFREY, PHILIP C CALDER, and
ANGEL GIL

Instructions for Authors: <http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora.xhtml>

Effect of salmon consumption on plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers during gestation^{1,2,3,4}

Cruz E. García-Rodríguez⁵, Josune Olza⁵, Concepción M. Aguilera⁵, María D. Mesa⁵, Elizabeth A. Miles⁶, Paul S. Noakes⁶, Maria Vlachava⁶, Lefkothea-Stella Kremmyda⁶, Norma D. Diaper⁶, Keith M. Godfrey^{6,7,8}, Philip C. Calder^{6,8}, Angel Gil⁵

⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Granada, Spain

⁶Human Development and Health Academic Unit, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom

⁷Southampton Medical Research Council Lifecourse Epidemiology Unit, University of Southampton, Southampton, United Kingdom

⁸Southampton NIHR Nutrition, Diet & Lifestyle Biomedical Research Unit, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, United Kingdom

RUNNING TITLE: Inflammation and Salmon in Pregnancy

AUTHOR LIST FOR INDEXING: García-Rodríguez, Olza, Aguilera, Mesa, Miles, Noakes, Vlachava, Kremmyda, Diaper, Godfrey, Calder, Gil.

WORD COUNT: 4699; NUMBER OF FIGURES: 2; NUMBER OF TABLES: 2;

SUPPLEMENTAL ONLINE MATERIAL: No.

KEYWORDS: omega-3, fatty acids; pregnancy; inflammation; biomarkers; fish oils

¹This study was supported by the European Union Commission under Framework 6: Sustainable aquafeeds to maximize the health benefits of farmed fish for consumers (AQUAMAX; FOOD-CT-2006-16249).

²None of the authors has any personal or financial conflict of interest related to the topic of the article.

³Clinical trials identifier NCT00801502.

*Address correspondence to: erikagr@ugr.es

Cruz E. García-Rodríguez

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (INyTA)

Centro de Investigación Biomédica (CIBM)

Universidad de Granada

Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla

Granada, Spain.

Tel: +34 958 241000 Ext. 20379

Fax: +34 958 819132

⁴Abbreviations used: AA (arachidonic acid), CAM (cell adhesion molecule), EC (endothelial cell), HGF (hepatocyte growth factor), LC *n*-3 PUFA (long chain *n*-3 PUFA), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), NGF (nerve growth factor), sE-selectin (soluble E-selectin), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), SiPS (Salmon in Pregnancy Study), sVCAM-1

(soluble vascular cell adhesion molecule-1), TNF- α (tumor necrosis factor- α), tPAI-1
(total plasminogen activator inhibitor-1).

1 ABSTRACT

2 The Salmon in Pregnancy Study (SiPS) investigated if increased consumption of long
3 chain *n*-3 PUFA (LC *n*-3 PUFA) as farmed Atlantic salmon during pregnancy would
4 affect immune function and atopic disease in the offspring, compared to a habitual diet
5 low in oily fish. In this context, since LC *n*-3 PUFA may lower the concentrations of
6 inflammatory biomarkers, we have investigated whether the consumption of two
7 portions of salmon per week, could affect inflammatory cytokines and vascular
8 adhesion molecule profiles, at different weeks of gestation. Inflammatory biomarkers,
9 namely IL-8, hepatocyte growth factor (HGF) and monocyte chemotactic protein
10 (MCP)-1 levels increased significantly over time of pregnancy ($P < 0.001$), while
11 plasma matrix metalloproteinase (MMP)-9, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and
12 nerve growth factor (NGF) levels were not affected along gestation. The vascular
13 homeostasis biomarkers plasma soluble E-selectin (sE-selectin), soluble vascular
14 adhesion molecule (sVCAM)-1, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and
15 total plasminogen activator (tPAI)-1, increased as pregnancy progressed ($P < 0.001$).
16 Plasma sICAM-1 differed between groups ($P = 0.007$), but no interaction for group and
17 time was seen. The rest of parameters analyzed were similar between groups. Therefore,
18 the inflammatory and vascular homeostasis response, were not affected by increased
19 farmed salmon intake during pregnancy.

20

21

22

23

24

25

26 INTRODUCTION

27 The Salmon in Pregnancy Study (SiPS) is the first intervention trial with oily fish,
28 rich in long chain *n*-3 PUFA (LC *n*-3 PUFA), during pregnancy, and focuses on
29 pregnant women whose offspring are at high risk of developing atopic diseases (1).
30 DHA and EPA, found in oily fish in relatively high amounts, are two biologically active
31 LC *n*-3 PUFAs with multiple well-defined anti-inflammatory effects. Nevertheless,
32 increased consumption of LC *n*-3 PUFAs might result in adverse homeostatic effects
33 due to their potential increased oxidation (2, 3).

34 The pregnant state is exceptional in many ways; there are important metabolic
35 changes and many physiological activities, including the immune system, are modified.
36 These changes impact substantially on carbohydrate and lipid metabolic pathways and
37 also on vascular functions. Early gestation can be viewed as an anabolic state in the
38 mother, with an increase in maternal fat stores and small increases in insulin sensitivity.
39 In contrast, late pregnancy is better characterized as a catabolic state with decreased
40 insulin sensitivity (increased insulin resistance), which results in increases in maternal
41 glucose and FFA concentrations, allowing greater substrate availability for fetal growth
42 (4, 5). Additionally, adipose tissue not only stores maternal calories for the increased
43 energy demands of late pregnancy, but also is an active metabolic tissue playing a key
44 role in an individual's metabolism (6). Adipocytes and their stroma are a rich source of
45 cytokines and inflammatory mediators, as TNF- α or adiponectin, that can both increase
46 or decrease insulin resistance, respectively (7).

47 Increased insulin resistance and changes in lipid profile during pregnancy may
48 have a role in endothelial dysfunction (8). Pregnancy is, in fact, a condition of
49 controlled mild maternal systemic inflammation; nonetheless, the role of adipokines,
50 cytokines or vascular homeostasis biomarkers in modulating the metabolic changes in

51 pregnancy is incompletely understood at this moment, and further studies are justified.
52 *In vitro* studies have shown that EPA and DHA can decrease the expression of cell
53 adhesion molecules (CAM) in cultured cells (9, 10), and recently in human endothelial
54 cells (EC) from umbilical cord (11). In addition, they decrease the production of
55 inflammatory cytokines by these cells (9-11).

56 To our knowledge, there are no human studies that investigated whether dietary
57 LC *n*-3 PUFA affect the plasma profile of inflammatory biomarkers and CAM in
58 pregnant women. Therefore, the aim of the present study, as part of the SiPS, was to
59 compare the plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarker status of
60 women, with and without increased salmon consumption, from week 20 of pregnancy
61 until delivery.

62

63 **METHODS**

64 ***Participants.*** The study design, pregnant women and their characteristics, aspects of
65 their diet, and their compliance have been described in detail elsewhere (1). In brief, a
66 total of $n = 123$ pregnant women in the area of Princess Anne Hospital (Southampton,
67 UK) were enrolled in the study. Inclusion criteria were aged 18 to 40 y; <19 weeks
68 gestation; healthy uncomplicated singleton pregnancy; baby at risk of atopy (one or
69 more first degree relatives of the baby affected by atopy, asthma or allergy by self
70 report); consuming <2 portions of oily fish per month excluding tinned tuna; not using
71 fish oil supplements currently or in the previous 3 months. All procedures were
72 approved by the Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee
73 (07/Q1704/43). The study was conducted according to the principles of the Declaration
74 of Helsinki and all women gave written informed consent. The SiPS is registered at
75 www.clinicaltrials.gov (NCT00801502).

76

77 **Study design.** Recruited women were randomly assigned to one of two groups. Women
78 in the control group ($n = 61$) were asked to continue their habitual diet and women in
79 the salmon group ($n = 62$) were asked to incorporate two portions per week of farmed-
80 salmon (150 g/portion) into their diet, from study entry (20 wk) until delivery. Farmed
81 salmon for use in the SiPS was raised using dietary ingredients selected to contain low
82 levels of contaminants. Each 150 g salmon portion contained (on average) 30.5 g
83 protein, 16.4 g fat, 0.57 g EPA, 0.35 g DPA, 1.16 g DHA, 3.56 g total n -3 PUFA, 4.1
84 mg α -tocopherol, 1.6 mg γ -tocopherol, 6 μ g vitamin A, 14 μ g vitamin D₃, and 43 μ g
85 selenium. Thus, two portions of salmon per week would typically provide 3.45 g EPA +
86 DHA, 28 μ g vitamin D₃ and 86 μ g selenium. Contaminants contributed <12.5% of the
87 FAO/WHO provisional tolerable weekly intake for dioxin and dioxin-like PCBs,
88 <11.5% for arsenic, <0.00000008% for cadmium, 0.0000025% for mercury and
89 <0.00000002% for lead (1).

90 Fifteen women were not able to complete the study for various reasons (delivery
91 before appointment, cancelled because of feeling tiredness, busy or some sort of injury),
92 leaving a total of 54 women in the control group and 54 women in the salmon group at
93 the end of the study (1). No adverse events or negative health effects were observed or
94 reported during this study.

95

96 **Analytical procedures.** Fasting maternal venous blood samples for the laboratory
97 analyses were collected at 20 wk of gestation, before the intervention started, at 34 wk
98 and at 38 wk. After centrifugation, aliquots of plasma were frozen immediately and
99 stored at -80°C until analyzed.

100

101 *Plasma carbohydrate and lipid metabolism biomarkers.* Plasma glucose, TG,
102 phospholipids, total cholesterol and HDL, were measured spectrophotometrically using
103 commercial enzymatic assay kits from Spinreact (Girona, Spain) (*Glucose*,
104 Ref.1001191, *Triglycerides*, Ref. 1001311, *Phospholipids*, Ref. 1001140; *Total*
105 *cholesterol*, Ref. 1001091 and *HDL cholesterol*, Ref. 1001096), according to the
106 manufacturer's protocols. LDL concentrations were calculated using the Friedewald
107 equation (12). Insulin resistance was calculated by the HOMA-IR, as defined by the
108 equation $HOMA-IR = \text{fasting glucose (mg/dl)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) / 405$ (13).

109 *Plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers.* LINCOplex™ kits of
110 human monoclonal antibodies (Linco Research, St Charles, MO, USA) were analyzed
111 on a Luminex® 200™ System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) to determine
112 sICAM-1 (CV: 7.9%), sVCAM-1 (CV: 4.5%), sE-selectin (CV: 11.2%), MMP-9 (CV:
113 6.8%), total PAI-1 (tPAI-1) (CV:11.8%), and adiponectin (CV: 9.2%) (Cat. #HCVD1-
114 67AK), and IL-6 (CV: 7.8%), IL-8 (CV: 7.9%), TNF- α (CV: 7.8%), MCP-1 (CV:
115 7.9%), HGF (CV: 7.7%), NGF (CV: 6.0%), insulin (CV: 5.1%) and leptin (CV: 7.9%)
116 (Cat. #HADK2-61K-B), according to the manufacturer's instructions.

117

118 **Statistical analysis.** Results are given as mean \pm SEM. Conformity to a normal
119 distribution was examined using the Kolmogorov-Smirnov test. Differences for each
120 variable between treatment groups over time were evaluated using a general linear
121 model of variance for repeated measures. When values (20 wk) were different, the
122 statistical analyses were corrected using baseline values as a covariant. *A posteriori*
123 Bonferroni tests were performed to evaluate specific differences between groups for the
124 considered gestational periods. All statistical analyses were performed with the

125 Statistical Package of Social Science (SPSS) 15.0 for Windows. P -values < 0.05 were
126 considered statistically significant.

127

128 **RESULTS**

129 As reported previously (1), the two groups did not differ in age, height, weight or birth
130 weight of offspring or with respect to skin prick test positivity (**Table 1**).

131 **Plasma carbohydrate and lipid metabolism biomarkers.** A significant increase was
132 seen during pregnancy for TG, total cholesterol and LDL concentrations ($P < 0.001$) in
133 both groups, while HDL concentration significantly decreased from 20 wk to 34 wk of
134 pregnancy and increased later at 38 wk ($P < 0.001$). Insulin levels and HOMA-IR
135 significantly increased ($P < 0.001$) at 34 wk and decreased at 38 wk of the gestational
136 period, particularly in the control group. Phospholipids and glucose levels showed no
137 differences along pregnancy. The results of our study showed no statistically significant
138 differences in these biomarker levels between control and salmon groups (**Table 2**).

139 **Plasma inflammatory and vascular homeostasis biomarkers.** During pregnancy, IL-8
140 and HGF concentrations increased significantly with time ($P < 0.001$, **Fig. 1A** and **1E**,
141 respectively), while MCP-1 plasma levels decreased at 34 wk and increased later at 38
142 wk ($P < 0.001$, **Fig. 1D**). IL-6, TNF- α and NGF levels remained fairly constant during
143 gestation (**Fig. 1B, 1C** and **1F**, respectively). Inflammatory biomarkers were similar
144 between salmon and control groups (**Figure 1**).

145 Plasma sICAM-1 concentration significantly increased during pregnancy ($P <$
146 0.001) and was significantly lower in the salmon group compared to the control group
147 ($P = 0.007$, **Fig. 2B**). Comparison between the two groups at 20, 34 and 38 wk showed
148 a trend towards a difference, with values in the salmon group being lower ($P = 0.035$, P
149 $= 0.15$ and $P = 0.018$, at 20, 34 and 38 wk respectively). However, when sICAM-1

150 concentration at baseline (*i.e.* 20 wk) was used as a covariant, the group effect failed to
151 remain significant ($P = 0.69$). In fact, interaction per group and time of gestation was no
152 significant (**Figure 2**).

153 On the other hand, plasma levels of sE-selectin increased significantly through
154 pregnancy, only in the salmon group, despite there were no statistical differences
155 between groups ($P = 0.013$, **Fig. 2A**). Plasma sVCAM-1 and tPAI-1 concentrations
156 increased as pregnancy progressed ($P < 0.001$, **Fig. 2C and 2D**, respectively), without
157 differences between groups. Plasma MMP-9 concentration remained stable throughout
158 pregnancy and did not differ between groups (**Fig. 2E**).

159

160 **DISCUSSION**

161 The most relevant finding of the present study was that plasma inflammatory and
162 vascular homeostasis biomarker patterns were not affected after intake of two portions
163 of salmon per week by pregnant women. Nevertheless, sICAM-1 was lower in the
164 salmon group than in the non-supplemented group from 20 to 38 wk of gestation.

165 Changes observed for plasma glucose, plasma lipids and insulin were consistent with
166 previous reports during pregnancy (4, 6, 8), and no major effects of salmon
167 consumption were detected.

168 The placentation process is accompanied by a complex modulation of the
169 synthesis and degradation of extracellular matrix proteins, adhesion molecules and other
170 factors that control the entire process. Cytokines are locally produced in gestational
171 tissues, and are present in cervico-vaginal and amniotic fluids (14, 15). These molecules
172 play an important role in many stages of pregnancy and labor (14, 15). These events
173 were reflected in maternal plasma by a significantly higher concentration of the
174 chemokine IL-8 as pregnancy progressed, a feature that has been also observed by other

175 author (16). On the other hand, modulation of IL-6 during pregnancy is not well
176 established. While an increase in IL-6 during pregnancy has been reported (17), we
177 found no elevation in plasma levels of this cytokine, as did Makhseed *et al.* (18). In
178 addition, and in agreement with most other studies (17-19), we observed a stable
179 concentration of TNF- α into blood along the third trimester of pregnancy.

180 To our best knowledge, the effect of a LC *n*-3 PUFA enriched diet on plasma
181 cytokine patterns during human pregnancy has not been previously described, although
182 dietary supplementation with LC *n*-3 PUFA in fish oil capsules has shown to decrease
183 their production in some studies in healthy human volunteers (20, 21). Dietary
184 intervention with oily fish in our pregnant women did not show an effect on plasma
185 cytokine profiles. The LC *n*-3 PUFA provided from salmon resulted in an equivalent
186 daily intake of about 500 mg EPA plus DHA/day. Many studies using fish oil
187 supplements provided a much greater amount of these fatty acids.

188 MCP-1, a chemokine attracting leukocytes that infiltrate tissue during
189 inflammation (22), showed a significant increase along pregnancy in both groups of
190 women. Although the behavior of MCP-1 in pregnancy is of interest, few data are
191 available. In addition, there is also limited information on the impact of LC *n*-3 PUFA
192 on MCP-1 levels. Despite the ability of *n*-3 PUFA to modulate the *in vitro* inflammatory
193 response showed previously (23), Ambring *et al.* (24) found no effect on MCP-1
194 response in healthy subjects. Moreover, data are lacking about the impact of *n*-3 PUFA
195 derived from fish on pregnancy. On the other hand, HGF is a chemokine that causes
196 proliferation in various tissues including trophoblasts and thus, it is believe to play a
197 role in implantation and placentation (25). Likewise, it may also have anti-inflammatory
198 actions (26). There have been relatively few reports addressing HGF levels in
199 pregnancy and these have produced conflicting results. HGF levels may either increase

200 during pregnancy (27), or not differ between pregnant women and non-pregnant women
201 (28). As Clarck *et al.* (27), we found a significant increase in HGF concentration during
202 the gestational period in both control and salmon-supplemented groups. Finally, NGF is
203 a classical neurotrophic molecule involved in immune and inflammatory responses,
204 recently described as adipokine (29). In our study, NGF remained constant along
205 pregnancy in both groups of pregnant women. The relationship between NGF,
206 physiological changes in pregnancy and LC *n*-3 PUFA supplementation needs further
207 research, since no data have been published until date.

208 We also found that sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1 and tPAI-1 concentrations
209 were significantly increased during pregnancy, without changes in MMP-9 levels.
210 Soluble E-selectin mediates the initial rolling of leukocytes in primary inflammation. In
211 addition, ICAM-1 and VCAM-1 are up-regulated in immune responses and
212 inflammation and mediate the migration of leukocytes into the EC (30, 31). There is an
213 enhanced endothelial function towards the end of pregnancy, despite of the metabolic
214 and regulatory changes during physiological status (31) that might explain our results.
215 Previous studies have shown that LC *n*-3 PUFAs, as found in oily fish and fish oils,
216 may decrease the expression of adhesion molecules in non-pregnant populations (32).
217 Abet *et al.*, (33) demonstrated a reduction of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin
218 concentrations after 8 weeks supplementation with 2.2 g EPA plus 1.8 g DHA/day in
219 middle-aged hypertryglyceridemic and diabetic men.

220 Increased dietary salmon intake in pregnancy dampens offspring EC activation by
221 LPS in isolated EC from umbilical cord veins collected at birth, as it decreases the
222 ICAM-1 expression in the same population of the present study (11). As stated earlier,
223 sICAM-1 was lower in the salmon group throughout gestation, suggesting that salmon
224 intake contributes to maintain reduced levels of this CAM. The reason plasma

225 concentration of sVCAM-1 was also lower at 20 wk may be due the fact that, even
226 though the women were randomized, we later found that consumption of oily fish was
227 higher in the salmon group at the beginning of the SIPS (1). Nevertheless, effects may
228 be greater with higher doses of LC *n*-3 PUFAs than those used here after salmon
229 supplementation.

230 PAI-1 has been recently described as an adipokine. It acts as an important factor
231 in the maintenance of vascular homeostasis, inhibits the activation of plasminogen and
232 is an acute-phase response protein. Its levels have been described to rise during the
233 inflammatory process (34). In accordance with our results, uncomplicated pregnancy is
234 associated with an increase of PAI-1 (35), and even more profound increases have been
235 reported in complicated gestation (36). On the other hand, the effect of dietary
236 supplementation with LC *n*-3 PUFA on PAI-1 levels is not clear in non-pregnant
237 humans, and conflicting results emerged from the literature, reporting increased (37),
238 decreased (38) or no effect (39). Further, no data of dietary *n*-3 PUFA intervention on
239 PAI-1 levels during pregnancy have been published until now. We have not found any
240 effect of LC *n*-3 PUFA from salmon in this biomarker, which may reflect the biological
241 importance of PAI-1 during gestation. Finally, despite MMP-9 contribution to the
242 degradation of amniotic and chorionic extracellular matrix (40), in the present study,
243 MMP-9 remained stable throughout gestation. In addition, although LC *n*-3 PUFAs are
244 reported to significantly decrease levels of MMP-9 (41), differences between groups
245 have not been detected after supplementation of pregnant women with LC *n*-3 PUFA
246 from oily fish.

247 In conclusion, our findings indicate that plasma inflammatory and vascular
248 homeostasis biomarkers exhibit specific time-dependent profiles over the second half of
249 gestation but they are not affected by increased consumption of salmon.

250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank the staff and volunteers who assisted with this study. Cruz E. Garcia-Rodriguez is the recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Education. PCC, EAM and KMG were responsible for designing the SiPS and had overall responsibility for all aspects of it; AG was responsible for the overall work related to the present paper; MV, L-SK, NDD and PSN recruited and screened volunteers, carried out the intervention, and collected the blood samples and anthropometric, questionnaire, and compliance data; analyses were carried out by JO; data were monitored by MDM and CMA; CEG-R conducted the statistical analysis of the data reported here; CEG-R wrote the draft of the first manuscript, which was revised by MDM, CMA, PCC, and AG. All authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

Literature cited

1. Miles EA, Noakes P, Kremmyda L-S, Vlachava M, Diaper ND, Rosenlund G, Urwin H, Yaqoob P, Rossary A, Farges M-C, *et al.* The salmon in pregnancy study- study design, subject characteristics, maternal fish and marine n-3 fatty acid intake, and marine n-3 fatty acid status in maternal and umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1986S-1992S.
2. Nenseter MS, Drevon CA. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(1): 8-13.
3. Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, Gobert M, Durand D. Effect of 6 weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2010; 20(6): 496-506.
4. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5 Suppl): 1256S-1261S.
5. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50(4): 938-948.
6. Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; 109(2): 419-433.
7. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci* 2009; 16(10): 921-937.
8. Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Cavolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy: association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2002; 25(3): 560-564.

9. Collie-Duguid ES, Whale KW. Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220(3): 969-974.
10. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol* 1997; 400B: 589-597.
11. Van den Elsen LW, Noakes PS, van der Maarel MA, Kremmyda LS, Vlachava M, Diaper ND, Miles EA, Eussen SR, Garssen J, Willemsen LE, Wilson SJ, Godfrey KM, Calder PC. Salmon consumption by pregnant women reduces ex vivo umbilical cord endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(6): 1418-1425.
12. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.
13. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7): 412-419.
14. Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* 2001; 52(1-2): 15-33.
15. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002; 23(4): 257-273.

16. Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1): 21-30.
17. Vassiliadis S, Ranella A, Papadimitriou L, Makrygyannakis A, Athanassakis I. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators Inflamm* 1998; 7(2): 69-72.
18. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49(5): 308-318.
19. Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K, Rice GE. Tumor necrosis factor alpha during human pregnancy and labour: maternal plasma and amniotic fluid concentrations and release from intrauterine tissues. *Eur J Endocrinol* 1994; 131(6): 607-614.
20. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* 1991; 121(4): 547-555.
21. Krauss-Etschmann S, Harti D, Rzehak P, Heinrich J, Shadid R, Del Carmen Ramírez-Tortosa M, Campoy C, Pardillo S, Schendel DJ, Decsi T, *et al.* Nutraceuticals for Healthier Life Study Group. Decreased cord blood IL-4, IL-13 and CCR4 and increased TGF-beta levels after fish oil supplementation of pregnant women. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2): 467-470.
22. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(5): 998-1001.

23. Wang S, Wu D, Lamon-Fava S, Matthan NR, Honda KL, Lichtenstein AH. In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *Br J Nutr* 2009; 102(4): 497-501.
24. Ambrig A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(3): 575-581.
25. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007; 13(2): 121-141.
26. Ito W, Takeda M, Tanabe M, Kihara J, Kato M, Chiba T, Yamaguchi K, Ueki S, Kanehiro A, Kayaba H, *et al.* Anti-allergic inflammatory effects of hepatocyte growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 Suppl 1: 82-87.
27. Clark DE, Salvig JD, Smith SK, Charnock-Jones DS. Hepatocyte growth factor levels during normal and intra-uterine growth-restricted pregnancies. *Placenta* 1998; 19(8): 671-673.
28. Watanabe T, Sakata Y, Matsubara S, Yamagishi T, Nagaike K, Kuwata T, Suzuki M. Changes in plasma levels of hepatocyte growth factor and its associated factors during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(1): 10-14.
29. Trayhurn P, Wood JS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3): 347-355.
30. Madan, JC, Davis JM, Craig WY, Collins M, Alian W, Quinn R, Dammann O. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine* 2009; 47(1): 61-64.

31. Saarelainen H, Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Heiskanen N, Lyyra-Laitinen T, Viikari JS, Vanninen E, Heinonen S. Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. *Circ J* 2006; 70(6): 768-772.
32. Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *Br J Nutr* 2012, *in press*.
33. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, Smith CW, Ballantyne CM. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(5): 723-731.
34. Skurk T, Hauner H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(11): 1357-1364.
35. Coolman M, de Groot CJ, Steegers EA, Geurts-Moespot A, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP, Sweep FC. Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1-2): 22-28.
36. Mori T, Shinohara K, Wakatsuki A, Watanabe K, Fujimaki A. Adipocytokines and endothelial function in preeclamptic women. *Hypertens Res* 2010; 33(3): 250-254.
37. Hansen J, Grimsgaard S, Nordoy A, Bonna KH. Dietary supplementation with highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid does not influence PAI-1 activity. *Thromb Res* 2000; 98(2): 123-132.

38. Junker R, Pieke B, Schulte H, Nofer R, Neufeld M, Assmann G, Wahrburg U. Changes in hemostasis during treatment of hypertriglyceridemia with a diet rich in monounsaturated and n-3 polyunsaturated fatty acids in comparison with a low-fat diet. *Thromb Res* 2001; 101(5): 355-366.
39. Finnegan YE, Howarth D, Minihane AM, Kew S, Miller GJ, Calder PC, Williams CM. Plant and marine derived (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect blood coagulation and fibrinolytic factors in moderately hyperlipidemic humans. *J Nutr* 2003; 133(7): 2210-2213.
40. Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurrò V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(10): 951-958.
41. Shinto L, Marracci G, Bumgarner L, Ladav V. The effects of omega-3 fatty acids on matrix metalloproteinase-9 production and cell migration in human immune cells: implications for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis* 2011; doi: 10.4061/2011/134592.

Table 1. Characteristics of the women enrolled into the SiPS and of their pregnancies¹

	Control		Salmon	
	<i>n</i>		<i>n</i>	
Age, <i>y</i>	61	28.4 ± 0.6	62	29.5 ± 0.5
Height, <i>cm</i>	61	165.6 ± 0.9	62	165.4 ± 0.8
Weight, <i>kg</i>	61	71.3 ± 2.0	62	67.5 ± 1.6
First pregnancy, <i>n</i>	61	23	62	27
Skin prick test positive, <i>n</i>	38	21	48	31
Duration of pregnancy, <i>d</i>	54	277 ± 2	53	282 ± 1
Mode of delivery, <i>n</i> :	54		53	
Normal vaginal		35		35
Elective section		2		3
Emergency section		7		5
Instrumental		10		10
Birth weight, <i>g</i>	54	3425 ± 82	53	3449 ± 72
Head circumference at birth, <i>cm</i>	54	34.7 ± 0.2	53	34.5 ± 0.2
Apgar score at 1 minute	54	8.5 ± 0.2	53	8.5 ± 0.2

Apgar score at 5 minutes	9.1 \pm 0.1	9.1 \pm 0.1
--------------------------	---------------	---------------

¹Values are mean \pm SEM, unless otherwise indicated. There were no significant differences between groups.

Table 2. Plasma levels of carbohydrate and lipid metabolism biomarkers in pregnant women consuming their habitual diet (Control) or consuming salmon twice per week (Salmon).

	Group						P-value		
	Control			Salmon			Source of variation		
	20 wk	34 wk	38 wk	20 wk	34 wk	38 wk	Group (G)	Time (T)	Interaction (G x T)
Glucose, <i>mg/dL</i>	66 ± 14	68 ± 10	64 ± 12	64 ± 9	67 ± 10	66 ± 10	0.687	0.125	0.445
TAG, <i>mg/dL</i>	96 ± 25 ^a	114 ± 31 ^b	133 ± 36 ^c	96 ± 34 ^a	106 ± 31 ^a	125 ± 45 ^b	0.401	<0.001	0.488
Phospholipids, <i>mg/dL</i>	141 ± 24	135 ± 11	135 ± 14	138 ± 19	130 ± 14	133 ± 14	0.108	0.010	0.791
Cholesterol, <i>mg/dL</i>	178 ± 24 ^a	192 ± 25 ^b	221 ± 29 ^c	176 ± 31 ^a	188 ± 29 ^b	210 ± 37 ^c	0.318	<0.001	0.354
LDL, <i>mg/dL</i>	90 ± 24 ^a	112 ± 26 ^b	129 ± 28 ^c	88 ± 31 ^a	109 ± 28 ^b	114 ± 34 ^b	0.158	<0.001	0.105
HDL, <i>mg/dL</i>	69 ± 21 ^a	57 ± 15 ^b	65 ± 16 ^a	69 ± 19 ^a	58 ± 18 ^b	71 ± 19 ^a	0.331	<0.001	0.387
Insulin, μ <i>U/mL</i>	4.79 ± 0.28 ^a	6.64 ± 0.46 ^b	4.81 ± 0.55 ^a	5.12 ± 0.39 ^a	7.11 ± 0.63 ^b	6.76 ± 0.92 ^{ab}	0.223	<0.001	0.421

HOMA-IR	0.73 ± 0.06 ^a	1.14 ± 0.11 ^b	0.78 ± 0.10 ^a	0.80 ± 0.07 ^a	1.18 ± 0.13 ^b	1.06 ± 0.13 ^b	0.279	<0.001	0.243
---------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------	------------------	-------

¹Values are expressed as mean ± SEM, Control group, *n* = 54; salmon group, *n* = 54

²^{a>b>c} Means without a common letter differ, *P* < 0.05.

275 **FIGURE LEGENDS**

276

277 **Figure 1.** Maternal plasma inflammatory biomarker (A) IL-8 (B) IL-6 (C) TNF- α (D)
278 MCP-1 (E) HGF and (F) NGF concentrations in pregnant women consuming their
279 habitual diet (Control) or consuming salmon twice per week (Salmon). Values are mean
280 \pm SEM. ^{a, b, c} Within each graph, means without a common letter differ, $P < 0.05$. HGF,
281 hepatocyte growth factor; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; NGF, nerve growth
282 factor; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

283

284 **Figure 2.** Maternal vascular hemostasis biomarker (A) sE-selectin (B) sICAM-1 (C)
285 sVCAM-1 (D) tPAI-1 and (E) MMP-9 concentrations in pregnant women consuming
286 their habitual diet (Control) or consuming salmon twice per week (Salmon). Values are
287 mean \pm SEM. ^{a, b, c} Within each graph, means without a common letter differ, $P < 0.05$.
288 MMP-9, matrix metalloproteinase-9; sE-selectin, soluble E-selectin; sICAM-1, soluble
289 intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-
290 1; tPAI-1, total plasminogen activator-1.

291

292

293

294

295

296

297

298

299

