



Universidad de Granada

**Efecto de la suplementación materna
con DHA durante la gestación y la
lactancia sobre el estrés oxidativo y el
remodelado óseo materno y neonatal**

Naroa Kajarabille García

Universidad de Granada, Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología.
Granada, 2015.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Naroa Kajarabille García

ISBN: 9788491253891

URI: <http://hdl.handle.net/10481/41668>

JULIO JOSÉ OCHOA HERRERA, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada;

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: *“Efecto de la suplementación materna con DHA durante la gestación y la lactancia sobre el estrés oxidativo y el remodelado óseo materno y neonatal.”*, que presenta Dña. NAROA KAJARABILLE GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: Julio José Ochoa Herrera

En Granada a 20 de octubre de 2015

MAGDALENA LÓPEZ-FRÍAS, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada;

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: *“Efecto de la suplementación materna con DHA durante la gestación y la lactancia sobre el estrés oxidativo y el remodelado óseo materno y neonatal.”*, que presenta Dña. NAROA KAJARABILLE GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: Magdalena López-Frías

En Granada a 20 de octubre de 2015.

JAVIER DÍAZ-CASTRO, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada;

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: *“Efecto de la suplementación materna con DHA durante la gestación y la lactancia sobre el estrés oxidativo y el remodelado óseo materno y neonatal.”*, que presenta Dña. NAROA KAJARABILLE GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: Javier Díaz-Castro

En Granada a 20 de octubre de 2015.

La doctoranda Dña. **NAROA KAJARABILLE GARCÍA** y los directores de la tesis Dr. **JULIO JOSÉ OCHOA HERRERA**, Dra. **MAGDALENA LÓPEZ-FRÍAS** y Dr. **JAVIER DÍAZ CASTRO** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Directores de la Tesis

Doctoranda

Fdo.: **Julio José Ochoa Herrera**

Fdo.: **NarOA Kajarabille García**

Fdo.: **Magdalena López-Frías**

Fdo.: **Javier Díaz Castro**

En Granada a 20 de octubre de 2015.

Nire gurasoei, eman didaten maitasun eta adoreagatik

Agradecimientos

Durante estos años, me han surgido varios momentos de dudas, muchas inquietudes y algunas preocupaciones; pero a la vez ha sido un periodo lleno de experiencias enriquecedoras, tanto a nivel académico y profesional, como personal. Cuando ves el trabajo terminado y haces una reflexión sobre todo el proceso desarrollado, es cuando de verdad valoras todo el esfuerzo realizado. En esos momentos agradeces y te das cuenta de la valiosa ayuda que has recibido durante todo este tiempo de un importante número de personas, sin las cuales todo esto no hubiera sido posible. Por ello, quiero dedicar unas líneas para expresar todo mi agradecimiento por este apoyo recibido.

A mi director Julio José Ochoa Herrera, por estar dispuesto a dirigir esta tesis, pero sobre todo por hacer de mí una Doctora con todas y cada una de las letras. Me ha dado la oportunidad de aprender, y lo que es más importante aún, de aprender a corregir mis errores. Siempre dispuesto a dedicarme su tiempo, y a ofrecerme nuevas oportunidades que me han ayudado a superarme tanto a nivel de profesional como a nivel personal. Gracias por compartir conmigo tu conocimiento y experiencia académica.

A mi codirectora Magdalena López Frías, por su cercanía y amabilidad, porque siempre tiene esas palabras de ánimo y cariño que son tan necesarias. Aún recuerdo a esa chica que entró a tu despacho en busca de una oportunidad, hoy ya Doctora. Gracias por confiar y creer en mí desde un principio.

A mi codirector Javier Díaz Castro, por su ayuda y disponibilidad. Una persona admirable por su dedicación y capacidad de trabajo. Gracias por saber transmitir esos valores y por haber sido uno de los vínculos esenciales que hizo posible que mi estancia en el KCL se convirtiera en una realidad, una de las experiencias más especiales de mi vida por la que te estaré siempre agradecida.

Al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (INYTA-Ugr) y al Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por poner a mi disposición sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.

Al Hospital Universitario Materno-Infantil de las Islas Canarias y al Hospital Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada y en especial a las Doctoras Manuela Peña y Estefanía Martín; así como a las mujeres que dieron su consentimiento para participar en este estudio, pues sin ellas no hubiera sido imposible llevarlo a cabo.

Al King's College London por acogerme durante tres maravillosos meses y en especial a mi supervisora durante la estancia Yemisi Latunde Dada, gracias por compartir tus conocimientos conmigo, por tu paciencia y tu tiempo, y sobre todo gracias por valorar mi esfuerzo y trabajo.

A Lactalis Puleva por la elaboración del producto lácteo utilizado en el estudio.

Al Gobierno Vasco por la beca predoctoral concedida, ya que sin esa ayuda económica esto no hubiese sido posible.

A los profesores del Departamento de Fisiología a los que he tenido el placer de conocer y en especial a: Inmaculada López Aliaga, M^a José Muñoz Alférez, Jose Luis Quiles, Jesús Porres, Miguel Moreno, M^a Dolores Yago, Pilar Aranda y María López Jurado, con los que he compartido asignaturas y he tenido la oportunidad de aprender de todos y cada uno de ellos. También quisiera agradecer a María Carmen Ramírez Tortosa y Margarita Sánchez Campos por su cercanía, consejos y amabilidad, así como a Elisa Alcover y Encarna Rebollo por su ayuda y paciencia.

A los alumnos del grado de Farmacia con los que he compartido aula y experiencia, y en especial a mis alumnos en prácticas: Encarna, Luis, Jose y Edu. Gracias porque junto con vosotros yo también he aprendido y he evolucionado, pero sobre todo gracias por tantos recuerdos.

A mis compañeros de batalla en el laboratorio, porque poder hablar con alguien que te comprende y está pasando por tu misma situación resulta siempre de gran ayuda: Silvia, Nuri, Sergio, Parti, Alicia, Adrián, Alfonso, Mario, Jorge, Emilio y Huayqui.

A esas personas especiales, que por casualidades del destino han aparecido en algún momento clave de la vida para ayudarme: Isabel Salcedo, Miren Duñabeitita, Miguel Lorenzo, Miguel Ángel Contreras, Marijose Lasa, Jose María Ramos, Carmen Lluch, Fátima Olea y Agneta Yngve.

A mis amigos por apoyarme, aconsejarme y estar a mi lado durante todos estos años: Izaskun, por tu sensatez y hacerme ver siempre la realidad; Sheila, mi confidente a tiempo real, la que me escucha y me aconseja con todas y cada una de mis “neuras”; Sergio, por estar siempre ahí, no importa el día o la hora; Nagore, porque contigo ya son muchos los momentos vividos y los recuerdos compartidos; Cristina e Izaskun, porque cuando me junto con vosotras todas las piezas encajan, sin duda estoy y me siento en casa, Aupa Donosti!; Esti, Xusana y Eguz, por estar siempre ahí lo mismo da “para un roto que para un descosido”. Sin duda alguna, quien tiene un amigo, tiene un tesoro.

A mis padres por todo el cariño que me han dado, por apoyarme en todos y cada uno de mis pasos y por ser la fuerza principal en mí vida; porque gracias a vosotros he llegado a ser lo que soy y a estar donde estoy.

El hecho de que acabar una etapa produzca emoción a la vez que tristeza, es un buen indicio de que has sabido aprovechar ese periodo; a lo largo de estos años, he fallado y he aprendido, he crecido y evolucionado, he reído y también he llorado, a veces la situación me ha superado, pero finalmente he conseguido superarme y a hacer frente a los obstáculos. Y lo más importante, todo esto lo he compartido con un inestimable número de personas.

GRACIAS de corazón, a todos y cada uno de vosotros por formar parte de una de las etapas más importantes de mi vida.

***People will forget what you said, people will forget what you did, but people
will never forget how you made them feel.***

-Maya Angelou-

SUMMARY

THE EFFECT OF MATERNAL DHA SUPPLEMENTATION DURING PREGNANCY AND LACTATION ON OXIDATIVE STRESS AND BONE REMODELING IN MOTHERS AND NEONATES

INTRODUCTION

Oxidative stress appears in both the mother and fetus in the early stages of pregnancy because of the role it plays in the development of the placenta. Hypoxia is essential to control oxygen homeostasis, and it is considered essential in early embryonic development, as well as in placental development through the regulation of angiogenesis in human placenta (De Marco & Caniggia, 2002; Mutinati et al., 2014).

However, oxidative stress has also been associated with the pathophysiology of diseases that may develop during pregnancy such as abortions, eclampsia, restricted intrauterine growth retardation (IUGR), and premature membrane rupture (Burton & Jauniaux 2011; Mutinati et al. 2014).

Therefore, the antioxidant defense system is essential to maintain the balance between pro-oxidants and antioxidants (oxidative balance). Thus we analyzed the enzymes of the primary antioxidant defense (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), as well as fat-soluble vitamins, which are major components of the non-enzymatic antioxidant system (α -tocopherol, Coenzyme Q10, β -carotene and retinol).

On the other hand, during pregnancy and lactation key physiological adaptations occur in women, among others we can highlight the changes happening in bone metabolism, such as compensatory mechanisms to ensure the proper mineral development in the fetus and the suitable protection on mother's skeleton (Glerean 2000; Vidal et al., 2008).

Thereby, in early pregnancy osteocalcin levels are comparable to non-pregnant women; during the second trimester those levels decrease and then in the third trimester of pregnancy osteocalcin levels increase. Osteocalcin remains high during the breastfeeding, reflecting the high bone turnover that occurs in the mother, which helps to provide the necessary amount of calcium for skeletal maturation in fetus and the newborn (Glerean, 2000).

After pregnancy during the breastfeeding period, calcium demand increases so that calcium can be concentrated in breast milk. To compensate for the greater demand of calcium, maternal adaptations include both physiological mechanisms, bone resorption and renal calcium reabsorption. These compensatory physiological mechanisms allow, in most cases, to cope with the requirements needed for the formation and mineralization of the fetal skeleton and infant nutrition (Yoon et al. 2000).

The fetal and neonatal skeleton requires a suitable mineral content in order to develop and mineralize appropriately. Both PTH and PTHrP, are essential to maintain high serum levels of calcium and phosphorus in the womb, to carry out an optimal peak bone mineralization. Similarly, endochondral bone development during fetal development requires PTH and PTHrP, but not calcitriol, calcitonin or (probably) sex steroids. It is in the neonatal period when the intestinal absorption of calcium and therefore, skeletal development and mineralization become dependent on vitamin D/calcitriol (Kovacs, 2013). During lactation, most studies have shown an increase in bone remodeling. This can occur partly due to reduced plasma estradiol (P-E2), as well as due to an increase in plasma prolactin and PTHrP during lactation (Møller et al., 2013; Kovacs, 2013).

During childhood, especially during the first years of life, is the time when the phenomena of bone turnover reached a peak intensity. This is manifested by the high levels of serum osteocalcin and propeptide (Kovacs 2011).

Regarding to the link between bone remodeling and oxidative stress, according to evidence there is a correlation between bone metabolism and redox regulation, indicating that reactive oxygen species (ROS) may play an important role because they inhibit forming osteoblasts and therefore bone formation. In addition ROS are involved in homeostasis and cartilage degradation.

ROS, specifically H₂O₂, play a crucial role in osteoclast function and differentiation. ROS increase the number of osteoclasts and thus bone resorption by stimulating RANKL and TNF- α expression through the ERK (extracellular signal regulated kinase) and nuclear factor kappa β (NF- κ β) activation, TNF- α caused cell damage, and it also inhibits SOD (Bai et al. 2005). The RANK-L binds to its receptor, RANK, promoting osteoclast differentiation.

Furthermore, OPG prevents the binding between RANKL and RANK. Alterations in the RANK-RANKL-OPG system due to an increased activity of RANK-L, appear to be related to the pathogenesis of several bone diseases including osteoporosis and inflammatory bone disease. Increased osteoclast activity can lead to increased formation of superoxide anion (O_2^-) generation and/or inhibit the activity of SOD and GPx, with consequent bone destruction (Sheweita & Khoshhal, 2007).

As mentioned before, the RANKL plays a key role in controlling osteoclastogenesis. During this process the inflamed synovial tissue produces a variety of cytokines and hormones which may also influence the activity of osteoclasts. Among these factors we can find: interleukins IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , the Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), and Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (Anandarajah & Schwarz 2006; Barbour et al. 2012).

The role of these cytokines in bone resorption and inflammatory signaling reveals that there might be a correlation between the immune system and bone resorption. According to some studies, T-cells activated after the inflammation process that occurs in rheumatoid arthritis, promote the formation of RANK-L. In fact, it is known that the active T-cells play a central role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, contributing to bone resorption mediated by osteoclasts through the expression of RANKL (Gravallese et al. 2000; Clowes et al. 2005; Barbour et al. 2012).

This study evaluates the effect of maternal supplementation of docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), which has proven to be a major structural component in cell membrane, helping to maintain the adequate fluidity and functionality. It is especially abundant in neuronal tissue and the retina, therefore it is essential for the development of brain and retina in the fetus (Walczewska et al. 2011; De Giuseppe et al. 2014).

During prenatal stage, DHA is provided to the fetus by maternal-fetal transfer across the placenta; after birth, the main source through which the infant gets the DHA is the breast milk. As DHA synthesis is very limited in the newborn, it is essential to ensure the presence and the

adequate concentration of this fatty acid in the mother, so that she can provide the suitable amount for the newborn (Helland et al. 2008; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Omega-3 PUFAs are involved in antioxidant and anti-inflammatory (resolvins mediated) processes. Several placental disorders such as intrauterine growth restriction, preterm labor and premature rupture of membranes (PROM), are associated with inflammatory processes and oxidative stress in the placenta, in this way DHA supplementation has shown beneficial effects on these anomalies (Pietrantonio et al. 2014).

However, DHA is a highly polyunsaturated fatty acid and therefore very susceptible to oxidative stress. For this reason, there is some controversy with several studies showing antioxidant protection of omega-3 LC-PUFA (Mas et al. 2010; Garcia-Rodriguez et al. 2012), while some others report an increase in oxidative damage after this supplementation (Shoji et al. 2009; Boulis et al. 2014).

This link between DHA and oxidative stress is of great importance, since it must be assessed the beneficial effects of this this fatty acid as an antioxidant, vs. the possible effect as an prooxidant which promotes oxidative damage

Pregnancy appears to be accompanied by a high metabolic demand, an increased requirement of oxygen and thus an increased production of free radicals. We observed a higher oxidative stress in pregnant women than in non-pregnant ones, in the same way, in the neonate at birth we observed an elevated oxidative damage (Ochoa et al. 2003 and 2007; Díaz-Castro et al., 2015).

The birth also involves a strong oxidative stress for both, the mother and the newborn. In case of healthy full term newborn, this oxidative stress disappears during the first hours of life. In the premature infants due to several reasons (immaturity of the organs, immature antioxidant system, etc.) oxidative stress is even greater than the observed in full term neonates (Ochoa et al. 2007).

Although the effect of DHA supplementation has been extensively studied on various aspects of pregnancy, childbirth and infant development, the potential effect of this supplementation on oxidative stress observed in newborns and the evolution has not been studied so far.

On the other hand, omega-3 fatty acids might have beneficial effects on bone metabolism regulation. Thus, optimal amounts of n-3 PUFA appear to inhibit bone resorption as they promote bone formation (Griel et al. 2007; Kajarabille et al. 2013).

The mechanism of action of omega-3 fatty acids in the bone is quite complex and its effects can be multifactorial, involving several signaling pathways, cytokines and growth factors. There are several mechanisms by which the omega-3 may regulate bone metabolism, including a decrease in the release of prostaglandin PGE₂, as well as in the most important factor in osteoclast differentiation, the RANKL. In addition, omega-3 fatty acids can modulate several inflammatory cytokines, increase the production of IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and improve the accretion of calcium in bones (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010).

PGE₂ are potent modulators of bone remodeling involved in bone resorption, since they stimulate osteoclastogenesis via the RANK-L. Both processes bone formation and resorption are related to PGE₂ and its effects on the bone can be dose-dependent. Thus, low levels PGE₂ stimulates bone formation through osteoblasts, while high levels suppress osteoblast differentiation and promote bone resorption mediated by osteoclasts via RANK-L (Korotkova et al. 2004; Kruger et al. 2010; Lukas et al. 2011).

It has been shown that inflammatory signals can modulate the OPG/RANK-L system decreasing OPG and increasing RANK levels, thereby producing bone resorption. According to biography, DHA might be beneficial for bone due to its anti-inflammatory actions among others (Martin-Bautista et al. 2010).

BACKGROUND AND AIMS

DHA supplementation during pregnancy and lactation has shown positive effects on different aspects related to the newborn development, such as the association between the maternal DHA intake and the proper cognitive and visual development, underlying the need to ensure a suitable supply to the fetus and infant through an adequate maternal nutrition. However, there are certain aspects of the DHA supplementation related with the development and health of the fetus that have not been studied to date and they could be decisive factors in the early stage of life.

Among these aspects we can find the correlation between DHA supplementation during pregnancy and lactation with respect to bone metabolism and oxidative stress in both the mother and the neonate, where maternal supplementation could play an important role. The controversy mentioned above together with the lack of information in the physiological stages of pregnancy, lactation and postnatal development is what has motivated the development of this work

Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of maternal supplementation with a dairy product enriched with fish oil (320 mg DHA + 72 mg EPA) during pregnancy (last trimester) and breastfeeding on oxidative stress and bone metabolism in both the mother and the full term newborn.

METHODS

This study involved a group of mothers and their healthy term neonates enrolled in a registered, double-blind, controlled, lasting from the sixth month gestation to fourth month of newborn's life. 110 volunteers were recruited into the study from "Hospital Materno-Infantil" (Granada, Spain) and "Hospital Universitario Materno-Infantil" (Canary Islands, Spain). The study was approved by the Bioethical Committee on Research Involving Human Subjects at both Hospitals. Written informed consent was obtained from each participant after a complete explanation of the study details. The study is registered at www.clinicaltrials.gov (Clinical Trial Identifier NCT01947426).

Women were randomly assigned to one of the following intervention groups: Supplemented group: Consumption of 400 ml/day of fish oil enriched dairy drink (320 mg DHA + 80 mg EPA); Control Group: Consumption of 400 ml/day of the control dairy drink. Detailed information on the composition of the dairy drink used during the intervention is given in Table 1.

We supervised the mother's diet during the intervention period. Maternal dietary intake was assessed using a 110-item food frequency questionnaire that included specific questions about consumption of sources of DHA such as freshwater fish, seafood, canned tuna and sardines, salmon, trout, and cod liver oil (Parra-Cabrera et al. 2011) (García-Rodríguez et al.

2012) (Annex I). Together with these questionnaires, nutritional recommendations adapted to the conditions of the mothers (gestation - lactation) were given and especially those related to the suitable consumption of fish (2/3 portions per week as daily sources of EPA+ DHA), something really important from an ethical point of view.

Samples of mother's blood (5 mL) were obtained at the enrollment (28th week of pregnancy) (SM0), at delivery (SM1), at 2.5 months of lactation (SM2) and at the end of the dietetic intervention (four month postpartum) (SM3). After delivery blood samples were collected from the umbilical vein and arteries (SHOV and SHOA, respectively) and at 2.5 months of life a sample of blood from all the neonates was obtained (SH1).

The samples were centrifuged to separate plasma from red blood cell pellets. Erythrocyte cytosolic and membrane fractions were prepared by differential centrifugation according to the method of Hanahan and Ekholm (Hanahan et al., 1974). Samples were stored at -80 °C until analysis.

Oxidative damage in plasma and erythrocyte membrane

Plasma hydroperoxides content was assessed using a commercial kit (Oxystat BI-5007, Biomedica Gruppe, Vienna, Austria). Erythrocyte membranes were assessed using another commercial kit Pierce Quantitative Peroxide Assay Kit, aqueous-compatible formulation (Ref: 23280) (Thermo Scientific, Rockford, USA).

Plasma fat soluble antioxidants and total antioxidant capacity in plasma

Fat soluble antioxidants in plasma were also determined: Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α-Tocopherol), β-Carotene, Coenzyme Q9 and Coenzyme Q10. Samples were mixed with ethanol in polypropylene tubes and left on ice for 10 minutes, then hexane was added, and we left them on ice for 5 minutes. Samples were centrifuged at 2200g for 10 minutes at 4 °C and finally dried in a speed-vacuum. A mixture of ethanol: isopropanol (90:10, v/v) was added to the sample and then analyzed by Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS / MS system. The equipment used was an ACQUITY UPLC H-Class detector coupled to a triple quadrupole Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, USA).

Total plasma antioxidant capacity in plasma samples was measured using a kit (TAS Randox® kit, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK).

Fat soluble antioxidants in erythrocyte membranes and antioxidants enzyme activity

Fat soluble antioxidants in erythrocyte membrane (Vitamin E and Coenzyme Q10) were also determined following the same procedure described above for fat soluble antioxidants in plasma. Determinations of antioxidant enzymes, Glutathione Peroxidase (GPx), Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) in erythrocyte cytosol were measured as previously described by Díaz-Castro et al. (2014).

Bone metabolism biomarkers analysis

Luminex xMAP technology based MILLIPLEX MAP kits were used. Human Bone Panel 1A Millipore (USA) (Cat No. HBNMAG-51K) was used for ACTH, PTH, osteocalcin, osteopontin, OPG, leptin, insulin, TNF- α and IL-6 determination, and MILLIPLEX MAP RANKL Single Plex (Cat No. HBN51k1RANKL) was used for RANKL determination.

Mineral content in erythrocyte cytosol

The concentration of minerals (Ca, Mg, Fe, Cu and Zn) in the cytosolic fractions was determined by atomic absorption spectrophotometry (PerkinElmer AAnalyst 1100B spectrometer with WinLab32 for AA software, Massachusetts, USA). The samples had previously been mineralized by the wet method in a sand bath (J.R. Selecta, Barcelona, Spain), according to the procedure described previously by Diaz-Castro et al., (2008). Phosphorous (P) concentration was analyzed using a commercial kit: Phosphorous-UV SPINREACT (Barcelona, Spain) (Cat. No. MI1001155).

STATISTICAL ANALYSES

The sample size was calculated by detecting a difference in the DHA levels in mothers of 2.26, with a standard deviation of 1.43 and using a potency of 80% and 0.05 of significance level. This calculation indicates the need for 45 mothers, amount increased by 20%, to counteract possible losses and thus obtaining a final sample size of 55 mothers per group. The

results are shown as mean \pm standard error of the Mean (SEM). Kolmogorov-Smirnoff test was performed following normality criteria. Categorical variables were compared using chi-square test. Differences between groups were analyzed with Student-T test for independent samples. Student-T test was also used to compare differences between mothers (SM0, SM1, SM2 and SM3) and newborns (SH0V, SH0A and SH1). To test the differences between parameters determined in different periods of time, in both mothers and newborn, a General Linear Model for repeated measures or ANOVA was used, with a posterior adjustment with Bonferroni for testing the differences between different periods of time. For data analysis we used the SPSS version 20.0 (SPSS Statistics for Windows, 20.0.0. SPSS INC. Chicago, IL, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned above, a noteworthy aspect to consider during pregnancy, labor and postnatal life is the evoked oxidative stress, affecting both the mother and neonate (Ochoa et al., 2003,2007; (Di Nunzio & Bordoni, 2011). Kankofer (2011) reported a maximum peroxides output in mother plasma at delivery and during pregnancy, results which are in agreement with those found in the current study. We have found that plasma hydroperoxides were also elevated in neonates, being similar to those found in the mother during lactation (Figure 22). Omega-3 LC-PUFA supplementation showed a clear beneficial effect on hydroperoxides levels in the newborn, by decreasing them in umbilical cord artery, as well as in the postnatal life of the newborns at 2.5 months. Similarly, we have observed the effect of DHA supplementation in mothers at delivery and postpartum (2.5 and 4 months), and we found that peroxide levels in erythrocyte membrane were also significantly reduced (Figure 23). The decrease in plasma and erythrocyte membrane peroxides content induced by omega-3 LC-PUFA supplementation may be due to the effect of the LC-PUFA on some key factors responsible of free radicals generation and the effect on the antioxidant system in the mother and the newborn.

One of the possible protective mechanisms of the omega-3 LC-PUFA to oxidative stress would underlie in the generating mechanisms of free radicals, including the inflammatory signaling. DHA has an anti-inflammatory effect that appears to be correlated with its inhibiting action on the arachidonic acid (AA) (Pietrantoni et al., 2014). AA is released via selective Ca^{2+} dependent cytosolic phospholipase A2 (IVA cPLA2), however this mechanism

also implies the conversion in eicosanoids, generating free radicals (Vericel et al., 2015). In this sense, we can postulate that a possible antioxidant role of DHA can be attributed to its inhibiting action on the AA/eicosanoids production and to the anti-inflammatory and protective properties of the protectins and resolvins (Pietrantonio et al., 2014). In this sense, Gonzalez-Periz et al. (2006), demonstrated that DHA prevents DNA damage and oxidative stress in liver cells, effect that was associated with a decrease in the hepatic synthesis of n-6-derived eicosanoids, as well as an increase in the generation of protective DHA-derived lipid mediators.

Another aspect to be taken into account is the effect on the antioxidant defense. We have analyzed the plasma antioxidant capacity (Figure 24). Our results showed that the highest antioxidant values were found in mothers during pregnancy and lactation, whereas these levels diminished at delivery. In both groups, the antioxidant capacity is almost double in mothers compared to their neonates. Thereby, the main differences between control and supplemented groups were found in mothers at parturition and in the newborn at 2.5 months of life, although with different behavior. The lower value of total antioxidant capacity found in the mothers supplemented with omega-3 LC-PUFA at the moment of childbirth, together with the lower peroxides level, especially in erythrocyte membrane could indicate a lower need of antioxidants in the supplemented group, probably due to a lower production of free radicals¹ (Yavin 2006; Shoji et al., 2009; Smithers et al., 2011). In this sense, we could also consider a lower transfer of antioxidants to the neonate, explaining the lower content in plasma hydroperoxides found in umbilical cord artery in the fish oil-supplemented group. Newborns are particularly susceptible to oxidative stress for several reasons (Saugstad, 2005). Our results show that omega-3 LC-PUFA supplementation avoids the decrease of antioxidant capacity at 2.5 months of life in newborns and, in addition, this supplementation also reduces peroxide levels in plasma compared with the control (non-supplemented) group.

Regarding to the fat soluble antioxidants in plasma and erythrocyte membrane, in mothers we did not find any significant differences between the control and the fish oil-supplemented group during the last trimester of pregnancy (Figure 25-31) finding which is in agreement with the data from an study carried out with mothers who were supplemented with salmon during pregnancy (García-Rodríguez et al., 2012). In this study, the authors did not observed significant differences for α -tocopherol, β -carotene and CoQ10 in the supplemented

group compared to control. However, retinol levels in plasma were different from those found in our study (Graph 4), since they observed significantly higher retinol concentrations in mothers who were supplemented with two portions of salmon per week during gestation, fact that could be attributed to the great retinol concentration in salmon.

Nevertheless, we found significant differences in plasma and membrane samples at 2.5 months postpartum as well as in umbilical cord artery, suggesting that fish oil-supplementation has positive effects on the neonate, enhancing the antioxidant capacity and reducing the evoked oxidative stress.

After parturition we observed higher of retinol, CoQ9 and α -tocopherol in plasma in the supplemented group at 2.5 months postpartum (Figure 26-27) and β -carotene and CoQ10 at 4th month postpartum (Figure 28-29). In erythrocyte membrane, higher values of CoQ10 were found at delivery and α -tocopherol at 2.5 months postpartum (Figure 30-31). These data suggest a higher fat soluble antioxidant defense in the supplemented mothers, especially after lactation. The result observed for α -tocopherol in plasma at 2.5 months postpartum is interesting. Florian et al. (2004), reported a significant decrease in α -tocopherol levels in plasma at 2.5 months postpartum, which is in agreement with our results, although in the supplemented group this decrease was not observed.

With regard to the newborns, in general, a higher content in retinol, CoQ10 and α -tocopherol (in plasma (Figure 25, Figure 26, Figure 29) and erythrocyte membrane (Figure 30 and Figure 31) was observed in the samples obtained in umbilical cord of the supplemented group. This information indicates, once again, the higher antioxidant defense at the moment of the childbirth in the neonate and this is the moment when the maximum oxidative stress occurs (Saugstad, 2005; Ochoa et al., 2007). In the same way, at 2.5 months of postnatal life, a higher CoQ10 content is observed in the supplemented group. All these findings can be correlated with the results found in plasma peroxides, because fish oil-supplemented group showed a decrease of peroxides in umbilical cord vein and artery, as well as at 2.5 months of newborn's life.

To avoid induced oxidative damage in cells, the antioxidant defense system provides protection and the capacity of this defense system is determined by a dynamic interaction

between individual components, which include fat soluble vitamins and several antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx)). Regarding to our data for antioxidant enzymes, in the supplemented group as well as in the control group, both mothers and their neonates showed similar activity (Figure 32-34). With regard to SOD (Figure 32) we found the highest activity at 4 month postpartum in

mothers and in umbilical cord artery in neonates. In general, the omega 3 LC-PUFA supplementation leads to an increase in the activity of this antioxidant enzyme, though it is only significant at the moment of the delivery in the mother and at 2.5 months of postnatal life in the newborn. Garcia-Rodriguez et al.²³ did not report any differences in the activity of this enzyme due to the maternal supplementation with two portions of salmon during gestation, though this study was only focused in the period before the childbirth and not during the labor, neither in the newborn child. On the other hand, in a study carried out by Garrel et al. (2012), they observed a significant increase in SOD activity in brain of rats that were fed with a diet rich in DHA, during postnatal development.

With regard to CAT (Figure 33), in the fish oil-supplemented group, we observed higher values at 2.5 months postpartum in mothers, as well as at 2.5 months of newborn's life. We did not found significant differences for CAT during pregnancy neither the birth, which is in agreement with the results found by Garrel et al.(2012) and García-Rodríguez et al. (2012).

Regarding to GPx (Figure 34), we found the highest values in both groups after delivery, particularly at 4th month postpartum and the lowest values were observed in the newborns at 2.5 months postpartum. Though a higher activity of this enzyme was observed in the supplemented group in umbilical cord artery and in the newborn at 2.5 months of life, it was just a trend and not statistically significant. García-Rodríguez et al. (2012) found a higher activity GPx in DHA-supplemented mothers with salmon, though this increased activity was associated with the increase in the levels of selenium, due to the high content of this mineral in salmon and it is known the effect of selenium as a cofactor in the activity of this enzyme. In general, it is noteworthy the effect of the mother supplementation with omega-3 LC-PUFA in the newborn child at 2.5 months of life on the enzymatic activity of the complex SOD-CAT, a very interesting finding, due to the importance in the development of the newborn child, because as it has been previously reported, a decrease in the activity of these enzymes

promotes the oxidative damage in proteins and lipids (Slater et al., 1987; Saugstad 2005).

Regarding to the effect of omega-3 LC-PUFA on bone metabolism as well as the effect on mineral content in erythrocyte cytosol, we found a significant increase in PTH during lactation in mothers who were supplemented (Figure 36). PTH is a hypercalcemic hormone, which stimulates osteoclasts, this could be negative for the mother, but on the other hand beneficial to the newborn, as the processes of resorption increases, calcium recovery increases in the kidneys, as well as, intestinal absorption of calcium, which increases calcium content in breast milk. This is consistent with one of the physiological mechanisms described at this stage, where bone resorption increases in order to meet the needs of calcium in the breast milk for the newborn (Glerean 2000; Yoon et al. 2000; Vidal et al. 2008).

Regarding to ACTH (Figure 40), we found maximum values in the supplemented group in mothers at delivery and especially in the fetus in samples of umbilical cord vein. As it is known physiological levels of cortisol do not have deleterious effects on bone formation, but they appear to be necessary for cell differentiation and probably also for the bones (Riancho J.A. 2003), moreover it has been shown that ACTH may stimulate osteoblast proliferation through specific receptors on these cells, which would enhance bone formation (Zhong et al. 2005; Isales et al. 2010). Furthermore, the increase of ACTH, also leads to increased levels of glucocorticoids such as cortisol, which are responsible for the stress response, so that this could improve not only the ability of the newborn to face the challenge of birth and their adaptation to extrauterine environment, promoting the mobilization of energy substrates, the maintenance of blood glucose level and even lung maturity, but also it could help the mother to cope with the stress during labour (Márquez et al., 2005; Raga et al., 2006).

Our results also showed significantly higher OPN values in neonates (Figure 35), which indicates the high bone turnover in the newborn. We observed the effect of supplementation only during childbirth, showing higher values in women who were supplemented with omega-3 LC-PUFA. This could be related to the increased bone resorption in mother in order to concentrate more calcium in breast milk, as it has been described above. On the other hand, this cytokine has also a role as an inflammatory signal, and parturition leads to a significant inflammatory process which can promote an increase in OPN values (Terzidou et al. 201; Chen et al. 2012; Straburzyńska-Lupa et al. 2013).

Regarding to OC (Figure 37) our data showed the greatest values in the newborn, pointing out the high bone turnover, especially bone formation (Manjón 2003). In the case of mothers, we observed a progressive increase, reaching the maximum values at lactation, showing the high bone turnover in the latter period, an increased bone resorption to get more calcium in milk for the newborn as mentioned above. Our data are in agreement with other studies that have also shown higher levels of osteocalcin during lactation (Yoon et al. 2000; Barba 2011).

We observed the effect of the supplementation at delivery in mothers and at 2,5 months of newborn's life, where we found an increase in OC, which promotes neonate's development and bone formation.

Lecke et al. (2011) reported that leptin values decreased in relation to the days of life in newborns, which matches our results, where we observed a very low leptin levels in neonates at 2.5 months. Furthermore, we observed an increase of leptin in umbilical cord blood in newborns whose mothers received the supplementation (Figure 38). According to biography, leptin has a double mechanism on bone metabolism, anyways based on in vivo studies it appears that the peripheral effect which stimulates bone formation is the one that predominates, and which could be beneficial for the neonate (Capellán 2000; Quesada Gomez JM 2006; Williams et al. 2011). So, if we consider that leptin has a potential positive effect on bone remodeling, omega-3 LC-PUFA supplementation could also promote a positive effect in this first stage of life, but perhaps the most interesting effect is it's role on energy balance and which would be enhanced by omega-3 fatty acids.

With regard to insulin (Figure 39), we observed an increase in venous umbilical cord blood in neonates whose mothers received supplementation. In contrast, another study evaluating the influence of a DHA supplementation during pregnancy and lactation, found lower concentration of insulin in umbilical cord blood of newborns whose mothers consumed DHA, compared to placebo (Courville et al. 2011). However, with the data obtained in this study, we cannot draw a conclusion about the effect of omega-3 fatty acids on insulin and bone remodeling.

On the other hand, we found higher levels of RANKL in children at 2, 5 months and during breastfeeding (Figure 41). In mothers highest values were found during lactation compared to pregnancy and childbirth, this could be explained by the high degree of bone remodeling necessary which is needed to concentrate high calcium amounts in breast milk for the neonate. In newborn, this data suggest the high bone turnover during this stage. High levels of RANKL are related to an increased bone resorption, as it leads to osteoclast differentiation and maturation, as well as an inhibition of apoptosis in osteoclasts (Fernández-Tresguerres et al. 2006). One of the proposed mechanisms by which omega-3 fatty acids, and especially DHA, can regulate bone metabolism is the influence on RANKL, inducing a decrease in this parameter which promotes bone resorption (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010). In this way, we found a significant decrease of this parameter in cord blood vein in mothers who were supplemented with omega-3 LC-PUFA, which may lead to a decrease in bone resorption processes.

Regarding to OPG (Figure 42), we found the maximum values in mothers during labour, which might be related to high levels of estrogen, since it is known that this hormone may modify the levels of OPG (Murakami et al. 1998; Takai et al. 1998). This result are related to those shown by Uemura et al. (2002), in which no changes in OPG were detected during pregnancy, but they observed an increase in plasma during at delivery. On the other hand, another research found a gradual increase in OPG during pregnancy together with a decrease in RANKL (Taylor et al., 2003). The source of OPG during pregnancy remains unknown, but its fast decrease at postpartum, the low levels in neonate and the presence of OPG in placental tissue, suggests the placenta may be the source (Sarli et al., 2005). Our omega-3 LC-PUFA supplementation results in increased OPG levels in newborn at birth, showing significantly higher values in arterial cord blood, which could be beneficial for the newborn (Miller 2003; Neyro et al., 2011).

We also analyzed the IL-6, which together with TNF- α , both are cytokines that play a major role in bone remodeling. Evidence suggests that pro-inflammatory biomarkers act on mesenchymal stem cells and osteoclast precursors enhancing bone resorption (Barbour et al. 2012; Abdel Meguid et al. 2013; Korczowska et al., 2013). We found maximum values of IL-6 in mothers during labor, as well as in newborn's umbilical cord vein, where we also observed significant differences between groups, with higher IL-6 concentrations for both cases in the

control group (Figure 43). Dietary intake of omega-3 LC-PUFA is known to be associated with the decrease pro-inflammatory factors as interleukins (Kajarabille et al. 2013). Omega-3 supplementation ranging from 3 to 6 g/day showed a modest, but rather consistent beneficial effect of these fatty acids in joint disease. In the same way, the syntheses of pro-inflammatory factors as interleukins and TNF- α in cartilage tissue were suppressed by dietary supplementation with fish oil containing both EPA and DHA (Shapiro et al. 1996; Watkins et al. 2001). Our omega-3 LC-PUFA supplementation results in decreased IL-6 levels in neonates at birth, showing significantly lower values in venous cord blood, which according to the mentioned above, could be beneficial for bone formation in newborn. However, this cytokine has a role as an inflammatory signal and parturition leads to a significant inflammatory process. Among the inflammatory chemokines and cytokines expressed by trophoblast cells, IL-6 is a classic multifunctional proinflammatory cytokine which is produced by the activated vascular endothelial cell and placenta (Yin et al. 2014; Natalie J. Hannan 2014; Demirturk et al., 2014).

TNF- α is closely related to the IL-6, it promotes bone resorption and suppresses bone formation by increasing osteoblast apoptosis, and reduced differentiation and proliferation of osteoblasts and their progenitors (Kawai et al. 2012; Panuccio et al. 2012; Straburzyńska-Lupa et al. 2013). We found significant differences between both groups in mother at delivery (Figure 44), where supplemented group shows lower values, then omega-3 fatty acids may contribute to decrease the inflammatory process at labor (Marchioni & Lichtenstein 2013), as well as supplementation could also diminish the inflammatory process in the newborn at birth. Regarding to the newborn, we observed lower values of TNF α at 2,5 months after birth, in neonates whose mothers were supplemented, which means that omega-3 fatty acids could help to bone formation, decreasing bone resorption caused by TNF α . (Coates et al., 2011; Munro & Garg 2013; Kajarabille et al. 2013).

On the other hand, and regarding to mineral content analysed in erythrocyte cytosol, Calcium (Ca) is one of the minerals which together with bone homeostasis suffers significant changes during pregnancy and lactation due to the increased fetal requirements of calcium, particularly during the third trimester when rapid mineralization of the fetal skeleton occurs, with the subsequent fragility fractures during late pregnancy or during the postpartum period in women (Iwamoto et al. 2012). We found that supplemented mothers at postpartum had higher

Ca concentration (Figure 45), thus omega-3 LC-PUFA might help to cope with the great demand of Ca during lactation, in order to concentrate high amounts of Ca in breast milk (Yoon et al. 2000). According to bibliography omega-3 PUFA, and particularly DHA, improved calcium absorption, changing the composition of the intestinal membranes and reduced intestinal calcium loss (Bonnet & Ferrari 2011). With regard to the neonates, we observed significant differences at birth in umbilical cord vein and artery, where supplemented group also showed greater levels of Ca. This is consistent with studies that point out that omega-3 PUFA not only may modulate proinflammatory cytokines and increase the production of IGF1, but also improve the accretion of calcium in the bone (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010). Furthermore, Kruger & Schollum (2005), found that DHA concentrations in the membrane of erythrocyte were associated with bone density and calcium absorption in bone in a cohort of growing rats fed a diet supplemented with tuna oil, and in a randomized study with 40 patients with osteoporosis, subjects taking an omega-3 supplement, also had better absorption of calcium compared with placebo (Rahman et al. 2007).

Together with Ca, phosphorus (P) is another essential mineral in developmental stage, during which infants exhibit the fastest mineral accretion and thus have the highest requirements during their lifetime (Christmann et al. 2014). Regarding to our data, we found significant differences between both groups in mother at delivery and postpartum, where mothers who had supplementation showed higher concentration of P (Figure 46). In the newborn we observed significantly higher values of P in umbilical cord artery, for those whose mothers were supplemented.

Therefore, omega-3 supplementation may allow not only on the recovery of P after labor on mothers, but also assures the required amount of P in breast milk which together with Ca, are the main minerals for bone mineralization in the neonate (Miller 2003).

Newborns are particularly sensitive to imbalances in iron metabolism (Cornock et al., 2013). Although to date, no study has examined the correlation between Fe and omega-3 fatty acids during pregnancy, our results showed that mothers who were supplemented with omega-3 LC-PUFA during pregnancy and lactation had higher concentrations of Fe comparing to the control (Figure 48). Fe is an essential element for the developing fetus (Li et al. 2008), therefore omega-3 supplementation helps to increase the amount of Fe in order to assure a

suitable development in fetus, in the same way, it helps to avoid Fe decrease during labor in mothers.

Magnesium (Mg) and copper (Cu) are essential major elements, together with Ca and iron Fe, for the health of the pregnant women and the fetus. It's concentrations are altered during pregnancy with the requirements of growing fetus and changes in the mother's physiology (Zhang et al. 2013). For both minerals, our data showed significant differences between groups in mothers at postpartum (at 2,5 months) and in umbilical cord vein in the newborn, where supplemented group had greater Mg and Cu concentrations (Figure 47 and Figure 49). Thus, omega-3 fatty acids might help in mineral recovery after labor and in the same way, it assures the optimum mineral content for the newborn.

According to literature, zinc requirement during the third trimester of pregnancy is approximately twice as high as that in non-pregnant women (Mistry et al. 2014). Plasma zinc concentrations decline as pregnancy progresses and then paradoxically increase towards delivery (Izquierdo Alvarez et al., 2007). Zinc supplementation during pregnancy has been reported to significantly increase birth weight and head circumference, highlighting the importance of adequate zinc supply during pregnancy (Goldenberg et al. 1995; Mistry et al. 2014). In our study we observed significant differences in newborns in umbilical cord vein as well as at 2,5 months after birth, for both cases supplemented groups had greater Zn content compared to control group (Figure 50). These results suggest that omega-3 LC-PUFA might increase antioxidant function through increase of antioxidant enzymes (Cu/Zn SOD), therefore this antioxidant protection would benefit bone formation.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.....	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIX
ÍNDICE DE TABLAS	XXXIII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XXXIV

ÍNDICE GENERAL

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
1.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GESTACIÓN Y DESARROLLO	
NEONATAL.....	3
1.1.1 Generalidades del estrés oxidativo	3
1.1.2 Estrés oxidativo durante la gestación, parto, lactancia y en el recién nacido	16
1.2 REMODALO ÓSEO EN LA GESTACION Y DESARROLLO	
NEONATAL.....	22
1.2.1 Generalidades del metabolismo óseo: Biomarcadores óseos	22
1.2.2 Remodelado óseo durante la gestación, parto, lactancia y en el recién nacido.....	37

1.3 REMODELADO ÓSEO, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN	42
1.4 ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)	47
1.4.1 Fuentes y síntesis endógena	47
1.4.2 Funciones biológicas del DHA	54
1.4.2.1 Funciones generales.....	54
1.4.2.2 DHA en el embarazo, parto y lactancia.	59
1.4.2.3 DHA en el desarrollo visual y neurológico del recién nacido	64
1.5 DHA Y ESTRÉS OXIDATIVO	69
1.6 DHA Y REMODELADO ÓSEO	74
2. JUSTIFICACIÓN.....	85
3. OBJETIVOS	89
4. MATERIAL Y MÉTODOS	93
4.1 TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	93
4.2 SELECCIÓN DE SUJETOS.....	96
4.3 DESCRIPCIÓN DE LA ANALÍTICA REALIZADA.....	100
4.3.1 Obtención de la muestra.....	102

4.4 DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO ...	101
4.4.1 Indicadores de daño oxidativo en plasma y membrana eritrocitaria .	101
4.4.2 Determinación de antioxidantes liposolubles en plasma materno y del recién nacido	102
4.4.3 Capacidad antioxidante total en plasma materno y del recién nacido	104
4.4.4 Determinación de antioxidantes liposolubles en membrana de eritrocito materno y del recién nacido	105
4.4.5 Capacidad antioxidante enzimática en citosol de eritrocito materno y de recién nacido	106
4.5 DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES ÓSEOS EN PLASMA MATERNO Y DEL RECIÉN NACIDO.....	107
4.6 CONTENIDO MINERAL EN CITOSOL DE ERITROCITO MATERNO Y DEL RECIÉN NACIDO	111
4.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	112
5. RESULTADOS	115
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	115
5.2 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	117

5.2.1 Daño oxidativo en plasma: determinación cuantitativa de peróxidos	117
5.2.2 Daño oxidativo en membranas eritrocitarias: determinación cuantitativa de peróxidos.....	118
5.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	120
5.3.1 Capacidad antioxidante total en plasma	120
5.3.2 Antioxidantes liposolubles en plasma	121
5.3.2.1 Retinol.....	121
5.3.2.2 α -Tocoferol.....	123
5.3.2.3 β -Caroteno	124
5.3.2.4 Coenzima Q9	126
5.3.2.5 Coenzima10.....	127
5.3.3 Antioxidantes liposolubles en membranas eritrocitarias	129
5.3.3.1 α -Tocoferol.....	129
5.3.3.2 Coenzima Q10	130
5.3.4 Enzimas antioxidantes en citosol de eritrocito.....	131
5.3.4.1 Superóxido dismutasa (SOD)	131
5.3.4.2 Catalasa (CAT)	133
5.3.4.3 Glutación peroxidasa (GPx).....	134

5.4 VALORES PLASMÁTICOS DE BIOMARCADORE ÓSEOS.....	135
5.4.1 Osteopontina (OPN)	135
5.4.2 Parathormona (PTH).....	136
5.4.3 Osteocalcina (OC)	137
5.4.4 Leptina.....	139
5.4.5 Insulina	140
5.4.6 Adrenocorticotropina (ACTH).....	141
5.4.7 Receptor Activador para el Factor Nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL)	143
5.4.8 Osteoprotegerina (OPG)	144
5.4.9 Interleukina-6 (IL-6)	145
5.4.10 TNF- α	147
5.5 CONTENIDO MINERAL EN CITOSOL DE ERITROCITO	148
5.5.1 Calcio (Ca).....	148
5.5.2 Fósforo (P)	149
5.5.3 Magnesio (Mg)	151
5.5.4 Hierro (Fe)	152
5.5.5 Cobre (Cu)	154
5.5.6 Cinc (Zn)	155

6. DISCUSIÓN	159
7. CONCLUSIONS	191
8. BIBLIOGRAFÍA	197
9. ANEXO I	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales fuentes generadoras de radicales libres	4
Figura 2. Principales especies reactivas de oxígeno, sus posibles orígenes y vías de eliminación.....	5
Figura 3. Estructura molecular del Coenzima Q10 (Ubiquinona).....	12
Figura 4. Sistemas de defensa antioxidante intracelulares	16
Figura 5. : Proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno en el sincitiotrofoblasto, y las principales consecuencias para la función del tejido.....	18
Figura 6. Proceso de remodelado óseo	23
Figura 7. Homeostasis del calcio en el organismo humano.....	24
Figura 8. Efectos del sistema OPG/RANK-L/RANK sobre los osteoclastos (osteoclastogénesis)	30
Figura 9. La leptina inhibe la formación de hueso a través de la serotonina (vía cerebro al hipotálamo)	32
Figura 10. Factores y citocinas que estimulan la expresión de RANK-L en los osteoblastos.....	35
Figura 11. Funciones de la hormona paratiroidea (PTH), la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y el calcitrol durante la vida fetal y neonatal.....	41
Figura 12. Vías de señalización activadas por las ROS que afectan a la formación de osteoblastos y osteoclastos.....	44
Figura 13. Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA)	47
Figura 14. Síntesis de AGPI omega-3 y omega-6 a partir de sus precursores.....	49
Figura 15. Mecanismo por el cual los AGP omega-3 ejercen un proceso inmunomodulador y una función antiinflamatoria	57

Figura 16. Efecto de los ácidos grasos omega-3 en la relación entre las citoquinas y la osteoclastogénesis	78
Figura 17. Esquema cronológico de la toma de muestras.....	96
Figura 18. Diagrama de flujo que muestra el progreso de las participantes y el abandono durante el estudio	99
Figura 19. Equipo utilizado. UPLC Acquity H-Class acoplado a un detector de triple cuadrupolo Xevo TQ-S.....	102
Figura 20. Fundamento de la técnica Luminex.....	108
Figura 21. Equipo LUMINEX 200TM	110
Figura 22. Contenido de peróxidos en plasma en madre y recién nacido	117
Figura 23. Contenido de peróxidos en membranas de eritrocito en madre y recién nacido	118
Figura 24. Capacidad antioxidante total en plasma materno y del recién nacido.....	120
Figura 25. Contenido de retinol en plasma materno y del recién nacido.....	121
Figura 26. Contenido de tocoferol en plasma materno y del recién nacido.....	123
Figura 27. Contenido de β -caroteno en plasma materno y del recién nacido.....	124
Figura 28. Contenido de Coenzima Q9 en plasma materno y del recién nacido	126
Figura 29. Contenido de Coenzima Q10 en plasma materno y del recién nacido	127
Figura 30. Concentraciones de α -tocoferol en membranas de eritrocito materno y del recién nacido.....	129
Figura 31. Concentraciones de Coenzima Q10 en membranas de eritrocito materno y del recién nacido	130
Figura 32. Concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	131

Figura 33. Concentraciones de Catalasa (CAT) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	133
Figura 34. Concentraciones de Glutation peroxidasa (GPx) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	134
Figura 35. Concentraciones de osteopontina (OPN) en plasma materno y del recién nacido	135
Figura 36. Concentraciones de paratohormona (PTH) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido	136
Figura 37. Concentraciones de osteocalcina (OC) en plasma materno y del recién nacido	137
Figura 38. Concentraciones de leptina en plasma materno y del recién nacido	139
Figura 39. Concentraciones de insulina en plasma materno y del recién nacido	140
Figura 40. Concentraciones de adrenocorticotropina (ACTH) en plasma materno y del recién nacido	141
Figura 41. Concentraciones de Ligando del Receptor del activador del factor nuclear kB (RANK-L) en plasma materno y del recién nacido	143
Figura 42. Concentraciones de Osteoprotegerina (OPG) en plasma materno y del recién nacido	144
Figura 43. Concentraciones de Interleukina-6 (IL-6) en plasma materno y del recién nacido	145
Figura 44. Concentraciones de Factor de Necrosis Tumoral - α (TNF- α) en plasma materno y del recién nacido	147
Figura 45. Concentraciones de calcio (Ca) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	148
Figura 46. Concentraciones de fósforo (P) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	149
Figura 47. Concentraciones de magnesio (Mg) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	151

Figura 48. Concentraciones de hierro (Fe) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	152
Figura 49. Concentraciones de cobre (Cu) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	154
Figura 50. Concentraciones de cinc (Zn) en citosol de eritrocito materno y del recién nacido	155
Figura 51. Metabolismo del DHA. Interacciones de las cascadas metabólicas en el DHA y el ácido araquidónico (AA).....	162

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las recomendaciones de AGPI-CL en lactantes	53
Tabla 2. Composición del producto lácteo utilizado como suplemento de DHA y el control..	94
Tabla 3. Características de las madres	115
Tabla 4. Características de los neonatos	116

LISTADO DE ABREVIATURAS

EOS / ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés: Reactive Oxygen Species)

RL: radicales libres

O₂: oxígeno molecular

O₂⁻: anión superóxido

HO[•]: radical hidroxilo

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

ROO[•]: radical peroxilo

ROOH: hidroperóxido orgánico

ADN: ácido desoxirribonucleico

EPOC: enfermedad pulmonar coronaria obstructiva

SOD: superóxido dismutasa

CAT: catalasa

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

Cu/Zn SOD: SOD cobre/zinc dependientes o citoplasmáticas

MnSOD: SOD manganeso dependientes o mitocondriales

GSSG: glutatión disulfato oxidado

GSH: glutatión reducido

CoQ10: coenzima Q10

IUGR: crecimiento intrauterino restrictivo

MDA: malondialdehido

PTH: paratohormona / hormona paratiroidea

PTHrP: proteína relacionada con la hormona paratiroidea

ACTH: adrenocorticotropina

OPG: osteoprotegerina

OC: osteocalcina

OPN: osteopontina

OPG: osteoprotegerina

RANK: receptor del activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RANK-L: ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α

PGE2: prostaglandinas E2

CFBA-1: core binding factor-1

IGF-1: factor del crecimiento análogo a la insulina tipo

DMO: densidad de masa ósea

IL: interleucina

AGPI-CL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

n-3 / n-6: omega-3 / omega-6

LA: ácido linoleico

AA: araquidónico ácido

ALA: ácido α -linolénico

EPA: ácido eicosapentaenoico

DHA: ácido docosahexaenoico

Ca: calcio

P: fósforo

Mg: magnesio

Fe: hierro

Cu: cobre

Zn: zinc

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GESTACIÓN Y DESARROLLO NEONATAL

1.1.1 Generalidades del estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para neutralizar los radicales libres o reparar el daño producido. El entorno reductor dentro de nuestras células es preservado por las enzimas que mantienen un estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. La respiración aeróbica es un evento necesario que permite la evolución de los organismos multicelulares (aerobios), puesto que obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de las reacciones de óxido-reducción (redox), las cuales permiten almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP. Sin embargo, desequilibrios en el estado normal redox pueden causar la producción de peróxidos y especies reactivas del oxígeno (ROS) o radicales libres que dañan las macromoléculas biológicas como proteínas, lípidos o ADN y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (Elejalde Guerra, 2001; Graham et al., 2011).

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción a aquel en el cual se captan electrones o se pierden moléculas de oxígeno. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados.

Por tanto, 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 carga puede ser positiva, negativa o neutra y son de vida media corta. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, etc. (Gitto et al., 2002; Pourova et al., 2010).

La producción de radicales libres es un proceso continuo del metabolismo aeróbico que a su vez genera una interrelación con las moléculas de su entorno. Su situación energética es, muy inestable, por lo que son altamente reactivos, rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo cuando los radicales libres se encuentran en mayor concentración respecto a los sistemas encargados de neutralizarlos. Su presencia genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas, que a su vez se convierten en radicales libres. Sólo en caso de unión de dos radicales libres desaparecerá su actividad como tal (Mutinati et al. 2014).

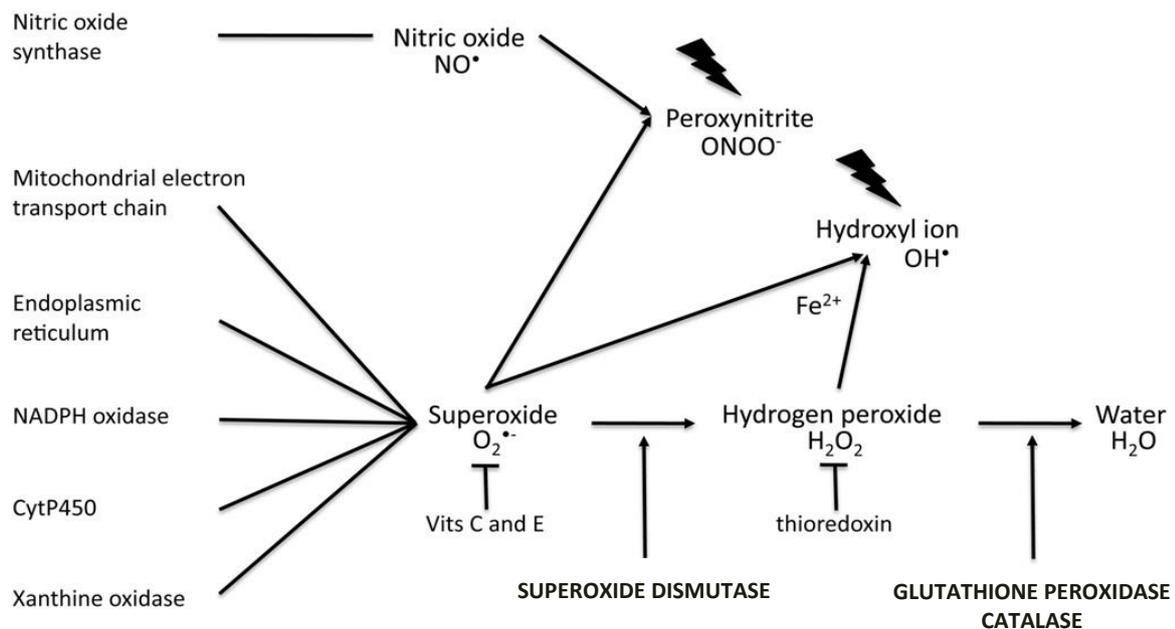
Figura 1: Principales fuentes generadoras de radicales libres.



Rivas García E., 2012.

De los RL inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^{\cdot}), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados (Elejalde Guerra, 2001; Mutinati et al., 2014).

Figura 2: Las principales especies reactivas de oxígeno, sus posibles orígenes y vías de eliminación.



Los procesos que implican daños causados por radicales libres son muy variados, no obstante podrían citarse las siguientes alteraciones patológicas (Rajdl et al. 2005; Schieber & Chandel 2014):

- 1) Desnaturalización de las cadenas de ADN.
- 2) Liberación de factores quimiotáticos que provocan la llegada de leucocitos que a su vez generan más radicales libres.

3) Peroxidación lipídica de los lípidos de la membrana celular (causando la pérdida de las propiedades funcionales de la bicapa lipídica, y alterando su permeabilidad), lo cual genera a su vez hidroperóxidos, aldehídos y peróxidos, que causan daño en las proteínas y ADN.

4) Desnaturalización de las proteínas presentes en el citosol y las enzimas de membrana, incluyendo en el inhibidor de antitripsina-1 α .

En el ser humano el estrés oxidativo juega un papel importante en el envejecimiento, además está involucrado en diversas enfermedades, tales como: la aterosclerosis, el cáncer, la insuficiencia renal, *Diabetes mellitus*, hipertensión arterial, cirrosis e insuficiencia hepática. Además de otros procesos como la desmineralización, artritis e inflamación, enfisema pulmonar y displasia broncopulmonar, colitis ulcerosa, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, EPOC (enfermedad pulmonar coronaria obstructiva), insuficiencia cardiaca etc. (Elejalde Guerra 2001; Schieber & Chandel 2014).

No obstante a niveles homeostáticos, las ROS cumplen funciones fisiológicas beneficiosas como la activación de factores de transcripción dependientes del estado redox y activación de las proteínas quinasas, ya que son utilizadas por el sistema inmunitario para atacar a los patógenos, además de estar involucradas en la síntesis de mediadores inmunes; las especies reactivas del oxígeno también son utilizadas en la señalización celular, denominada señalización redox, y participan en la regulación del tono vascular (Halliwell et al. 1992; Agarwal et al. 2005; Rizzo et al. 2012).

Para mantener el equilibrio entre la presencia de radicales libres en los procesos fisiológicos y su exceso patológico los organismos poseen un sistemas antioxidante, cuya función es mantener el equilibrio entre sustancias pro-oxidantes y antioxidantes (balance oxidativo). Hay sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares (la catalasa de los peroxisomas, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa), también hay multitud de antioxidantes no enzimáticos. Los llamados *radical scavengers* son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente los RL (el glutatión, la vitamina C o ácido ascórbico y la

vitamina E o alfa tocoferol son los principales). Las proteasas celulares son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas oxidativamente, que son a su vez fuente generadora de más RL y finalmente los llamados antioxidantes terciarios se encargan de reparar las biomoléculas dañadas por los RL (Rizzo et al. 2012; Mutinati et al. 2014).

En resumen, puede decirse que el sistema antioxidante primario está constituido por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como las enzimas del ciclo redox del glutatión: glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Halliwell et al. 1992; Mutinati et al. 2014).

MECANISMOS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las especies reactivas de oxígeno más comunes. Se forma como producto de la respiración aeróbica, la formación y dismutación del superóxido o como producto de la actividad oxidasa. Tanto el peróxido de hidrógeno, como su producto el radical hidroxilo, ambos formados a partir de una reacción Fenton, son dañinos para los componentes celulares. Sin embargo, el peróxidos de hidrógeno pueden actuar como mensajero secundario en diversas cascadas de señalización metabólica como, activación del sistema inmunitario, procesos inflamatorios, la proliferación celular y la apoptosis (Rahman & Adcock 2006; Veal et al. 2007).

Una de las formas más eficientes para la eliminación del H_2O_2 es la catalasa, la cual cumple una doble función: por un lado cataliza la descomposición de peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno (utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso), y también ejerce una función peroxidica, produciendo la oxidación de donantes de hidrógeno como el metano, los fenoles o el etanol con consumo de peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Aebi 1984). Su mecanismo de acción se expone en la siguiente ecuación:



La descomposición del H_2O_2 por parte de la catalasa es bastante rápida, sin embargo, su afinidad por el mismo es baja, por lo que se requieren altas concentraciones para su descomposición (Veal et al. 2007).

El papel antioxidante de la catalasa es fundamental, considerándose el antioxidante celular más importante que limita el daño causado por los radicales libres. Tiene una amplia distribución en todos los tejidos, pudiéndose encontrar en altas concentraciones en el hígado, riñones y eritocitos en el caso de los mamíferos. Es una enzima ferroporfirínica intracelular cuya localización principal en las células, son los peroxisomas (80%) y el citosol. La actividad catalasa en plasma es significativamente mayor en recién nacidos a término, así como en aquellos neonatos nacidos mediante parto eutócico, frente a los nacidos por cesárea y los prematuros (Georgeson et al. 2001).

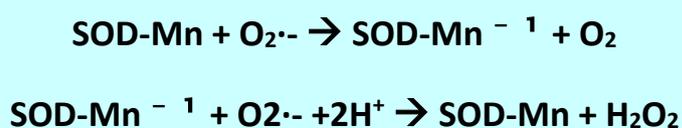
Superóxido Dismutasa (SOD)

Se trata de un conjunto de metaloenzimas, cuya característica funcional fundamental es la aceleración de dismutación del radical superóxido hacia peróxido de hidrógeno y oxígeno, por lo que es una importante defensa antioxidante en las células.

Se distinguen tres grandes familias de SOD: dos de ellas son de localización intracelular, las SOD cobre/zinc dependientes o citoplasmáticas (Cu/Zn SOD, SOD1), y las SOD manganeso dependientes o mitocondriales (MnSOD, SOD2), y por último la de localización extracelular (EC-SOD, SOD3). La distribución de la SOD es muy amplia a nivel tisular, con excepción de la Mn-SOD, que no se localiza a nivel eritrocitario; todas ellas

ejercen un importante papel en el control de los niveles de radical superóxido a nivel celular (Torsdottir et al. 2010).

El mecanismo general de la acción de la SOD, se resume en la siguiente ruta:



En el período neonatal, su actividad puede verse influenciada por factores como la anoxia fetal, la acidosis respiratoria y la acidosis metabólica (Li et al. 2002). Otros trabajos refieren una menor actividad tanto de la SOD como de la catalasa a nivel hemático tanto en prematuros como en recién nacidos con hipoxia crónica (Litvinenco et al. 2002).

Glutación peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidada comporta una familia de enzimas localizadas fundamentalmente en citosol y mitocondria que utilizan glutatión (GSH) como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del H₂O₂ como sustratos (McCord 2000). Por lo tanto, la glutatión peroxidada en humanos es la mayor enzima eliminadora de peróxidos (Rojkind et al. 2002).

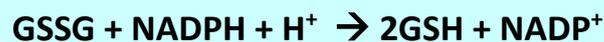
Se trata de una enzima que requiere el selenio (Se) como cofactor. La GPx es fundamental para la inactivación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de otros hidroperóxidos de cadena larga, catalizando la reacción de hidroperóxidos con glutatión reducido (GSH), dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción, a peróxidos de hidrógeno (Sindhu et al. 2005).



Glutación reductasa (GR)

La glutación reductasa (GR) juega un papel de manera indirecta pero esencial frente a la prevención del daño oxidativo en la célula, ayudando a mantener los niveles adecuados de glutación reducido (GSH) intracelular. El GSH es esencial para el mantenimiento de la estructura de los eritrocitos y la la hemoglobina en su estado ferroso (Berg et al., 2002).

Junto con su cofactor NADPH, es la encargada de la reducción del glutación disulfato oxidado (GSSG), jugando pues, un papel esencial en el mantenimiento de los niveles de glutación reducido (GSH). Por otro lado, el GSH también actúa como reactivo para la GPx, transformando el peróxido de hidrógeno en agua (Hirrlinger et al. 2000).



MECANISMOS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

α-Tocoferol (Vitamina E)

Existen en total ocho tocoferoles (vitaminas liposolubles), siendo el α -tocoferol el más activo y ampliamente distribuido. Se considera el antioxidante natural más efectivo, cuya función se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Chow 1991). Destaca su capacidad para la eliminación de oxígeno singlete, entre otros radicales del oxígeno (Cordero et al. 2009).

La vitamina E actúa como antioxidante biológico, constituyendo gran parte de la capacidad antioxidante liposoluble del plasma humano y de los eritrocitos. En consecuencia, la protección frente a la peroxidación lipídica es considerada su principal función en la célula. Sin embargo, interviene también en otros procesos como por ejemplo la agregación

plaquetaria, la hemólisis o la actividad de ciertas enzimas (creatinina quinasa o xantina oxidasa) (Yoshida et al. 2007).

Es bien conocida su interacción en la reacción de peroxidación, en la que actúa eliminando el radical lipídico peróxido, con lo que impide la formación de nuevos radicales libres. Hasta el 90% de los radicales de peróxido son inactivados de esta manera. Su acción sobre este radical y otros, preserva la integridad estructural y funcional de la célula y sus orgánulos (Niki et al. 1995; Cordero et al. 2009).

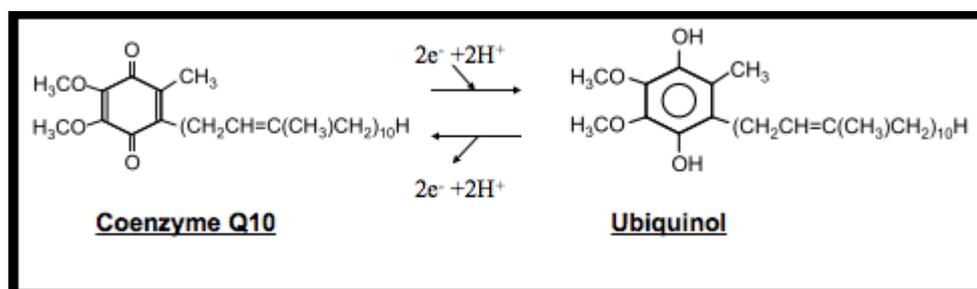
La vitamina E aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación y a la incorporación por macrófagos que las haría más aterogénicas que las LDL nativas. De esta manera la vitamina E podría ser un factor potencialmente terapéutico en la formación espontánea de aterosclerosis. En pacientes con insuficiencia cardíaca tanto la vitamina E como la coenzima Q10 han obtenido algunos resultados clínicos favorables y una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en plasma (Elejalde Guerra 2001; Yoshida et al. 2007).

Coenzima Q10 (Ubiquinona)

La coenzima Q10 el único antioxidante biosintetizado en el organismo, interacciona con los radicales de los lípidos deteniendo así la cadena de propagación del daño peroxidativo. Aportada exógenamente protege a las células del estrés oxidativo tras ser reducido por acción de reductasas presentes en distintas fracciones celulares y se acumula en la mitocondria en forma de cationes, previniendo la peroxidación lipídica y protegiendo frente el estrés oxidativo. Tales propiedades antioxidantes derivan del anillo fenólico que presenta su estructura. Además, el ubiquinol participa, junto al ácido ascórbico, en el proceso de regeneración de la vitamina E por vía dependiente del sistema NADPH (Bhagavan & Chopra 2007).

Su función principal es la de ejercer como transportador móvil en la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Puede, además, actuar como contrarrestando la concentración de radicales libres (Bhagavan & Chopra 2007; Litarru., 2014).

Figura 3: Estructura molecular del Coenzima Q10 (Ubiquinona).



Otros mecanismos de acción antioxidante son: inhibición de la síntesis de radicales alquilo y peróxilo, y/o interacción directa con el anión superóxido y con radicales alquilo y peróxilo, mediante la donación de átomos de hidrógeno (Litarru, 2014). También ha sido demostrada la relación de la ubiquinona con la peroxidación lipídica inducida por estrés, bien exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio), observándose un aumento de los niveles de CoQ10 en las membranas lipídicas (Mataix et al. 1997; Bhagavan & Chopra 2007; Litarru., 2014).

β-caroteno

La actividad antioxidante de este compuesto se basa en su capacidad para reaccionar con determinados radicales libres, como el peróxilo, el hidroxilo, el oxígeno singlete, el anión superóxido, el ácido hipocloroso y otras especies reactivas (Hasnain & Mooradian 2004).

Entre los procesos en los que basan su capacidad antioxidante destaca la reducción del daño oxidativo celular inducido por la hipoxantina, la xantina oxidasa o los

polimorfonucleares activados. Es capaz de inhibir la peroxidación lipídica inducida tanto por fuentes enzimáticas de radicales de oxígeno, como el sistema xantina-oxidasa, o el NADPH/citrocromo-P450 reductasa (Sangeetha et al. 2009), como por fuentes no enzimáticas, como las sales de metales de transición (Hasnain & Mooradian 2004). La mencionada eficacia en la disminución directa de la lipoperoxidación y la capacidad para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes son la base fundamental de la actividad antioxidante de los β -Carotenos (Zhang et al. 2006).

Retinol (Vitamina A)

La vitamina A o retinol, es una vitamina liposoluble que interviene en la formación y mantenimiento de las células epiteliales, en el crecimiento óseo, el desarrollo, protección y regulación de la piel y de las mucosas, y también es un nutriente esencial para el ser humano.

Se conoce también como retinol, ya que genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina. Desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue. También se puede requerir para la reproducción y la lactancia. El β -caroteno, que como se ha comentado anteriormente posee propiedades antioxidantes que ayudan a eliminar radicales libres previniendo el envejecimiento celular, es un precursor de la vitamina A (Gil 2010).

La vitamina A también desempeña un papel importante en la regulación de la expresión genética. Mediante la regulación de la expresión de genes específicos, el ácido retinoico desempeña un papel destacado en la diferenciación celular (Semba 1998)(Semba et al. 2001).

También resulta necesaria para el funcionamiento normal del sistema inmunitario. Resulta necesaria para mantener la integridad y el funcionamiento de la piel y las mucosas. Además juega un papel central en el desarrollo y diferenciación de los glóbulos blancos, como los linfocitos, que desempeñan un papel crítico en la respuesta inmunitaria (Imdad et al. 2011).

La vitamina A es esencial para el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo fetal, participa en el desarrollo de las extremidades y la formación del corazón, los ojos y oídos. Además, se ha establecido que el ácido retinoico regula la expresión del gen de las hormonas de crecimiento. Se sabe que tanto el exceso como la deficiencia de vitamina A causan defectos de nacimiento (Russell 2000).

La vitamina A se requiere para el desarrollo normal de las células madre para convertirse en glóbulos rojos. Adicionalmente, la vitamina A parece facilitar la movilización de hierro de los lugares de almacenamiento a los glóbulos rojos en desarrollo para su incorporación en la hemoglobina (Imdad et al. 2011).

OTROS ANTIOXIDANTES

Ácido ascórbico (Vitamina C)

Antioxidante hidrosoluble, elimina los radicales libres, siendo capaz de secuestrar radicales libres y proteger de posibles daños al ADN; el ácido ascórbico regenera la vitamina E, ya que interacciona con el radical tocoferilo, siendo capaz de regenerar la forma reducida del tocoferol, y también es capaz de activar ciertas enzimas (Elejalde Guerra 2001).

Oligoelementos

Además del cobre (Cu) y el cinc (Zn), hay otros elementos considerados antioxidantes, como el selenio (Se), el cual es fundamental al formar parte de las ‘selenoproteínas’, las cuales participan en el mecanismo de defensa antioxidante (como por ejemplo la GPx). Además, el Se participa directamente en la regeneración de la vitamina E.

Por otro lado, el Manganeseo (Mn) también adquiere su importancia ya que forma parte de la SOD2 mitocondrial, que elimina los ROS producidos en la mitocondria.

Transferrina y ferritina

Responsables del transporte y almacenamiento de los depósitos de Fe (si fallan podría quedar libre actuando como prooxidante); ceruloplasmina, encargada de incorporar el Cu a la célula además de tener la capacidad de oxidar el Fe, lo que impediría su acción prooxidante; albúmina, que también transporta Cu al igual que la ceruloplasmina y hace frente a la peroxidación lipídica; y las chaperonasoproteínas de choque térmico, que tienen una actividad protectora sobre las proteínas en situaciones de estrés oxidativo (Cea Bonilla y col., 2002).

Taurina

Es un β -aminoácido que se acumula en el interior de las células eucarióticas. Posee la capacidad de captación de ROS transformándolos en sustancias menos nocivas, así como su participación en reacciones de conjugación de xenobióticos. Este aminoácido es especialmente abundante en los neutrófilos.

Ácido úrico

Se produce por catabolismo de las bases púricas, y es capaz de interaccionar directamente con los ROS o de acomplejar metales de transición, disminuyendo en ambos casos sus efectos oxidantes.

Bilirrubina

Derivada del metabolismo de las hemoproteínas, es un buen captador de radicales de oxígeno, siendo un eficaz antioxidante al romper las cadenas de lipoperoxidación.

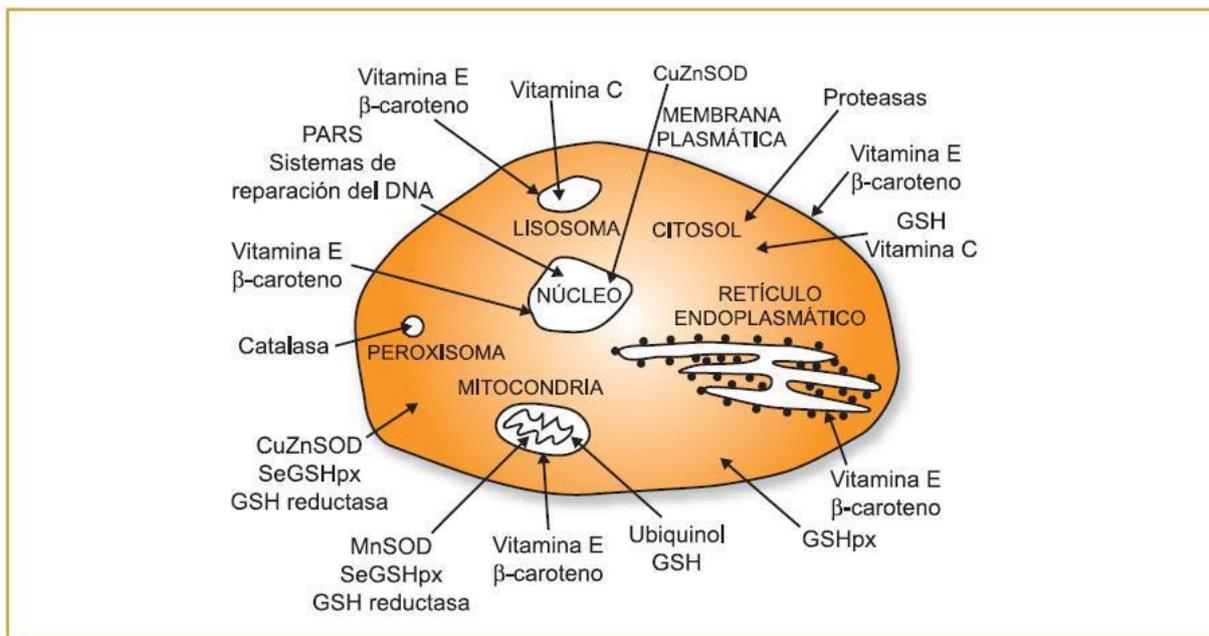
Metionina y Cisteína

Implicación en la regeneración *de novo* del glutatión. Además, la N-acetilcisteína puede actuar como antioxidante en otras situaciones (Miján de la Torre y de Mateo Silleras, 1998).

Melanina y melatonina

La melanina actúa como antioxidante al absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda, mientras que la melatonina protege del daño oxidativo a numerosos tejidos y órganos (Miján de la Torre y de Mateo Silleras, 1998).

Figura 4: Sistemas de defensa antioxidante intracelulares. CuZnSOD: CuZn superóxido dismutasa; GSH: glutatión; GSH reductasa: glutatión reductasa; GSHpx: glutatión peroxidasa; MnSOD: Mn superóxido dismutasa; PARS: poli(ADP-ribosa) sintetasa; SeGSHpx: glutatión peroxidasa dependiente de selenio.



Martínez Cayuela, 2010.

2.1.2 Estrés oxidativo durante la gestación, lactancia y desarrollo del recién nacido

El estrés oxidativo se manifiesta tanto en la madre como en el feto desde las primeras etapas del embarazo por el papel que desempeña en el desarrollo de la placenta. La hipoxia es fundamental para el control del desarrollo de la homeostasis del O_2 , y se considera esencial en el temprano desarrollo embrionario así como en el desarrollo placentario, a través de la

regulación de la angiogénesis la placenta humana (De Marco & Caniggia 2002; Mutinati et al. 2014).

La proliferación de trofoblastos, migración, fusión y apoptosis, son procesos necesarios para la normal implantación del embrión y la angiogénesis placentaria, los cuales finalmente determinaran el crecimiento del feto. Estos procesos se encuentran generalmente regulados por hormonas y factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento placentario, perteneciente a los factores de crecimiento vaso-endoteliales, los cuales pueden verse alterados por el estrés oxidativo, derivado principalmente del incremento de la producción de superóxido y óxido nítrico, los cuales que provocan la formación de sustancias prooxidantes responsables de la propia disfunción endotelial (Kossenjans et al. 2000; Mutinati et al. 2014).

Durante el normal desarrollo de la placenta, la apoptosis de los trofoblastos puede iniciarse por hipoxia y el estrés oxidativo. Los factores inductores de hipoxia (HIF) son proteínas de transcripción reguladas por el estado redox intracelular, y su expresión y actividad están controladas por la propia concentración de radicales de oxígeno en las células (Sharp et al. 2010).

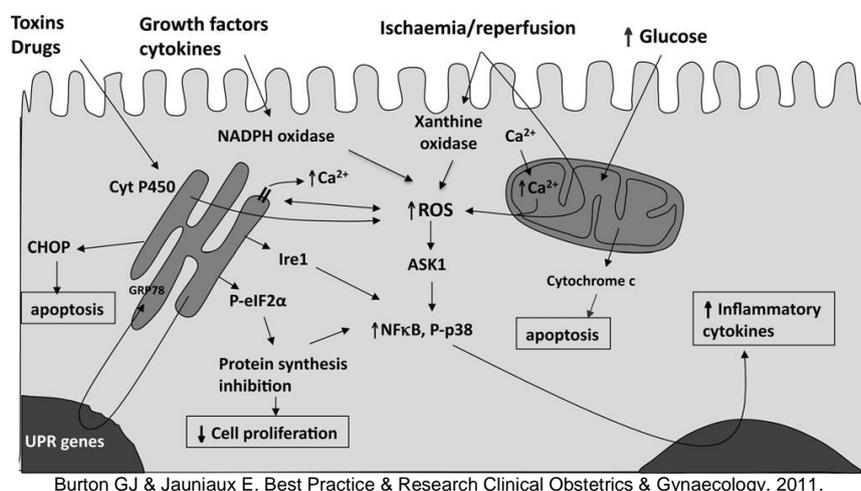
La mencionada muerte celular programada o apoptosis, es fundamental para mantener la homeostasis de los sistemas biológicos. Durante el desarrollo embrionario temprano, la apoptosis sirve para eliminar células y juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del endometrio uterino durante la implantación del embrión (Zhang & Paria 2006). Las ROS pueden modificar selectivamente las proteínas y por lo tanto regular la señalización celular, incluyendo la apoptosis. En respuesta a diferentes estímulos, la apoptosis puede iniciarse intrínsecamente por la vía mitocondrial o extrínsecamente a través receptores de membrana asociados a las vías apoptóticas (Mutinati et al. 2014).

Por otro lado, el estrés oxidativo también se ha relacionado con la fisiopatología de enfermedades que se pueden desarrollar durante el embarazo tales como, abortos, preeclampsia, crecimiento intrauterino restrictivo (IUGR), y ruptura prematura de membranas (Burton & Jauniaux 2011; Mutinati et al. 2014).

Son varias las patologías del embarazo en las que se ha demostrado la participación de los radicales libres destacando la preeclampsia y la eclampsia. El desequilibrio entre factores reguladores del tono vascular en la mujer gestante, es responsable en parte de la preeclampsia, enfermedad específica de la gestación humana, caracterizada por la triada clínica de hipertensión, proteinuria y edema, que aparecen en la segunda mitad del embarazo (Bernardi et al. 2008 and 2012). Igualmente se ha visto en diversos estudios que la preeclampsia desencadena un incremento de los niveles de anión superóxido a nivel placentario (Sikkema et al. 2001) y disminución de la actividad del citocromo c oxidasa en trofoblastos (Matsubara et al. 1997), así como incrementos de los niveles de ácido ascórbico (AA) y malondialdehído (MDA), con respecto a sujetos con partos en condiciones normales (Cester et al. 1994; Bernardi et al. 2012).

Otra patología en la que el estrés oxidativo desempeña un papel determinante es, en el crecimiento restrictivo intrauterino (IUGR), este se asocia en la edad adulta con el síndrome metabólico, obesidad, hipertensión, diabetes del tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Valsamakis et al. 2006). Desordenes como la insuficiencia utero-placental y la muerte de trofoblastos inducida por estrés oxidativo, también se encuentran asociados con la aparición del IUGR (Scifres & Nelson 2009).

Figura 5: Proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno en el sincitiotrofoblasto, y las principales consecuencias para la función del tejido. (CHOP, C/EBP proteína homóloga; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; UPR, unfolded protein response/ respuesta a proteínas desplegadas).



Numerosos autores afirman que las madres con diabetes mellitus o diabetes gestacional inducen estrés oxidativo en los niños, probablemente no solo por el aumento de los radicales libres, sino también por un daño en los mecanismos de defensa antioxidante. La teratogenicidad de la diabetes gestacional se ha visto relacionada con el estrés oxidativo en el embrión, donde el daño oxidativo provocado puede ser reducido mediante tratamientos con antioxidantes (Biri et al. 2006; Larqué et al. 2011).

Además, en las primeras etapas del embarazo se da un incremento en la concentración de oxígeno, lo cual se asocia con un incremento en la síntesis del mRNA de enzimas antioxidantes; catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), y superóxido dismutasa (SOD) en el tejido placentario. De este modo, la magnitud del estrés oxidativo dependerá por un lado de la severidad del daño, y por otro de la efectividad de la defensa antioxidantes placentaria (Hempstock et al. 2003; Jauniaux et al. 2006).

En el momento del parto, el paso de un ambiente intrauterino con una presión de oxígeno baja a un ambiente extrauterino aerobio con una presión de oxígeno casi cinco veces superior, así como diversos procesos implicados al finalizar la gestación y el propio esfuerzo realizado en el parto, hace que el recién nacido se enfrente a una elevada concentración de radicales libres, lo cual implica una adaptación sistémica y pulmonar a las condiciones postnatales (Mutinati et al. 2014). Esta incrementada producción de radicales libres debe de ser controlada por el sistema de defensa antioxidante del neonato, cuyo desarrollo sucede de forma paralela al desarrollo dado durante la gestación (Shoji et al. 2009; Bernardi et al. 2012), siendo esta la causa de que los recién nacidos prematuros muestren mayor agresión oxidativa, al presentar un sistema de defensa antioxidante inmaduro (Ochoa et al. 2003; Ochoa et al. 2007; Díaz-Castro et al. 2015).

Durante el parto se liberan prostaglandinas y tromboxanos, lo cual induce peroxidación lipídica. Además el dolor y el estrés sufridos en el parto aumentan la producción de malondialdehido (MDA) y proteínas carboniladas, estos productos se transfieren al feto a través de la placenta (Gitto et al. 2009). En el momento del parto también ocurren de forma periódica periodos de isquemia-reperusión que se dan al compás de las contracciones

uterinas, provocando la formación de xantinas y de radicales libres (Graham et al. 2011). Tras el nacimiento, diversos factores fisiológicos y ambientales hacen que el recién nacido sea vulnerable a los efectos negativos del estrés oxidativo, los cuales pueden comprometer la salud del neonato (Mutinati et al. 2014).

En el caso del parto prematuro a menudo se encuentra implicada una infección, ya sea extra o intrauterina, la cual se ha demostrado tras estudios histológicos de la placenta y membranas. El *Ureaplasma* spp entre otros gérmenes, provoca una infección que desencadena la producción de metabolitos del ácido araquidónico, y otros mediadores inflamatorios como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e IL-6 por parte de los macrófagos, produciendo un aumento de productos prooxidantes (Graham et al. 2011; Kacerovsky et al. 2014).

En lo que respecta al neonato, diversos estudios han mostrado que los recién nacidos son más susceptibles a desarrollar infecciones o procesos inflamatorios, debido a una mayor susceptibilidad frente a los radicales libres en comparación con los adultos. Los recién nacidos muestran concentraciones más altas de hierro libre, lo que mejora la reacción de Fenton (interacción entre el peróxido de hidrógeno y un metal de transición), que conduce a la producción de radicales hidroxilo altamente tóxicos (Saugstad 2005; Mutinati et al. 2014).

Está ampliamente constatado que el estrés oxidativo se encuentra implicado en varias enfermedades neonatales, en 1988 Saugstad propuso el concepto de "enfermedades por radicales de oxígeno en neonatología", que agrupa diferentes enfermedades que, aunque muestran diferentes síntomas, pertenecen a la misma entidad y comprometen la salud y el crecimiento neonatal, además de afectar al desarrollo fisiológico del individuo. Entre estas enfermedades en los recién nacidos de la especie humana, encontramos displasia broncopulmonar, enfermedad pulmonar crónica, la leucomalacia periventricular, la encefalopatía neonatal, la retinopatía del prematuro, disfunciones renales neonatales (Ricci & Ronco 2013) y la enterocolitis necrotizante (Gitto et al. 2002; Saugstad 2005; Gitto et al. 2009).

En un estudio realizado en ratas (Cambonie et al. 2007) demostraron que los antioxidantes prenatales pueden prevenir enfermedades como la hipertensión arterial en el adulto, la disfunción vascular, concluyen además que el estrés oxidativo perinatal puede producir alteraciones permanentes en el desarrollo cardiovascular. Antioxidantes como la vitamina E, β -caroteno, la melatonina y los grupos sulfhidrilo, han mostrado disminución del daño oxidativo en recién nacidos (Gitto et al. 2009).

Otra de las patologías que aparece en neonatos es la displasia broncopulmonar (BDP), la cual se relaciona con hipoxia, inmadurez pulmonar, barotraumatismo (daño físico causado a los tejidos por una diferencia de presión entre el espacio aéreo al interior o junto al cuerpo y el gas o líquido que lo rodea), infección e inflamación, entre otras. Los hallazgos de laboratorio son muy similares a los encontrados en modelos experimentales animales de toxicidad pulmonar por oxígeno, por lo que se ha implicado en su patogénesis a los radicales libres (Kelly & Lubec 1995; Gitto et al. 2009).

En cuanto al recién nacido prematuro, también existen evidencias de que la retinopatía del prematuro es consecuencia de un elevado estrés oxidativo sobre la retina en desarrollo, lo cual se debe a la excesiva formación de radicales libres o a una disminución en la capacidad para su eliminación; en concreto existe una asociación entre la concentración elevada de lipoperóxidos séricos, como una medida de estrés oxidativo y la incidencia de esta enfermedad (Cervantes-Munguía et al. 2006; Saito, 2008)

Por último, la enterocolitis necrotizante, caracterizada por la inflamación y la necrosis del tejido intestinal, es una enfermedad relacionada con las ROS, siendo probable que se produzca en los recién nacidos y los lactantes prematuros (Friel et al. 2007). Whitehouse et al. (2010) demostraron que los lipopolisacáridos bacterianos aumentaban la activación de la óxido nítrico sintasa (iNOS) en enterocitos de los recién nacidos, provocando así un aumento en la generación de ROS.

1.2 REMODALO ÓSEO EN LA GESTACION Y DESARROLLO NEONATAL

1.2.1 Generalidades del metabolismo óseo: Biomarcadores óseos

El hueso es el componente principal del esqueleto, y el que contiene osteoclastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células hematopoyéticas y células inmunitarias. Las tres funciones principales de hueso son la locomoción, su función como órgano de protección, y la homeostasis de calcio y fósforo. El mantenimiento de las adecuadas propiedades biomecánicas del hueso, resultan esenciales para la locomoción y la prevención de fracturas. Para lograr este objetivo, el tejido óseo se renueva constantemente a través de un proceso fisiológico denominado "remodelado óseo", encargado de reparar las microlesiones y participar en la curación de fracturas (Confavreux 2011; Tenta et al. 2013).

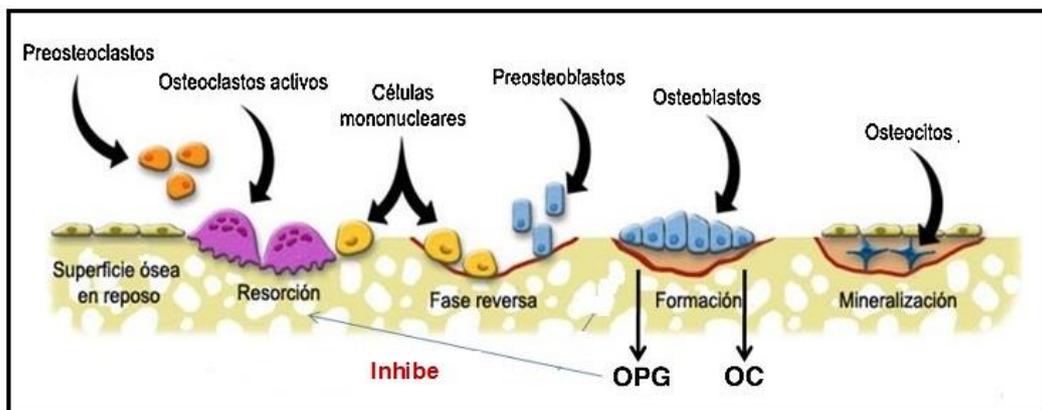
El metabolismo óseo o proceso de remodelado óseo es un proceso dinámico de recambio constante del esqueleto, basado en el acoplamiento de dos procesos: resorción ósea, controlada por los osteoclastos y formación ósea, llevada a cabo por los osteoblastos. Ambos tipos celulares son necesarios para mantener la estructura ósea, así como un suministro adecuado de calcio y fosfato. Entre estos dos procesos mencionados existe un balance mediante factores interrelacionados entre sí, dentro de los que se pueden mencionar, entre otros: genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales, además de una compleja red de múltiples vías de señalización entre los sistemas endocrino, esquelético, inmune y el sistema nervioso (Vega et al. 2007; Barba 2011; Confavreux 2011; Kajarabille et al. 2013).

A nivel microscópico, el remodelado óseo se produce en las unidades básicas multicelulares, donde los osteoclastos reabsorben una cantidad determinada de hueso y los

osteoblastos forman matriz ósea osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada (Fernández-Tresguerres 2006).

Cualquier desequilibrio en este balance resorción/formación conduce a una pérdida de tejido óseo si la resorción excede la formación (osteoporosis, osteopenia) o a un exceso del mismo y no por ello con una mayor calidad, si es la formación la que supera en gran medida a la resorción (osteopetrosis) (Vega et al. 2007; Kajarabille et al. 2013).

Figura 6: Proceso de remodelado óseo.



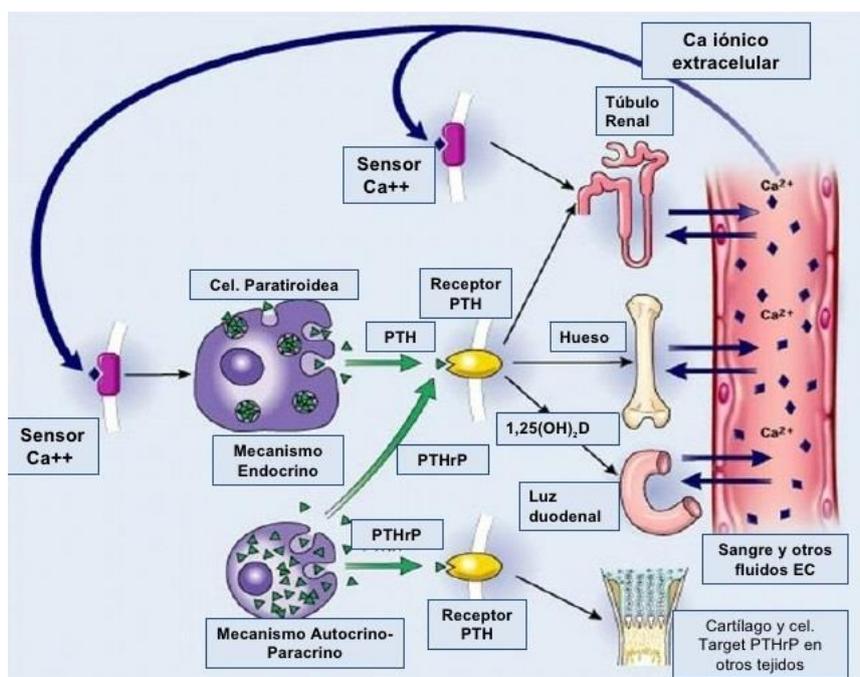
Frost, H.M., 1963. Bone Remodeling Dynamics, Charles C. Thomas. Springfield.

Para mantener este equilibrio metabólico, estas células se basan en vías de señalización complejas que involucran hormonas, factores locales y citoquinas para lograr las tasas adecuadas de crecimiento y diferenciación.

La concentración de las hormonas que regulan el metabolismo del calcio determina la dirección del recambio óseo, pero los factores locales modulan el efecto final y, a su vez, modifican la concentración de las hormonas y la respuesta biológica a nivel de los osteoblastos y los osteoclastos (Montenegro et al., 2002).

En este control las hormonas juegan un papel primordial, entre estas nos encontramos la paratohormona (PTH), la vitamina D, la calcitonina y la adrenocorticotropina (ACTH) entre otras. La PTH, liberada por la glándula paratiroides, es la hormona que controla la homeostasis del calcio y fósforo, hipercalcemiante por naturaleza. Actúa directamente sobre el hueso estimulando a los osteoclastos, favoreciendo la resorción ósea y aumentando la reabsorción de calcio a nivel renal y de forma indirecta en el intestino aumentando su absorción a nivel intestinal (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. 2006; Neyro Bilbao et al., 2011).

Figura 7: Homeostasis del calcio en el organismo humano.



Baron J et al. (1999).The New England Journal of Medicine 340.

Sin embargo, los osteoclastos no presentan receptores para PTH, por lo cual, el reclutamiento, maduración y actividad de estas células por parte de PTH es indirecto (Borrajó, 2001; González et al., 2010). Son los osteoblastos quienes poseen receptores para PTH, por ello son activados por la hormona liberando citoquinas que favorecen la diferenciación y supervivencia, a la vez que inhiben la apoptosis del osteoclasto. Este grupo de citoquinas

pertenece al sistema regulador del remodelado óseo llamado sistema RANK - RANK-L - OPG. El equilibrio entre osteoprotegerina (OPG) y RANK-L regula la diferenciación de osteoclastos, su activación y supervivencia (González et al., 2010).

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) también está implicada en el metabolismo óseo. Es una hormona sintetizada por la hipófisis para estimular la liberación de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales. Presentaría un doble efecto sobre el hueso: por un lado un efecto indirecto negativo a través del cortisol y, por otro lado, un efecto directo positivo sobre los osteoblastos (Mancini et al., 2004).

Tradicionalmente, la actividad de la ACTH a través del cortisol ha hecho considerar su impacto negativo sobre la masa ósea. De hecho, los niveles elevados de cortisol están claramente asociados con la pérdida ósea y la osteoporosis, ya que inhibe la función de las células óseas y el depósito de colágeno. Inhibe el crecimiento y maduración esquelética en niños (Mancini et al., 2004).

Sin embargo, en condiciones fisiológicas el cortisol parece no tener efecto perjudicial sobre la proliferación de hueso o diferenciación. La presencia de glucocorticoides como el cortisol es necesaria para la diferenciación normal de muchas células y probablemente también entre ellas las del hueso (Riancho J.A. 2003). Además, se observó que los receptores de alta afinidad de ACTH están presentes en los osteoblastos y que la ACTH puede estimular la proliferación osteoblástica (Zhong et al. 2005). Por tanto, estos datos son consistentes con un papel anabólico en el hueso por el eje ACTH/cortisol (Isales et al. 2010).

In vivo, ACTH estimula la proliferación de los osteoblastos de una manera dependiente de la dosis, aunque a menores concentraciones, la ACTH puede oponerse a la diferenciación de osteoblastos. ACTH es por tanto, a altas concentraciones anabólica para el osteoblasto, y es muy probable que posea efectos dosis-dependiente de la concentración sobre el metabolismo óseo in vivo (Isales et al. 2010).

El remodelado óseo puede valorarse mediante la determinación de una serie de constituyentes de la sangre u orina denominados marcadores bioquímicos del remodelado

óseo, como proteínas sintetizadas por los osteoblastos u osteoclastos, o bien productos que se originan durante la formación ó la degradación del colágeno tipo 1, la principal proteína que forma la matriz orgánica del hueso, que pasan a la sangre durante el remodelado óseo. Estos marcadores óseos pueden, por lo tanto, clasificarse en dos tipos: de formación y de resorción ósea (Indumati et al. 2007; Barba 2011).

Las mediciones bioquímicas del remodelado óseo pueden ser de utilidad para evaluar pacientes en riesgo de osteoporosis. Además, los marcadores del remodelado óseo son también el mejor medio disponible para determinar con rapidez la adherencia al tratamiento en esta patología (Cons Molina 2003).

Dentro de los marcadores de formación ósea se encuentra la osteocalcina, la proteína no colágena más importante de la matriz ósea, sintetizada por los osteoblastos, considerándola un marcador específico de la función osteoblástica ya que sus niveles se correlacionan con los rangos de formación ósea (Barba, 2011).

Dentro de sus funciones está la de regular la homeostasis del calcio, al inhibir la precipitación de fosfato y calcio, lo cual evita la excesiva mineralización de la matriz ósea (Franco L. 2010).

La osteocalcina sérica se incrementa por tanto en condiciones asociados con aumento del remodelado óseo, como en el hiperparatiroidismo primario o secundario y en la enfermedad de Paget ósea. Sus niveles séricos generalmente son un buen indicador del ritmo de remodelado óseo cuando la resorción y la formación se encuentran acopladas. En casos como la osteoporosis posmenopáusica, donde la resorción y formación se encuentran desacopladas, la osteocalcina solo sirve como marcador de formación ósea (Cons Molina 2003).

Sus valores se modifican con la edad, con concentraciones mayores en niños y adolescentes, permaneciendo estables en la edad adulta y volviendo a incrementar su valor en mujeres mayores de 60 años. Disminuye durante el embarazo y aumenta durante la lactancia y en el neonato (Barba, 2011).

La osteopontina (OPN) es otra proteína no colágena de la matriz ósea, la cual está presente en diversos tejidos, así como en los fluidos corporales. Es una citoquina secretada por los osteoblastos que interviene en la proliferación, la apoptosis, la señalización inflamatoria y ha sido implicada en la remodelación ósea (Chen et al. 2012). Funciona como una proteína de adhesión, al permitir la interacción célula-matriz y célula-célula. De esta manera, participa durante la resorción osteoclástica posiblemente vía mediación de la fijación de osteoclastos a la superficie de la fase mineral, estando elevada en el área de hueso donde los osteoclastos se encuentran activos. Se sugiere que puede ser empleado como marcador de resorción ósea (Cons Molina 2003; Franco L. 2010).

Estudios recientes han reconocido a la OPN como una potencial citoquinas proinflamatoria, incluso algunos autores han sugerido que juega un papel esencial en el desarrollo de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (Chang et al. 2010). La OPN se expresa por una amplia variedad de las células, incluyendo las células T activas y los macrófagos, así como las células óseas. Esta citoquina activa la transcripción de la vía de NF-kappa B en células mononucleares, dicha vía está implicada en la producción de muchos factores inflamatorios, y juega un papel importante en varios procesos fisiológicos y patológicos (Chang et al. 2010; Straburzyńska-Lupa et al. 2013).

Varios estudios han implicado a la OPN en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la curación de heridas, las respuestas inmunológicas, la resorción ósea y la calcificación (Chen et al. 2012).

Este posible marcador de resorción ósea se encuentra por ejemplo aumentado en casos de enfermedad ósea como el mieloma, disminuyendo su concentración con el tratamiento de la enfermedad (Sfiridaki et al. 2011). Otra de estas proteínas, el ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANK-L) funciona como marcador de resorción ósea, activando los osteoclastos (Fernández-Tresguerres 2006).

El RANK-L es una proteína producida por los osteoblastos y las células T. Forma parte del complejo sistema OPG/RANK-L/RANK, fundamental en toda fisiopatología ósea. La unión del RANK-L a su receptor natural, el receptor del activador del factor nuclear kB

(RANK) en la superficie celular de osteoclastos y sus precursores induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos. Estimula la diferenciación, sobrevivencia y fusión de las células precursoras de osteoclastos, activa los osteoclastos maduros y prolonga su vida útil (Montenegro et al., 2002; Barba, 2011).

La osteoprotegerina (OPG), es a su vez una proteína sintetizada por los osteoblastos y células estromales, que actúa como receptor señuelo, antagonista del RANK-L, impidiendo su unión con su receptor RANK. De este modo, la OPG impide las acciones del RANK-L. (Neyro et al. 2011). La OPG inhibe la diferenciación, sobrevivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce a su apoptosis (Ferrer et al., 2002; Montenegro et al., 2002).

En resumen, para diferenciarse y madurar las células de estirpe osteoclástica deben tener contacto directo con los osteoblastos, interrelación mediante la unión de un receptor a su ligando presentes en las respectivas membranas. Si hay suficiente OPG en el medio se unirá al RANK-L de los osteoblastos impidiendo su interacción con el RANK de los precursores osteoclásticos lo que frenará el proceso de funcionalización osteoclástica (Montenegro et al., 2002). Por tanto, funciona como un factor de inhibición de la osteoclastogénesis.

Por tanto y dicho de otro modo, la osteoclastogénesis está en gran parte regulada por una tríada de proteínas que consisten en un ligando RANK-L, su receptor RANK y un receptor “de reclamo” OPG. De este modo, la unión de RANK-L a RANK conduce a la osteoclastogénesis, ya que inhibe la apoptosis de osteoclastos (Quinn et al., 2005; Quinn et al. 2013). La unión de RANK-L a OPG, evita la osteoclastogénesis producida por la unión RANK-L/RANK, así aumenta de los niveles de OPG, lo que lleva a una rápida reducción en el número de osteoclastos. De esta forma, el equilibrio entre RANK, RANK-L, y OPG es un importante factor de control de la cantidad de osteoclastos (Quinn et al. 2013; Kajarabille et al. 2013).

Varios estudios han demostrado que los estrógenos incrementan la producción de OPG por los osteoblastos y células del estroma, lo cual controlaría en gran medida la

osteoclastogénesis. Si tras la menopausia la mujer se encuentra en un estado de privación estrogénica, perdería esta capacidad reguladora y el aumento de la actividad RANK-L/RANK parecería ser la responsable de la pérdida ósea que se experimenta en la posmenopausia (Murakami et al. 1998; Takai et al. 1998).

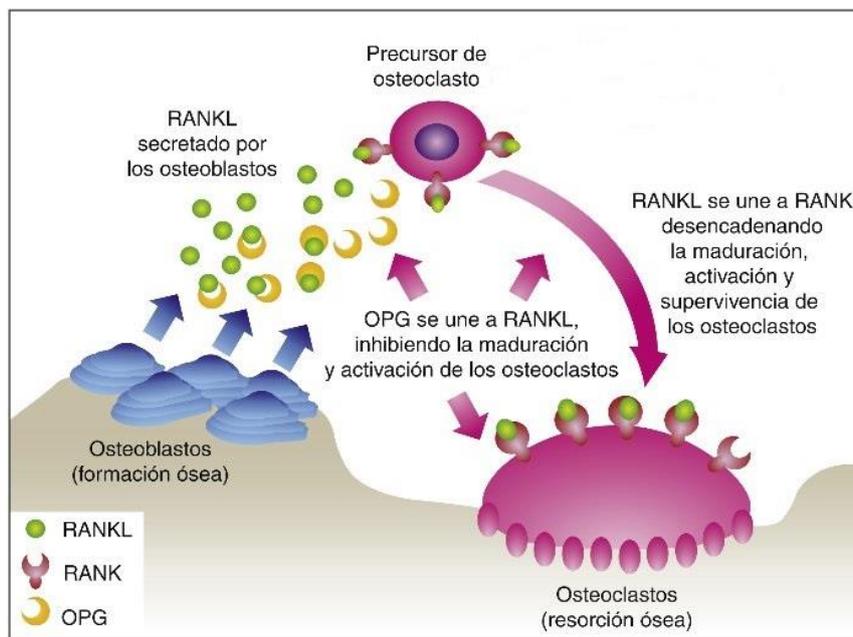
La disminución de la expresión de OPG se asocia a severos cuadros de osteoporosis, aumento de la actividad osteoclástica, como así también calcificación arterial severa, lo que indica el papel protector de la osteoprotegerina en el sistema vascular. La administración parenteral de OPG recombinante en roedores normales produce aumento de la masa ósea y previene la pérdida ósea inducida por ovariectomía sin los efectos colaterales esqueléticos y extraesqueléticos. Por ello, se sugiere como tratamiento para la osteoporosis postmenopáusicas (Montenegro et al., 2002).

Los mecanismos que regulan la expresión de RANK-L y OPG son solo conocidos en parte, pero se sabe que son modulados por diversas hormonas calciotropas y por otros factores humorales. Así, diversos factores pro-resortivos, como el calcitriol, PTH, glucocorticoides, interleucinas IL-1 y IL-11 o prostaglandinas E2 (PGE2) estimulan la producción de RANK-L (Riancho J.A. 2003). La PTH estimula la liberación al medio del RANK-L. Los niveles elevados de PTH aumentan el RANK-L y disminuyen la expresión de la OPG por los osteoblastos, produciendo un efecto catabólico en el hueso. El sistema OPG/RANK-L/RANK es por tanto un sistema regulador importantísimo del metabolismo óseo, con un equilibrio muy estrecho entre los procesos de formación y resorción ósea (Coetzee et al. 2007).

El papel de los mediadores lipídicos en esta vía de señalización (en la que se promueve tanto la osteoclastogénesis como la osteoblastogénesis), es crítica. La PGE2 es liberada por osteocitos y osteoblastos maduros (Bonewald 2011). El ácido araquidónico (AA, 20: 4n- 6), es el sustrato para la síntesis de PGE2, así como la expresión de la ciclooxigenasa COX-2, que oxida el AA a PGE2 (Smith 2005). La PGE2 promueve la osteoclastogénesis mediante la estimulación de la expresión de ambos RANK-L y RANK, y la inhibición de la expresión de OPG. PGE2 también activa la vía de señalización Wnt y promueve la unión del core binding factor-1 (CBFA-1) y la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1),

estimulando así osteoblastogénesis (Yoshida 2003). La PGE2 es un potente modulador del proceso de remodelado óseo, ambos procesos, la formación y la resorción, están relacionados con la PGE2, sus efectos sobre el hueso pueden ser dependientes de la dosis. En niveles altos, la PGE2 inhibe los osteoblastos, promueve la diferenciación de osteoclastos y por tanto la resorción ósea, mientras que los niveles bajos estimulan la formación de hueso por los osteoblastos (Griel et al. 2007; Kajarabille et al. 2013).

Figura 8: Efectos del sistema OPG/RANK-L/RANK sobre los osteoclastos (osteoclastogénesis).



Boyle WJ et al., 2003, Nature.

Por otro lado, la leptina y la insulina también pueden tener influencia en el metabolismo del hueso. La leptina es una hormona producida principalmente por las células adiposas del tejido graso, directamente relacionada con la grasa corporal, participa en el metabolismo de la grasa y controla el apetito, por lo que su función principal se da sobre el balance energético, con receptores distribuidos ampliamente por múltiples tejidos y células del organismo (Barbour et al. 2012). Se han descrito acciones sobre el hueso, a través de dos mecanismos alternativos: Uno periférico directo, estimulante de la formación y crecimiento óseo que

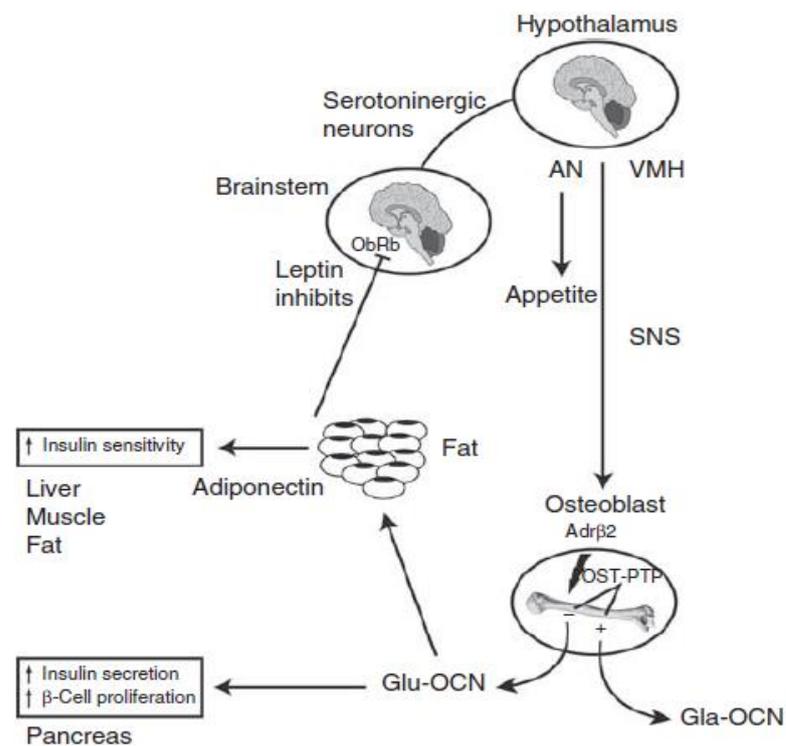
inhibe la resorción ósea; y otro central indirecto, a nivel del hipotálamo, que inhibe la formación ósea y probablemente también la resorción ósea, influyendo así de forma indirecta sobre la masa ósea (Williams et al. 2011; Schwetz et al. 2012).

Se ha demostrado *in vitro* que la leptina es un factor anabólico óseo directo. Las células del estroma de la medula ósea poseen el receptor de la leptina, capaz de activar los mecanismos de señalización adecuados para la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Handschin et al. 2007; Barbour et al. 2012), con síntesis de proteínas de la matriz ósea tales como el colágeno tipo I, osteocalcina etc. La leptina inhibe la apoptosis de los osteoblastos e incrementa la mineralización (Quesada 2006). Además de las acciones sobre los osteoblastos, hay evidencias consistentes de que la leptina modula la resorción ósea inhibiendo la osteoclastogénesis. Inhibe la expresión del RANK-L, además de inducir la producción de OPG, tanto en osteoclastos como en sus precursores estromales (Holloway et al. 2002; Williams et al. 2011).

Estos datos *in vitro* fueron confirmados por estudios de intervención *ex vivo*, que evaluaban los efectos de la acción de la administración periférica de leptina. Su administración a ratones deficitarios en la hormona producía un efecto estimulador sobre el hueso, con un gran incremento en la formación de hueso cortical (Steppan et al. 2000) (Hamrick et al. 2005). De hecho, la administración subcutánea de leptina a ratas era suficiente para prevenir más de la mitad de la pérdida de hueso y las alteraciones estructurales inducidas por la deficiencia estrogénica (Burguera, 2001). Por tanto, los resultados *ex vivo*, avalaban que la leptina estimulaba la formación y disminuía la resorción ósea (Quesada 2006). Hay sin embargo evidencias que sugieren que la leptina puede tener una influencia negativa sobre el hueso vía sistema nervioso central. La administración intracerebroventricular de leptina en ratones, produce una inhibición de la formación ósea, sugiriendo un efecto negativo sobre la masa ósea a través de un mecanismo hipotalámico (Ducy et al. 2000; Williams et al. 2011). Con esta doble influencia de la leptina, su verdadero papel e importancia sobre el hueso no está del todo definido (Capellán 2000; Quesada 2006). Sin embargo, los resultados de otro estudio con ratas deficientes en el receptor de leptina demostraron que la masa ósea y fuerza estaban reducidas en ausencia de señal de leptina, indicando que la leptina actuaría una vez

más como factor anabólico óseo y, coincidiendo con otros estudios y su papel *in vitro* se sugiere que los efectos directos de la leptina sobre las células óseas tenderían a anular sus acciones a través del sistema nervioso central (SNC), predominando su papel anabólico (Williams et al. 2011; Confavreux 2011).

Figura 9: La leptina inhibe la formación de hueso a través de la serotonina (vía cerebro al hipotálamo) y a través del hipotálamo, generando tono simpático. A su vez, los osteoblastos secretan osteocalcina, la cual regula el metabolismo energético, a través de su estimulación de la secreción de insulina. ADRB2, receptor b2-adrenérgico; AN, núcleo arqueado; Gla-OCN, osteocalcina carboxilada; Glu-OCN, osteocalcina descarboxilada; ObRb, receptor de leptina; OST-PTP, proteína tirosina fosfatasa osteotesticular; SNS, sistema nervioso simpático; VMH núcleo ventromedial del Hipotálamo.



CB Confavreux; Kidney International (2011) 79.

La insulina también modula el metabolismo óseo, estimulando la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (Fernández-

Tresguerres et al. 2006). Tiene efectos mitógenos sobre los osteoblastos, por lo que se pensó que podía contribuir a la mayor densidad de masa ósea (DMO) en pacientes obesas (Quesada 2006).

Un receptor de insulina es expresado por los osteoblastos y la exposición de los osteoblastos a niveles fisiológicos de insulina aumenta los marcadores óseos anabólicos, incluyendo la síntesis de colágeno (Fulzele et al. 2010). Además, los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 pueden desarrollar osteopenia u osteoporosis de forma temprana (Kemink et al. 2000) y tienen una mayor riesgo de fracturas por fragilidad (Janghorbani et al. 2006). Anormalidades óseas parecidas se observaron en modelos animales con diabetes mellitus tipo I que también presentan pérdida ósea debido a la formación reducida de hueso. Se vio que la administración de insulina localizada acelera la curación en estos modelos mediante la mejora de la osteogénesis (Gandhi et al. 2005).

Además, los resultados de un estudio realizado en ratones sugiere la existencia de una relación entre el páncreas y el hueso, a través de la cual la señalización de la insulina en los osteoblastos estimula la producción de osteocalcina (Fulzele et al. 2010).

Además de las citadas hormonas y marcadores del remodelado óseo, el papel de algunas citoquinas sigue siendo controvertido, explicando la interacción de las células de la médula ósea con las células de la línea osteoblástica. Una de las principales respuestas celulares producidas por las citoquinas es la síntesis y liberación de PGE2. Las citoquinas implicadas en el remodelado óseo incluyen el interferón, interleucinas, TNF- α y el sistema RANK/OPG anteriormente comentado. Muchas de ellas, como la IL-1, IL-6 y TNF- α aparecen incrementar la activación osteoclástica (Lafita 2003).

El TNF- α induce la respuesta de RANKL en las células osteoblásticas, por lo que promueve de forma directa la diferenciación y activación de los osteoclastos a través del RANKL (Fuller et al. 2002; Straburzyńska-Lupa et al. 2013).

La IL-6 por su parte, interactúa de manera compleja con las células implicadas en el proceso de remodelado óseo. Se ha comprobado que en la artritis reumatoide, promueve de

forma indirecta la osteoclastogénesis mediante el aumento de la liberación de RANK-L por los osteoblastos, y disminuye la proliferación de los osteoblastos en las etapas finales de la diferenciación. Así, la IL-6 posee la capacidad de afectar la función de diferentes tipos de células, incluyendo neutrófilos, células T, células B y monocitos (Abdel Meguid et al. 2013).

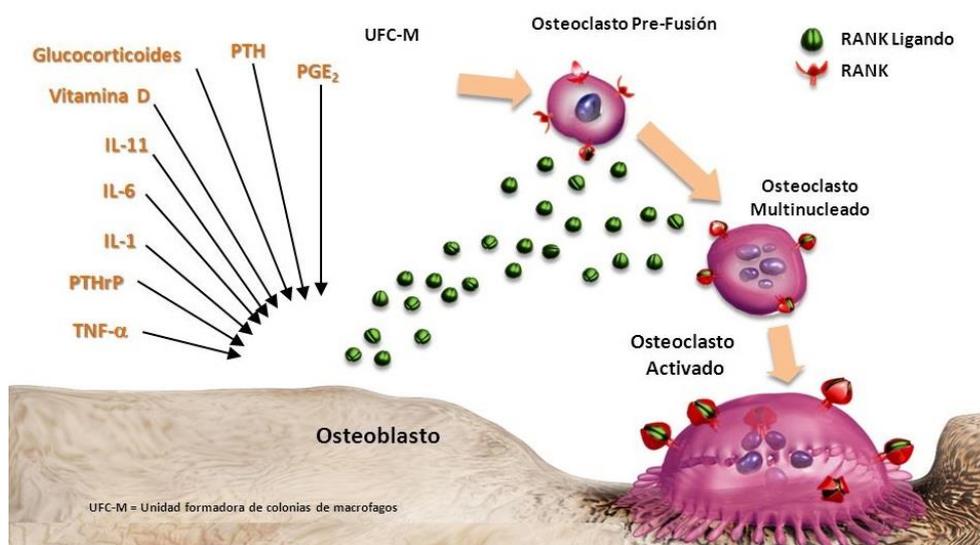
La IL-6 parece ser uno de los mediadores principales de los osteoclastos, jugando un papel crucial en osteoporosis, además de ser un factor importante en osteoporosis asociada a la artritis reumatoide. IL-6 activa vías de la resorción ósea, y es un regulador clave de activación del RANK-L y la OPG, además de ser un mediador importante en los procesos de diferenciación y activación de osteoclastos (Le Goff et al. 2010).

IL-6 parece mediar, al menos en parte, la resorción ósea por medio del TNF- α y la IL-1, ya que se ha comprobado que neutralizando los anticuerpos monoclonales anti-IL-6 se puede suprimir el desarrollo de osteoclastos mediado por el TNF- α y la IL-1.

Estudios realizados han demostrado que la IL-6 induce la expresión del mRNA del RANK-L. IL-6 utiliza la interacción entre RANK/RANK-L/OPG para ejercer un efecto indirecto sobre los osteoclastos, y promover así la activación de los osteoclastos y por lo tanto la resorción ósea (Steeve et al. 2004; Abdel Meguid et al. 2013).

La IL-6 puede promover indirectamente la osteoclastogénesis mediante el aumento de la liberación de RANK-L por las células sinoviales. Por otro lado también puede promover la diferenciación de osteoblastos, y del mismo modo también disminuye la proliferación de éstos en las etapas finales de la diferenciación. Por lo tanto, los efectos de la IL-6 sobre la remodelación ósea son complejos y pueden ocurrir en direcciones opuestas (Le Goff et al. 2010; Abdel Meguid et al. 2013).

Figura 10: Factores y citocinas que estimulan la expresión de RANK-L en los osteoblastos.



Boyle WJ et al., 2003, Nature. / Hofbauer LC & Shoppet MI, 2004 JAMA.

1.2.2 Remodelado óseo durante la gestación, lactancia y desarrollo del recién nacido

El proceso de remodelado óseo comienza tempranamente, en el útero, y continúa a lo largo de toda la vida del individuo. Durante la infancia y adolescencia, el proceso de formación excede a la resorción, resultando en la adquisición de hueso, tanto en largura como en diámetro; cambian de forma, aumentando su masa y densidad, llegando hasta un máximo que se alcanza entre los 30 y 40 años de vida (Indumati et al. 2007).

La gestación y lactancia son dos etapas en la vida de la mujer en la que se producen adaptaciones fisiológicas, dentro de las cuales se incluyen cambios en el metabolismo óseo, como mecanismos compensatorios para asegurar el adecuado desarrollo mineral del feto y la protección necesaria al esqueleto materno (Glerean 2000; Vidal et al., 2008).

Los riñones, intestino y el esqueleto (a través de la resorción ósea) no son las principales fuentes que suministran minerales en el feto, como ocurre en el adulto. En lugar de ello, la placenta responde a la necesidad del feto mediante el transporte activo de calcio, fósforo, y magnesio a partir de la circulación materna. Esto ocurre especialmente durante el tercer trimestre del embarazo, con el fin de osificar la matriz colágena del esqueleto fetal antes del nacimiento (Cancelo, 2012; Kovacs 2014).

Durante la gestación, el incremento en las demandas del calcio es mantenido por la mejora de la absorción intestinal, mediada por la vitamina D (Yoon et al. 2000). La disponibilidad de minerales también influye en la función y la actividad de los osteoblastos y osteoclastos (Kovacs 2014).

El metabolismo óseo y mineral en el feto están ligados de forma directa con la PTH y a la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), ya que ambas se requieren para la transferencia placentaria de calcio; mientras que la vitamina D/calcitriol, FGF23 (Fibroblast growth factor 23), calcitonina, y los esteroides sexuales, no son tan necesarios como lo es la PTH (Kovacs 2013). De hecho, los niveles de PTH se encuentran ligeramente descendidos en el primer trimestre y normal en los otros dos, lo cual puede representar una supresión modesta de la glándula paratiroides al inicio del embarazo (Vidal et al., 2008); Cancelo, 2012). Pero los niveles PTHrP parecen contribuir al estado funcional de hiperparatiroidismo materno, que mantiene el gradiente de calcio materno-fetal necesario, además de regular la formación de hueso endocondral en los seres humanos (Glerean 2000; Klopocki et al. 2010).

En las etapas tempranas del embarazo, la concentración de osteocalcina se encuentra disminuida y luego incrementa a partir del tercer trimestre de gestación y permanece elevada durante la etapa de lactancia, lo cual refleja el alto turnover óseo que se da en la madre, que contribuiría al aporte de calcio necesario para la maduración esquelética del feto y del recién nacido (Glerean 2000). Yoon et al. (2000), encontraron niveles de osteocalcina significativamente reducidos a las 16 semanas de gestación y elevados luego a las 6 semanas posparto; así como un marcador de resorción ósea (desoxipiridolina) aumentado a partir del segundo trimestre.

Durante el último trimestre de gestación, hay un aumento exponencial en la formación de hueso, en el cual se produce el 80% del hueso fetal, al tanto que el calcio total en el hueso aumenta de 5 g aproximadamente en la semana 24 hasta 30 g al término. El pico de la tasa de acumulación de hueso se produce alrededor de las 32 semanas de gestación. Para atender a esta elevada demanda de calcio y fósforo en este periodo de rápida formación ósea durante el último trimestre, hay un transporte activo placentario de calcio y fósforo de la madre al feto (Kovacs 2011; Kovacs 2013). Esta disminución del calcio total en la madre, se considera entre un 5 y 6% del nivel pre-embarazo alcanzando un valle en la mitad del tercer trimestre y luego se incrementa ligeramente (Kohlmeier & Marcus 1995; Glerean 2000).

La absorción intestinal de calcio se duplica durante el embarazo, particularmente en el último trimestre. La excreción urinaria de calcio también se incrementa en forma proporcional al filtrado glomerular. El incremento en la síntesis de metabolitos activos de la vitamina D, la secreción elevada de prolactina y la hipertrofia intestinal producida parecen contribuir a este estado de hiperabsorción intestinal e hipercalciuria (Glerean 2000). Gertner et al., evaluaron la respuesta de la calcemia a la ingestión de calcio oral en mujeres en su tercer trimestre de embarazo. En este estudio observó un aumento del 40 al 80% de los niveles de calcemia con respecto a las mediciones basales (Gertner et al. 1986).

Después de la gestación, la lactancia materna continúa demandando mayor aporte de calcio para concentrarlo en la leche materna. Para compensar el mayor incremento de calcio por la producción de la leche materna, las adaptaciones maternas incluyen tanto la resorción ósea como la reabsorción renal de calcio, mecanismo que se evidencia hasta el sexto mes post-lactancia (Yoon et al. 2000). Varios estudios encuentran que las mujeres lactantes tienen tendencia a una mayor resorción comparadas con las no lactantes (Sowers et al. 1996; Yoon et al. 2000) y se calcula que en esta etapa de la vida, la mujer pierde adicionalmente entre un 2-7% de masa ósea en columna lumbar y cuello femoral. Sin embargo, la masa ósea perdida durante la gestación y lactancia se tiende a recuperar después del destete y no incrementaría el riesgo de osteoporosis (Vidal et al., 2008).

A pesar de que se identifican niveles aumentados de calcitonina en el embarazo, producido por las células C hipertrofiadas del tiroides y posiblemente en mama y placenta, no parece tener una repercusión significativa en el metabolismo del calcio en el embarazo. En cambio, la vitamina D incrementa sus niveles séricos al doble de la no gestante. (Cancelo 2012).

Estos mecanismos fisiológicos compensadores permiten, en la mayoría de los casos, hacer frente a los requerimientos necesarios para la formación y mineralización del esqueleto fetal y la nutrición del recién nacido, superando este periodo sin mayores dificultades. Sin embargo, algunas mujeres experimentan una desmineralización ósea que puede verse complicada con fracturas y un pequeño grupo sufre desmineralizaciones regionales (Cancelo, 2012).

La osteoporosis asociada al embarazo o lactancia es una rara complicación que puede causar problemas clínicos en mujeres susceptibles. Los embarazos repetidos podrían aumentar el riesgo de osteoporosis en estas mujeres con baja densidad ósea, especialmente asociada a lactancia prolongada (Yoon et al. 2000).

Una cuestión planteada es la repercusión que estos cambios tendrían en el hueso materno. Estudios en animales sugieren que no se producen modificaciones sustanciales en el contenido mineral del hueso ni en su estructura. De hecho, estudios epidemiológicos no establecen una relación entre la paridad y el tiempo de lactancia con la baja masa ósea y riesgo de fractura en épocas posteriores de la vida (Sowers et al. 1996; Turan 2011). Se podría considerar que en la mujer sana, el embarazo y lactancia inducen cambios en el hueso, pero que, sin embargo, no tienen efectos a largo plazo sobre la salud del hueso (Cancelo, 2012).

De acuerdo con el paradigma de Utah (Frost 1997), el hueso se forma en dos etapas: una primera etapa de embriogénesis del sistema esquelético y una segunda etapa de formación ósea que comienza en la segunda mitad del segundo trimestre. El crecimiento diametral en los huesos largos se produce a través de modelos en los que los osteoclastos remueven el hueso del endostio y los osteoblastos forman hueso a lo largo del periostio.

Durante la infancia, especialmente en los primeros cuatro años de vida, es el momento en el que los fenómenos de recambio óseo alcanzan su máxima intensidad. Esto se manifiesta por los altos niveles de osteocalcina y propéptido sérico. En un estudio que evaluaba marcadores de remodelado óseo, el análisis en sangre de cordón mostró niveles de ambos marcadores de formación y resorción bastante elevados, mientras que la PTH se mantuvo disminuida (Uemura et al., 2002). La sangre del cordón umbilical por lo general, contiene bajos niveles de PTH y calcitriol, niveles normales o bajos de FGF23, y altos niveles de PTHrP y calcitonina. Después del nacimiento el calcio en sangre cae en un 20-30%, seguido de un aumento durante las siguientes 24h., donde se alcanzan los niveles de adultos; el aumento de la PTH precede a un aumento de calcitriol (Kovacs 2011). La absorción intestinal de calcio en el recién nacido (especialmente en los prematuros) es en gran medida un proceso pasivo y facilitado por el alto contenido de lactosa de la leche materna. Es por esto que los bebés prematuros no responden al calcitriol, pero dependen inicialmente de la absorción pasiva de minerales. A medida que el neonato madura, la absorción de calcio intestinal (dependiente del calcitriol) se convierte en el mecanismo dominante (Kovacs 2013).

Los recién nacidos prematuros están en significativo riesgo de contenido mineral óseo deficiente y subsecuente enfermedad ósea. El recién nacido de bajo peso, al alcanzar el equivalente a término presenta una DMO significativamente reducida comparada con los recién nacidos a término y podrían no alcanzar valores normales hasta después del año de vida (Harrison et al., 2007).

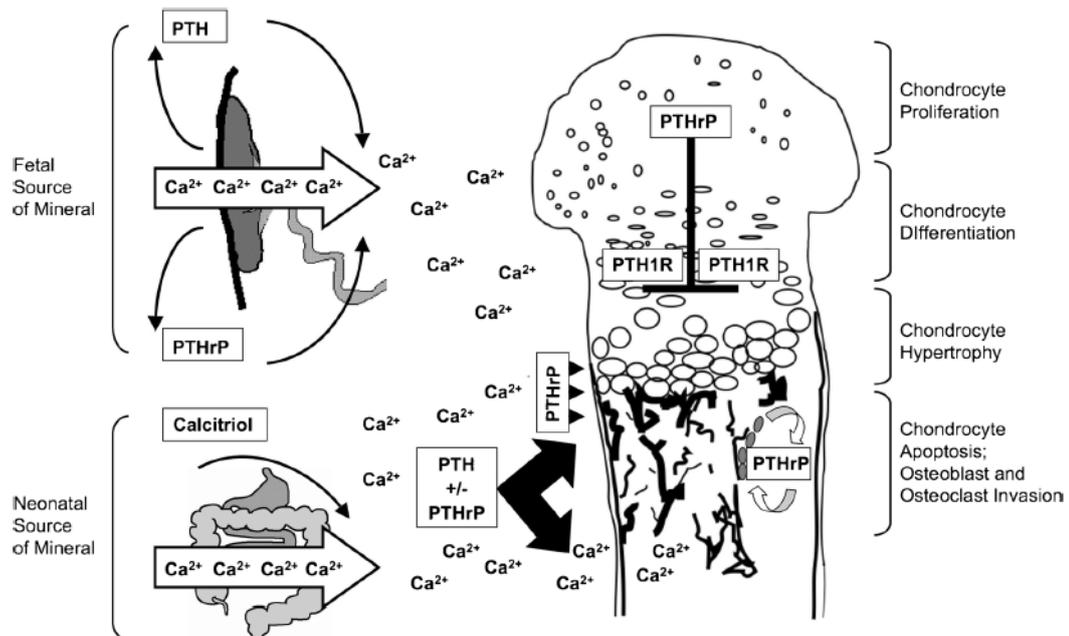
La enfermedad ósea metabólica es un problema relativamente frecuente, observado en la evolución de estos recién nacidos prematuros. Se han descrito anomalías óseas y del metabolismo mineral en recién nacidos de bajo peso durante los primeros días de vida. El déficit del contenido mineral óseo de los prematuros respecto de los a término, sugiere un trastorno de la formación y/o remodelado óseo en el prematuro, trastorno que puede ser secundario a un déficit en el proceso global de mineralización o al remodelado del hueso normalmente mineralizado, o bien una combinación de ambos (Narbona 2000; Kovacs 2013).

Aunque inicialmente se explicó la enfermedad ósea del prematuro por la disminución de la formación ósea por insuficiente disponibilidad de calcio y fósforo, la evidencia reciente muestra que hay un aumento en la resorción ósea lo cual se manifiesta en estudios en los que se encontraron marcadores de resorción ósea elevados en orina comparados con los niños a término (Marvin, 2003).

En los recién nacidos con crecimiento intrauterino retardado, por la alteración en la transferencia de minerales, se produce una reducción de la mineralización ósea y de la velocidad de formación del hueso, aumenta la PTH y disminuye la osteocalcina y vitamina D. (Tsukahara et al. 1998; Narbona 2000).

En definitiva, el esqueleto fetal y neonatal requiere el contenido mineral adecuado con el fin de desarrollar y mineralizar normalmente. Ambas, PTH y PTHrP, son esenciales para mantener altos niveles séricos de calcio y fósforo en el útero, para llevar a cabo una óptima mineralización ósea óptima. Del mismo modo, el desarrollo de hueso endocondral durante el desarrollo fetal requiere PTH y PTHrP, pero no calcitriol, calcitonina o (probablemente) esteroides sexuales. Es en el período neonatal cuando la absorción de calcio intestinal y, por lo tanto, el desarrollo del esqueleto y la mineralización se vuelven dependientes de la vitamina D/calcitriol (Kovacs 2013). Durante la lactancia, la mayoría de los estudios han demostrado un incremento en el remodelado óseo. Esto puede suceder en parte debido a una disminución del estradiol en plasma y un aumento de la prolactina en plasma y PTHrP durante la lactancia (Møller et al. 2013; Kovacs 2013).

Figura 11: Funciones de la hormona paratiroidea (PTH), la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y el calcitriol durante la vida fetal y neonatal.



Christopher S. Kovacs, 2013. Pediatrics Nephrology.

Por otro lado, las células óseas clásicas (osteoclastos y osteoblastos), las del sistema inmune (monocitos, macrófagos, linfocitos), los fibroblastos y células del estroma producen citoquinas o factores que interactúan entre sí, en forma autócrina y/o parácrina y que junto con las hormonas calciotrópicas, regulan y modulan el proceso de remodelado óseo (Glerean 2000).

El $TNF-\alpha$, la IL-1 y la IL-6 han sido detectadas en el líquido amniótico humano. En el parto a término normal se halló un aumento moderado de las IL-1 y IL-6 en el líquido amniótico. Su presencia sería un marcador de maduración, debido a que está ausente en el celoma extraembrionario o en el líquido amniótico en el primer trimestre, aumentando su concentración a medida que avanza la edad gestacional. La IL-6 en el suero materno también se incrementa a medida que avanza el embarazo, alcanzando su mayor nivel a partir de la

iniciación del parto (Sissel et al., 1993). Estas interleucinas activan el remodelado óseo tanto in vivo como in vitro y podrían estar involucradas en la homeostasis del calcio durante el embarazo. Además, la evidencia sugiere que la progesterona induce la producción de la IL-1 durante el embarazo, que ejerce un efecto trófico sobre el remodelado óseo (Glerean 2000).

1.3 REMODELADO ÓSEO, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la sobreproducción de ROS induce un desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes en células y tejidos causando el denominado estrés oxidativo, el cual se ha relacionado con el envejecimiento, la inflamación y la degeneración de tejidos.

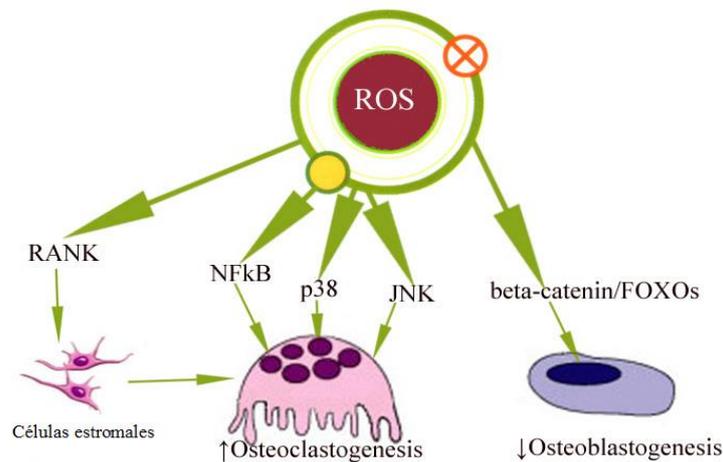
De acuerdo con la evidencia científica, existe una relación entre el metabolismo óseo y la regulación del equilibrio redox, lo que indica que las ROS pueden desempeñar un papel importante, ya que inhiben la formación de osteoblastos. Las ROS también están involucradas en la homeostasis y la degradación del cartílago, en concreto con respecto al desarrollo de la osteoartritis.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica que causa destrucción de la articulación. Aunque la AR no está generalmente reconocida como una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo, se ha visto que el nivel de ROS en pacientes con AR es mayor que en sujetos sanos. Las investigaciones realizadas ponen de manifiesto que las ROS podrían ser moduladores clave de la función celular ósea y jugar un papel como mediadores de señalización intracelular. Por lo tanto, el efecto que las ROS podrían tener sobre el metabolismo óseo es aún controvertido (Ziskoven et al. 2010).

A nivel molecular, las vías de respuesta al estrés celular son controladas por cuatro categorías de moléculas y reguladores de transcripción: la señal insulina / IGF-1, las sirtuinas, dianas de la rapamicina, y las vías dependientes de la proteína quinasa activada AMP. Todas estas vías tienen una diana molecular en común, llamada FoxO. Estas dianas FoxO juegan un papel importante en la biología del hueso, manteniendo las condiciones fisiológicas adecuadas de los osteoblastos maduros, y modulando de la actividad de otros factores de transcripción tales como la β -catenina. Un exceso de estrés oxidativo puede inhibir esta defensa antioxidante proporcionada por las FoxO. Entre las diferentes isoformas de FoxO, la FoxO1 actúa a nivel de osteoblastos para preservar el equilibrio redox mediante la estimulación de la síntesis de proteínas, y la posterior inhibición de la detención del ciclo celular, manteniendo así una proliferación normal de osteoblastos y la homeostasis del tejido óseo (Rached et al. 2010; Kousteni 2011).

Como se ha comentado al principio, el remodelado óseo se lleva a cabo por los osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células de resorción ósea). Cuando este equilibrio se inclina a favor de los osteoclastos se da la resorción ósea, lo que lleva al desarrollo de enfermedades óseas. Las ROS están involucradas en la apoptosis de los osteoblastos y osteocitos, y por tanto en la resorción ósea, por lo que están también relacionadas con una menor masa ósea (Kousteni 2011). En realidad, las ROS tienen un amplio espectro de respuestas que van desde la proliferación, crecimiento o diferenciación, a la muerte celular mediante la activación de numerosas vías de señalización como, el factor de choque térmico y las MAPKs quinasas (MAPK p38), las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK5) y la c-Jun-N quinasa terminal (Almeida et al. 2007).

Figura 12: Vías de señalización activadas por las ROS que afectan a la formación de osteoblastos y osteoclastos. La activación RANK, inducida por RANK-L, estimula la producción de ROS, importante para la osteoclastogénesis. La resorción ósea inducida por ROS se produce a través de la modulación de quinasas y factores de transcripción, tanto en osteoclastos como en osteoblastos.



Kajarabille N et al., The ScientificWorld Journal, 2013.

Las ROS, y concretamente el H_2O_2 , juegan un papel crucial en la función de los osteoclastos y en su diferenciación. Las ROS aumentan el número de osteoclastos y la resorción mediante la estimulación de RANK-L y la expresión de $TNF-\alpha$ a través de las ERK y la activación del factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), el $TNF-\alpha$ además de causar daño celular, también inhibe la SOD (Bai et al. 2005).

$TNF-\alpha$ estimula la diferenciación de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*. Lo cual se da de forma indirecta a través de la supresión de la expresión de OPG y la estimulación de RANK en las células mesenquimales. $TNF-\alpha$ también activa los precursores de osteoclastos, ya que actúa directamente con RANKL. Este mecanismo directo puede producirse como resultado de una deficiencia de estrógenos, lo cual conduce a un aumento de $TNF-\alpha$ (Cenci et al. 2003; Barbour et al. 2012; Straburzyńska-Lupa et al. 2013).

Por su parte, el RANK-L se une a su receptor, RANK, promoviendo la diferenciación en los osteoclastos maduros. Por otro lado, la OPG evita la unión de RANK-L a RANK. Las alteraciones en el sistema RANK-RANK-L-OPG debidas al aumento en la actividad de

RANK-L, sean relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades óseas, incluyendo la osteoporosis y la enfermedad ósea inflamatoria. El aumento de la actividad de los osteoclastos puede llevar a un aumento de la formación del anión superóxido (O_2^-) generación y/o inhibir la actividad de SOD y GPx, con la consecuente destrucción ósea (Sheweita & Khoshhal 2007).

Los osteoblastos pueden producir antioxidantes tales como GPx, así como factor de crecimiento transformante- β , que está implicado en la reducción de la resorción ósea, para proteger así al hueso contra el daño oxidativo. Bai et al. (2005) comprobaron que el aumento intracelular de H_2O_2 suprime el proceso de diferenciación de los osteoblastos. El H_2O_2 también es capaz de inhibir la diferenciación de células de la línea celular de osteoblastos (MC3T3-E1) y la línea de células estromales de la médula (M210B4) que también se diferencia a osteoblastos (Filaire & Toumi 2012; Manolagas 2010).

En respuesta al estrés, los genes de reparación del ADN contrarrestan los efectos del daño oxidativo, lo cual resulta un mecanismo homeostático indispensable para la salud del esqueleto. Esta respuesta implica la regulación de la expresión de la enzima mitocondrial SOD2 y la catalasa (Kousteni 2011). Además, las FoxO pueden controlar la formación de nuevos osteoblastos a partir de sus progenitores, las células madre mesenquimales, ya que modulación de su proliferación y/o diferenciación a través de sus propiedades antioxidantes. Algunos estudios han encontrado una disminución en la actividad antioxidante en pacientes con osteoporosis. La GPx es la enzima principal responsable de la degradación intracelular de H_2O_2 , la cual es altamente expresada en osteoclastos, en macrófagos de la médula ósea mediante el RANK-L, y en los osteoclastos mediante los estrógenos. La sobreexpresión de GPx en progenitores de osteoclastos inhibe la formación de osteoclastos, así como la activación de NF- κ B inducida por RANK-L y aumento la resistencia al daño oxidativo (Ritchlin et al. 2003). El estrés oxidativo actuó como un factor de riesgo para la osteoporosis vinculado al aumento de la relación entre SOD/GPX. Por lo tanto, el desequilibrio propiciado por una mayor actividad de la SOD con respecto a la GPx, lleva a un aumento de los niveles H_2O_2 , conduciendo a un mayor estrés oxidativo (Filaire & Toumi 2012).

Por otro lado y para finalizar, el hecho de que los osteoclastos son en gran parte responsables de la resorción ósea, ha llevado a realizar diversas investigaciones para dilucidar el papel que desempeñan las citoquinas y mediadores inflamatorios, que a su vez tienen la capacidad de inducir la diferenciación y activación de estos osteoclastos (Anandarajah & Schwarz 2006).

Como se ha explicado, el RANK-L juega un papel importante en el control de la osteoclastogénesis. Durante este proceso el tejido sinovial inflamado produce una variedad de citoquinas y hormonas que también pueden influir en la actividad de los osteoclastos. Entre estos factores se encuentra: las interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, el TNF- α , el factor estimulante de colonias de macrófagos, y el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Anandarajah & Schwarz 2006; Barbour et al. 2012).

El papel de estas citoquinas en la resorción ósea y en la inflamación, muestra que podría existir una relación entre el sistema inmune y la resorción ósea. Según algunos estudios realizados, las células-T activadas tras el proceso de inflamación que se da en la artritis reumatoide, promueven la formación de RANK-L. De hecho se sabe que las células T activadas, desempeñan un papel central en la patogénesis de la artritis reumatoide, contribuyendo a la resorción ósea mediada por los osteoclastos a través de la expresión de RANK-L (Gravallese et al. 2000; Clowes et al. 2005; Barbour et al. 2012).

En la resorción ósea asociada a la artritis, la IL-17 productora de células-T helper juegan un papel importante en la activación del RANK-L. El RANK-L estimula la osteoclastogénesis a través del factor nuclear de células T citoplasmáticas activadas, el cual es un regulador crucial de la respuesta inmune. Además de las interacciones celulares a través de citoquinas, ambos sistemas, inmune y óseo, comparten diversas vías moleculares, que incluyen los mismos receptores de membrana, moléculas de señalización y factores de transcripción (Nakashima & Takayanagi 2009).

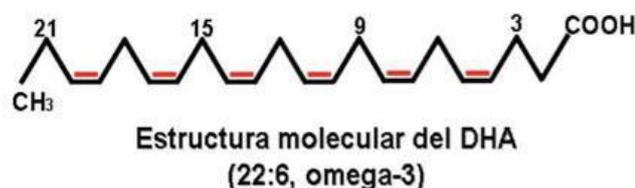
1.4 ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)

1.4.1 Fuentes y síntesis endógena

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga perteneciente a la serie omega-3.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6) constituyen dos de las series más grandes e importantes entre los ácidos grasos esenciales. El ácido linoleico (LA 18: 2n-6) es el precursor de cadena larga de la serie omega-6, que se puede transformar en araquidónico ácido (AA). Ácido α -linolénico (ALA 18: 3n-3), perteneciente a la serie omega-3, y puede transformarse en ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). El DHA por tanto, es un ácido graso altamente insaturado, que posee 6 enlaces dobles (C22:6) y pertenece a la familia de ácidos grasos omega-3 (Bradbury 2011; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Figura 13: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA).



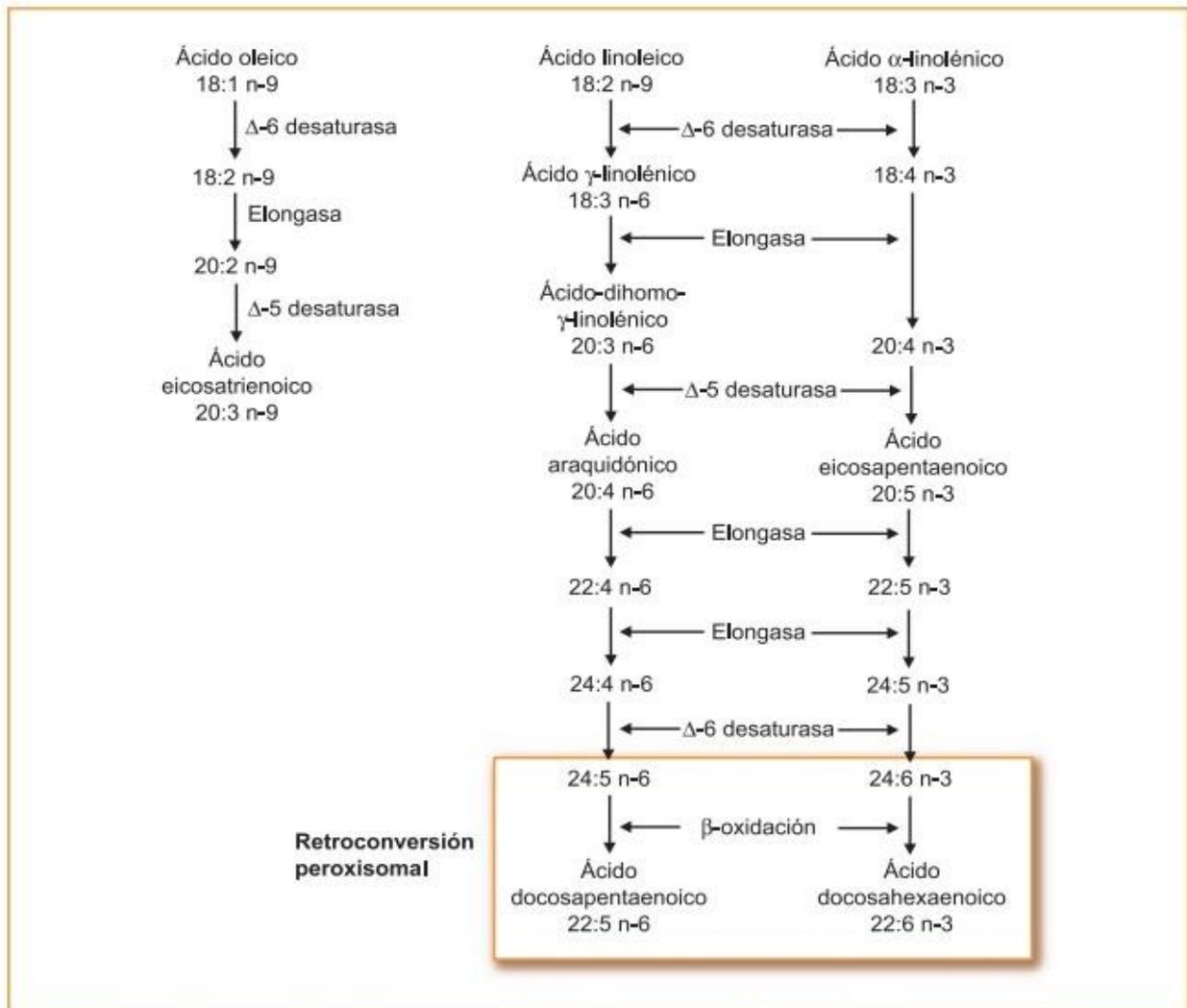
Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son considerados esenciales puesto que su síntesis en humanos es limitada, por lo que deben estar presentes en la dieta en determinada cantidad y proporción entre ambos (Gil 2010; Gil-Campos 2010). Además, se ha observado

que la conversión a DHA varía entre sexos, siendo más eficiente en mujeres, como se explica más adelante. Esta síntesis se incrementa durante el embarazo y se ve disminuida en recién nacidos, así como en personas ancianas, debido a una menor actividad enzimática (Abedi & Sahari. 2014).

En este caso, el DHA no se considera un ácido graso esencial, ya que puede ser sintetizado a partir del ácido graso linolénico, que es precisamente el que se considera esencial. No obstante, dada la limitada capacidad de síntesis endógena, la alta variabilidad en la formación de DHA a partir del ALA (1-5%) y debido a sus críticas funciones sobre el desarrollo visual y neuronal y sobre otros sistemas biológicos, debe ser considerado condicionalmente esencial en etapas tempranas de la vida y por tanto condicionalmente requerido en la dieta (Gil-Campos, 2010; Zeisel, 2009).

Los AGPI se sintetizan a partir sus precursores LA o ALA, utilizando los mismos complejos enzimáticos de para ambas vías, así en la mitocondria las elongasas aumentan el tamaño de la cadena hidrocarbonada y las desaturasas introducen nuevos dobles enlaces, finalmente en los peroxisomas se la β -oxidación. El primer metabolito de la serie n-6 es ácido γ -linolénico (18: 3n-6) sintetizado con la enzima Desaturasa que actúa sobre ALA para producir ácido estearidónico (18: 4n-3), el primer metabolito de la serie n-3. Los principales productos finales de las familias de n-6 y n-3, son AA (20: 4N-6) y DHA (22: 6n-3), respectivamente, sintetizados por Δ 5-desaturasa partiendo de EPA (20: 5n-3) que es un intermedio fundamental de la vía de los n-3. Las enzimas limitantes en ambas cascada metabólicas de LA a AA, son la Δ 6-desaturasa y Δ 5-desaturasa (Huffman et al. 2011; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Figura 14: Síntesis de AGPI omega-3 y omega-6 a partir de sus precursores.



La afinidad de la Δ6 desaturasa por el ALA (omega-3) es mucho mayor que por el AL. Por eso si el aporte de ALA es muy elevado, la síntesis de derivados del AL (omega-6) se ve disminuida. Por el contrario, un aporte dietético constituido mayoritariamente por ácidos grasos omega-6, puede inhibir significativamente la formación endógena de ácidos grasos omega-3, en especial EPA y DHA (Gil-Campos M. 2010).

Este hecho ocurre en el mundo occidental ya que nuestra dieta contiene de 10-20 veces más ácidos grasos de la serie omega-6 que omega-3, lo que hace que la vía prioritaria se la enzima $\Delta 6$ desaturasa sea la serie omega-6, a pesar de que en un principio presenta mayor especificidad por el ALA (Gil 2010).

Además hay que añadir que el contenido de ácidos grasos del plasma y muchos otros tejidos donde también predominan los ácidos grasos de la serie omega-6, excepto el cerebro y la retina, que son tejidos ricos en omega-3. Debido a la competencia enzimática, una ingesta elevada de EPA y DHA se traduce en un descenso de la concentración de ácido araquidónico y un aumento de la de EPA y DHA en los tejidos (Bradbury 2011).

La relación entre los ácidos grasos omega-6/omega-3 en la dieta, es conocida por su importancia nutricional, ya que es la clave para la síntesis equilibrada de eicosanoides en el organismo. Cuando la dieta es rica en ALA, con un menor consumo de LA, los niveles de EPA y DHA aumentan en el tejido muscular, debido a que disminuye la competencia por $\Delta 6$ desaturasa. Para una nutrición óptima en el lactante, la relación de n-6/n-3 no debe ser superior a 10. Estudios realizados por grupos de investigación estiman que la relación óptima de ácidos grasos omega-6:omega-3 en la dieta debe estar en torno a 5:1 o 10:1 como máximo (Gil 2010).

En cuanto a las fuentes de DHA, cabe mencionar que los principales productores de DHA son las microalgas (*Schizochy-trium*) y el krill (*Euphausia superba*) que forman parte del fitoplancton de las aguas marinas. Este DHA se transfiere a través de la cadena trófica al pescado azul, nuestra principal fuente alimenticia. En los alimentos, la fuente más importante de DHA es el pescado graso de agua fría (salmón, caballa, arenque, verdel, jurel anchoa y boquerón) y el aceite de pescado. Los aceites vegetales contienen ácidos grasos omega-3 de cadena más corta como el ALA, entre ellos se encuentra el aceite de nuez, lino, canola y calabaza, así como las propias nueces y las semillas de lino y calabaza (Gil 2010; Bradbury 2011).

La yema de huevo es una buena fuente de AGPI, especialmente de DHA. Ya que contiene 0,1% de EPA, 0,7% de DHA, y 0,8% de LA. Por otro lado, y a diferencia de la leche

de vaca y las fórmula infantiles, la leche materna contiene cantidades significativas de AGPI-CL, DHA y AA especialmente, que como se ha comentado anteriormente son necesarios para el desarrollo óptimo del sistema nervioso y la retina, además de otros tejidos (Abedi and Sahari 2014).

La biodisponibilidad de DHA y EPA también varía según el tipo del pescado que se consuma ya que no todos los aceites de pescado se digieren por igual. El EPA y DHA contenido en el pescado se encuentra principalmente en forma de triglicéridos lo que puede disminuir su disponibilidad (Gil 2010).

Los ácidos grasos omega-3 presentes en los alimentos y suplementos dietéticos están principalmente en forma de triacilgliceroles (TAGs) y como ácidos grasos libres o unidos a fosfolípidos. En menor cantidad, podrían encontrarse también en forma de éster etílico en suplementos concentrados sintéticamente. Comparando las diferentes formas de encontrarlos en la dieta, se observa que cuando están en forma de éster etílico se absorbe y se incorpora menos cantidad de EPA y DHA a las membranas y tejidos celulares. Mientras que cuando van unidos a fosfolípidos se observa mayor absorción e incorporación de DHA y EPA a las membranas y tejidos celulares, siendo también superior si se compara con la forma de TAGs (6) aunque no todos los estudios comparten este argumento (Gil 2010).

Además y como se ha comentado anteriormente, la conversión de ALA en EPA y DHA se ve afectada por varios factores, como el sexo y la inhibición competitiva de $\Delta 6$ desaturasa.

En hombres adultos, la conversión de ALA a EPA es de aproximadamente el 8%, sin embargo de EPA a DHA es demasiado baja (<0,1%), mientras que la eficiencia de conversión a DHA en mujeres es de más del 9%, lo cual puede ser debido a una menor proporción de ALA utilizada para la β -oxidación en el caso de las mujeres (DeFilippis & Sperling 2006). Además, debido a la acción de los estrógenos sobre la $\Delta 6$ desaturasa, las concentraciones de DHA aumentan durante el embarazo y periodo de lactancia (DeFilippis & Sperling 2006; Abedi & Sahari 2014).

La tasa de conversión es menor en la infancia, especialmente en prematuros, y hay evidencia acumulada de que en la edad temprana, los precursores no son suficientemente convertidos en DHA para permitir la normal bioquímica y funcionalidad, por lo que asegurar una adecuada ingesta de ácidos grasos esenciales, y especialmente DHA durante estas etapas de la vida es crucial (Innis & Friesen 2008).

Para los AGPI-CL, particularmente EPA y DHA y debido a que su mayor fuente son los productos del mar, la recomendación para los adultos en general es el consumo regular de pescado (2 veces por semana), especialmente las especies grasas (atún, salmón, sardina, etc). Cada ración, de promedio, debería aportar 200-500 mg de EPA + DHA (Gil 2010).

La biodisponibilidad de ácidos grasos esenciales (AGE) no ha sido la misma y tampoco ha sido constante a lo largo de la evolución. Actualmente, se ha producido una notable desproporción en la relación del consumo de AGE omega-6 y omega-3. Además, el bajo consumo de productos marinos en algunas poblaciones hace más crítico este desequilibrio, ya que, además del bajo consumo de ALA, también consumen muy poco DHA y EPA (Gil 2010; Bradbury 2011).

No existe unanimidad en cuanto a la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos omega-3. Las recomendaciones dietéticas de organismos nacionales e internacionales sobre la ingesta de ácidos grasos de cadena larga omega-3, principalmente EPA y DHA, varía entre 200-600 mg al día para adultos y entre 40-250 mg al día para lactantes mayores de 6 meses, niños y adolescentes (Abedi & Sahari. 2014).

De acuerdo con las recomendaciones dietéticas de la “American Heart Association Nutrition Committee” (AHANC), sugiere consumir pescado al menos dos veces por semana o 500mg LC-PUFA/día para prevenir y reducir el riesgo de las enfermedades del corazón (Krauss et al. 2000; Abedi & Sahari. 2014). La “European Food Safety Authority” (EFSA) recomienda tomar 250mg n-3 LC-PUFA por día, en contraste con el sugerido por los “Suggested Dietary Targets” (SDT) en Australia, que recomiendan 610mg para hombres y 430mg para mujeres de EPA + DHA por día, ya que consideran estas cantidades necesarias para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, se recomienda que los

preparados para lactantes contengan al menos el 0,2% de ácidos grasos totales de DHA y 0,35% de AA (Abedi & Sahari. 2014).

A su vez, se han hecho recomendaciones específicas para determinados grupos poblacionales. La ingesta de DHA en lactantes y niños de 6 a 24 meses de edad debe estar entre 70-100 mg al día basándose en su acumulación en el sistema nervioso central y sus efectos sobre el desarrollo visual durante el periodo de la alimentación complementaria. Las fórmulas infantiles deben contener al menos un 0,2% del total de ácidos grasos como DHA y un 0,35% como ácido araquidónico. En el caso de las mujeres embarazadas y durante el periodo de lactancia también se recomienda una ingesta adicional de DHA de 100-200 mg al día para compensar las pérdidas oxidativas del DHA y su acumulación en el feto (Gil 2010; Abedi & Sahari. 2014).

Tabla 1: Resumen de las recomendaciones de AGPI-CL en lactantes.

Autoridad	Recomendación
Expertos FAO/OMS en grasas y ácidos grasos (2010) (22)	0-6 m: DHA 0,2-0,36% y ARA 0,4-0,6% del total de ácidos grasos. 6-24 m: 10-12 mg DHA/kg de peso corporal total.
EFSA (Autoridad europea de alimentos y seguridad alimentaria) (2012)	0-6 m: DHA 0,32% de los ácidos grasos para el desarrollo visual. 7-24 m: 100 mg DHA/d.

Hay escasos datos sobre los efectos adversos de la administración de suplementos con altas dosis de DHA a largo plazo. A este respecto el panel de expertos de la EFSA considera que la ingesta de suplementos dietéticos de DHA de hasta 1 gr. al día no supone riesgo para la población en general. En este mismo informe se constata que ingestas de hasta 600mg/día de

DHA no causan efectos adversos en niños y que incluso se han observado en algunos niños ingestas superiores (1400-1700mg/día) sin efectos adversos (Larque et al. 2012). Sin embargo, las recomendaciones diarias de DHA para los adultos y niños europeos se encuentran por debajo de esta cifra.

1.4.2 Funciones biológicas del DHA

1.4.2.1 Funciones generales

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 son importantes componentes estructurales de las membranas celulares encontrándose como fosfolípidos de membrana (ácidos grasos esterificados) o como moléculas libres. Aunque se encuentran en las membranas celulares de todos los órganos, son muy abundantes en el tejido neuronal y retina, especialmente el caso del DHA (Walczewska et al. 2011; De Giuseppe et al. 2014).

En la retina, el DHA se acumula principalmente en la membrana de los segmentos externos de las células que contienen los fotorreceptores (conos y bastones), por lo cual este ácido graso participa activamente en el proceso de transformación del estímulo luminoso en una señal eléctrica (Gil 2010; Abedi & Sahari. 2014).

Además es un componente esencial para la formación de las vainas de mielina en las neuronas, por lo que el DHA permite una adecuada conexión entre los neurotransmisores y los receptores, lo cual es básico para una óptima comunicación nerviosa. Se ha observado su participación en procesos de migración neuronal y neurogénesis, que permite que cuando los circuitos neuronales son dañados otros circuitos puedan reorganizarse y reemplazar los circuitos perdidos (Amminger et al. 2010; De Giuseppe et al. 2014).

La incorporación de los ácidos grasos poliinsaturados libres a los fosfolípidos de membrana parece modular las propiedades físicas de las membranas. Contribuyen a varias de sus funciones como son la fluidez, la permeabilidad, la actividad enzimática y de receptores y la transducción de señales (De Giuseppe et al. 2014).

Así por ejemplo, en la transducción de señales se ha visto que el EPA y especialmente el DHA, son capaces de disminuir la fosforilación de JAK1, JAK3, STAT5, ERK1/2 y Akt inducida por la IL-2, disminuyendo la estimulación de esta citoquina sobre la proliferación de linfocitos. También se ha sugerido su relación con la activación del factor de transcripción NF- κ B involucrado en la producción de citoquinas por macrófagos tras estimulación con lipopolisacáridos objetivándose una disminución de la expresión de mRNA de TNF- α , IL-1 β e IL-6, siendo el efecto del DHA más potente que el de EPA (Abedi & Sahari. 2014).

Estos efectos moduladores del DHA y EPA sobre la inmunidad ocurren por cambios en la expresión génica. La expresión de genes relacionados con la transducción de señales, la supervivencia celular, la apoptosis y la producción de citoquinas se ve alterada por estos dos ácidos grasos. El DHA en concreto, estimula la expresión de genes relacionados con la defensa y reparación. Además también afectan a la expresión génica de factores de transcripción, adhesión celular, citoesqueleto y receptores hormonales (Steffens & Wirth 2005; Anderson & Doyle 2008).

Los ácidos grasos omega-3 también regulan la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (ARA). Los eicosanoides son un grupo de sustancias biológicamente activas que incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos. Participan en el control de la presión arterial, función renal, coagulación sanguínea y reacciones inflamatorias e inmunológicas, entre otras. (Steffens & Wirth 2005).

El EPA produce eicosanoides de la serie 3 que incluyen la prostaglandina PGE₃, la prostaciclina PGI₃, el tromboxano TXA₃ y el leucotrieno LTB₅. La síntesis de estos eicosanoides requiere de la participación de diversas enzimas, ciclooxigenasas y lipoxigenasas, que carecen de especificidad por lo que puede existir competencia entre distintos sustratos para formar eicosanoides (Verlengia et al. 2004).

El EPA compite con el ácido araquidónico (ARA) para estimular la producción de prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 que tienen una menor acción inflamatoria que los eicosanoides derivados del ARA. La suplementación con DHA induce cambios en el metabolismo del ácido araquidónico y en el balance de los eicosanoides sintetizados a partir de los ácidos grasos omega-3 y omega-6. Por eso puede influir sobre las funciones que regulan estos eicosanoides (Verlengia et al. 2004)

La cantidad de ácido araquidónico contenido en las células inflamatorias se ve influenciado por la cantidad de ácido linoleico contenido en la dieta aunque la dosis a la que se establece esta relación no ha sido definida en humanos. No obstante, el papel del ácido araquidónico como precursor para la síntesis de eicosanoides proinflamatorios refleja la potente influencia de los ácidos grasos omega-6 de la dieta sobre los procesos inflamatorios (Calder 2006).

La incorporación de EPA y DHA en las células inflamatorias ocurre de un modo dosis dependiente y es parcialmente a expensas del ácido araquidónico. La suplementación con aceite de pescado ha demostrado una reducción de los eicosanoides de la serie 2 (PGE₂, tromboxano B₂, LTB₄, ácido 5- hidroxieicosatetraenoico y LTE₄) por células inflamatorias debido a una reducción del sustrato disponible para la síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico (Verlengia et al. 2004).

Aunque los ácidos grasos pueden modular la cantidad y tipo de eicosanoides producidos, también pueden producir estos efectos por mecanismos independientes a los eicosanoides que incluyen la acción sobre receptores, sobre las vías de señalización intracelular y la actividad de factores de transcripción. También se ha demostrado que los ácidos grasos omega-3 pueden reducir la concentración de proteína C reactiva, citoquinas, quimioquinas y otros biomarcadores inflamatorios. Además el EPA y el DHA son productores de los mediadores lipídicos denominados resolvinas y protectinas que tienen efecto antiinflamatorio e inmunomodulador (Verlengia et al. 2004; Calder 2006).

Figura 15: Mecanismo por el cual los AGP omega-3 ejercen un proceso inmunomodulador y una función antiinflamatoria.



Mataix y de Pablo, 2009.

Por otro lado, diversos estudios han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de los ácidos grasos en enfermedades inflamatorias y autoinmunes como el Lupus, el Asma, la Fibrosis Quística, la enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), la Artritis Reumatoide, la Esclerosis Múltiple, la Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn y la Diabetes Mellitus tipo 2 (Calder 2006; Li & Hu 2009).

También son ampliamente conocidos los beneficios de los ácidos grasos omega-3 en enfermedades cardiovasculares poniéndose de manifiesto en algunos estudios su potencial para disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares. En una reciente revisión se ha puesto de manifiesto que los ácidos grasos libres omega-3 son eficaces en la reducción de los niveles de triglicéridos y otros lípidos en pacientes con hipertrigliceridemia y pacientes con riesgo cardiovascular elevado tratados con estatinas. Sin embargo en otros estudios sobre formulaciones de AGPI-CL y riesgo cardiovascular se ha concluido que formulaciones compuestas por EPA y DHA disminuyen los niveles de triglicéridos pero pueden aumentar

los de colesterol LDL, no pasa esto cuando únicamente se administra EPA (Calder 2004; Harris et al. 2013).

Los AGPI-CL omega-3 también disminuyen la producción de agentes quimiotácticos, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, eicosanoides inflamatorios y citoquinas inflamatorias, disminuyen la presión arterial, incrementan la producción de óxido nítrico, mejoran la relajación endotelial, disminuyen la trombosis y arritmias cardíacas (Calder 2004).

La suplementación con aceite de pescado también ha mostrado beneficios en procesos oncológicos, asociándose a la reducción de la incidencia del cáncer de mama metastásico. En pacientes con cáncer colon-rectal también se han puesto de manifiesto sus beneficios, objetivándose una reducción de marcadores inflamatorios como la IL-6 en pacientes suplementados con ácidos grasos omega-3, aunque estos beneficios dependían del tiempo de suplementación, dosis y vía de administración y tipo de tratamiento oncológico recibido (de Aguiar Pastore et al. 2015; Abedi & Sahari. 2014).

En pacientes con diferentes tipos de cáncer (cáncer de pulmón, mama, colorectal y gastrointestinal) tratados con quimioterapia y/o radioterapia la suplementación con ácidos grasos omega-3 puede aportar beneficios en cuanto al mantenimiento del peso corporal, disminución de la neuropatía periférica, en la inflamación con reducción de la proteína C reactiva, mejorando la calidad de vida sobre todo por la preservación de la condición física. (de Aguiar Pastore et al. 2015).

Además, los ácidos grasos omega-3 parecen tener importantes propiedades como captadores de radicales libres, protegiendo contra el daño oxidativo a lípidos y proteínas. En este aspecto existe controversia, aunque diversos estudios muestran una protección antioxidante del DHA, no podemos olvidar de que se trata de ácidos grasos muy poliinsaturados y por lo tanto altamente susceptibles a la agresión oxidativa (García-Rodríguez et al. 2012).

Finalmente, también se ha observado un efecto beneficioso de los AGPI-CL omega-3 sobre la artritis reumatoide, osteoartritis, osteoporosis, etc. ya que estos ácidos grasos, y

especialmente el DHA, actúa de forma beneficiosa sobre el crecimiento y remodelado óseo, estimulando la formación e inhibiendo la resorción ósea (Kajarabille et al. 2013).

Estos dos últimos puntos (estrés oxidativo y remodelado óseo) serán discutidos con más detalle en sus correspondientes apartados dada la importancia que tienen para esta tesis doctoral.

1.4.2.2 DHA en el embarazo, parto y lactancia

Las recomendaciones de nutrición materna siempre se han centrado en las dietas que incluyen el suministro suficiente de calorías y proteínas, pero recientemente los ácidos grasos también han adquirido importancia. Esto se debe en parte a las observaciones realizadas, donde ha quedado ampliamente demostrado el efecto beneficioso de los suplementos de AGPI, especialmente DHA, durante el embarazo sobre diversos aspectos de la salud del feto y recién nacido, así como de la madre (Helland et al. 2008; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), se recomienda la ingesta diaria de DHA durante el embarazo. La ingesta mínima óptima durante el embarazo y lactancia de DHA según las recomendaciones actuales para la salud y el desarrollo fetal e infantil (Recomendaciones FAO/OMS) son de 300mg/día de EPA + DHA, de los cuales al menos 200mg deberían ser DHA. Esta ingesta de pescado graso rara vez excede la ingesta tolerable de contaminantes ambientales (Koletzko et al. 2008; Pietrantoni et al. 2014).

Los AGPI omega-3 están involucrados en varios procesos, antioxidantes y antiinflamatorios (mediados por resolvinas). Varios trastornos placentarios, como la restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro y ruptura de membranas (PROM), están asociados con los procesos de inflamación y estrés oxidativo en la placenta, y la

suplementación de DHA ha mostrado efectos beneficiosos ante estas anomalías (Pietrantonni et al. 2014).

En la etapa prenatal, el DHA es provisto al feto mediante transferencia materno-fetal. Después del nacimiento, la fuente principal por la cual el neonato obtiene este ácido graso de la leche materna, ya que la síntesis de DHA es muy limitada en el neonato (Helland et al. 2008; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Numerosos estudios han mostrado que las concentraciones de AGPI-CL son más altas en el plasma de cordón umbilical que en plasma materno, en el momento del nacimiento. Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que la placenta es capaz de transportar AGPI al feto, siguiendo un orden de preferencia: DHA > AA > ALA > LA (De Giuseppe et al. 2014).

El DHA es fundamental en la concepción, crecimiento y desarrollo del embrión y el feto. En el neonato, sus niveles dependen de las concentraciones plasmáticas en la madre en relación a su nutrición durante el embarazo y al tamaño de la placenta y sus proteínas transportadoras, por lo que resulta de gran importancia asegurar la presencia de este ácido graso en la dieta materna. El gradiente transplacentario parece ser mayor conforme avanza la gestación, siendo transferidos en el tercer trimestre entre 30-45 mg/dl de los depósitos maternos al feto. Tras el nacimiento, se produce un rápido descenso de los niveles de ácido araquidónico y DHA hasta un tercio de los niveles intrauterinos. Las necesidades son mayores al nacimiento por el rápido enriquecimiento en lípidos que precisan las membranas celulares (Gil-Campos 2010; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

La concentración de DHA aumenta en un 50% durante el primer trimestre de embarazo, lo que podría estar relacionado con la alta concentración de estrógenos, aumentando la cantidad de DHA disponible para el feto. La transferencia placentaria de AGPI aumenta significativamente en último trimestre, correspondiéndose con los niveles más bajos de DHA en las embarazadas (Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

A las pocas semanas después del parto, las concentraciones de DHA en la madre descienden al nivel más bajo incluso que antes del embarazo, lo cual puede ser mitigado mediante la suplementación de DHA durante el embarazo (Montgomery et al. 2003; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Se ha demostrado que la suplementación con DHA tiene una gran importancia clínica, ya que durante el embarazo se ha asociado con un periodo de gestación adecuado y el aumento de concentración de DHA en tejidos fetales. Llevar un embarazo a término adquiere una especial importancia, ya que se ha comprobado que la prematuridad es la causa de diversas enfermedades infantiles y en casos graves, puede llevar incluso a la muerte del recién nacido; los partos prematuros son la causa del 85% de las muertes que se dan en recién nacidos sanos (Olsen et al., 2008; Swanson et al. 2012).

Un mecanismo por el cual el DHA puede disminuir la incidencia de parto prematuro es disminuyendo la producción de las prostaglandina E2 y la prostaglandina F2, por lo que reduce la inflamación en el útero, lo que podría asociarse con el parto prematuro (Olsen et al., 2008).

Varios estudios han investigado la ingesta de DHA durante el embarazo y su correlación con un periodo de gestación más largo. Las conclusiones fueron que la administración de suplementos de DHA durante el embarazo, retrasa el inicio del parto a término o cerca del periodo a término; sin embargo, la suplementación no retrasa el parto hasta el punto de ser posttérmino (Judge et al. 2007; Olsen et al., 2008; Makrides et al. 2010).

Esto apoya la evidencia de que la suplementación con DHA conduce a un periodo de duración óptima del embarazo. Además la suplementación de DHA reduce el riesgo de parto prematuro en un 44% en las mujeres que consumen cantidades relativamente bajas cantidades de pescado y en un 39% en las que consumen una cantidad media; sin embargo, no se encontró una diferencia significativa (Olsen et al., 2007).

En el estudio realizado por Judge et al. (2007) encontraron que las mujeres que fueron suplementadas con DHA desde la semana 24 de gestación hasta el parto a término, tuvieron

un embarazo significativamente más largo que las mujeres en el grupo de placebo. Otro estudio encontró que la suplementación con DHA tras la semana 21 de gestación llevó a un menor número de nacimientos prematuros (<34 semanas de gestación). Esto además implica un mayor peso al nacer, en el grupo suplementado un menor número de recién nacidos mostraron un bajo peso al nacer en, con respecto al grupo control (Makrides et al. 2010).

También existe evidencia de que madres suplementadas con DHA durante el embarazo y la lactancia, ofrecen una mayor protección al bebé contra las alergias. Esto puede ser debido al hecho de que los suplementos de aceite de pescado se han asociado con bajos niveles de respuesta inflamación e inmune (Krauss et al. 2000). En un estudio sobre la alergia alimentaria y eczema asociado a la IgE, el período de prevalencia de alergia a los alimentos fue menor en el grupo de madres suplementado con EPA + DHA y la incidencia de eczema fue también menor, en comparación con grupo placebo (Furuhjelm et al. 2009).

Por otro lado, la evidencia muestra que los recién nacidos que reciben lactancia materna satisfacen adecuadamente sus requerimientos de AGE y AGPI- CL, ya que, la leche materna aporta de promedio 0,5-0,8% de AA y 0,2-0,4% de DHA. La media de concentración de DHA en la leche materna en los países occidentales es de 0,34% (Helland et al. 2008; Gil 2010).

Se piensa que el rango de DHA refleja la ingesta materna de DHA, ya que las poblaciones con mayor consumo de pescado también tienen el mayor contenido de DHA en la leche materna. Como es bien conocido, el pescado es una excelente fuente de DHA en la dieta y la frecuencia de su ingesta está asociada con mayor estatus materno de DHA (Imhoff-Kunsch et al. 2011).

Con todo esto, ha quedado ampliamente demostrado que la leche materna es el alimento ideal para el recién nacido ya que aporta los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo y crecimiento del mismo. Pero cuando por diversas razones los lactantes no pueden ser alimentados con leche materna, los sustitutos de esta pasan a ser esenciales para la supervivencia de estos lactantes. La utilización, en muchos casos inevitable, de esta nutrición artificial, hace que sea necesario conocer la composición de la leche materna, sobre todo, en lo que respecta a su perfil lipídico (Marín et al., 2009).

Diferentes estudios han evaluado el efecto del DHA sobre la duración de la gestación y el peso/talla del recién nacido (Olsen et al., 2007). Según estudios realizados, la suplementación con DHA durante el embarazo reduce el riesgo de parto prematuro y aumenta el peso del bebé al nacer. Además, esta menor incidencia se ha relacionado también con un mayor contenido de este ácido graso en la sangre de cordón umbilical y en la membrana de los eritrocitos de la madre (Rump et al. 2001).

Por otra parte, un bajo contenido de AGPI omega-3 en los eritrocitos de la madre se ha relacionado con mayor riesgo de padecer preclampsia. Este dato sugiere que la suplementación con estos ácidos grasos podría reducir la incidencia de esta patología, a través de una reducción de los niveles de tromboxano A2. Además, se ha mostrado que una elevada concentración de DHA en la leche materna está asociada con una baja prevalencia de depresión puerperal en la madre (Llorente et al. 2003).

Las etapas del embarazo y lactancia son críticas y precisan que las mujeres lactantes aseguren una ingesta adecuada de DHA, ya que, como se ha comentado anteriormente, los fetos y recién nacidos alimentados con leche humana dependen del suministro de DHA materno, jugando el estatus materno de DHA un papel muy importante en el estatus de DHA de su hijo (Carlson 2009; Imhoff-Kunsch et al. 2011).

Adicionalmente, variaciones en los genes que codifican enzimas responsables de la desaturación de LA y alfa linolenico a AA Y DHA, respectivamente, influencia el contenido en DHA de la leche materna (Imhoff-Kunsch et al. 2011).

Debido a que el contenido en DHA en la leche humana depende de la dieta y almacenamiento, bajas ingestas de DHA, como se ha visto en muchas poblaciones, resulta en menores concentraciones de DHA en la leche materna, lo cual puede tener una influencia adversa en el crecimiento y desarrollo de los niños alimentados al pecho.

Poblaciones como Japón o Noruega que viven en la costa y consumen ampliamente pescado tienen mayor ingesta de AGPI-CL omega-3 y por tanto mayores concentraciones de DHA en la leche materna (Imhoff-Kunsch et al. 2011).

La lactancia es una etapa en la que la suplementación con DHA podría ser beneficiosa para la madre y el neonato. Durante la lactancia la madre pierde 70-80 mg de DHA en la leche, de manera que se observa un descenso de sus niveles en los fosfolípidos plasmáticos, que se mantiene incluso 6 meses después del parto. Algunos estudios han demostrado que la administración de AGP-CL omega-3 a madres lactantes aumenta los niveles de estos ácidos grasos, tanto en la leche materna como en los fosfolípidos plasmáticos, lo cual puede tener implicaciones importantes en la salud de la madre (Lewin et al., 2005).

Varios estudios confirman el beneficio de la suplementación con ácidos grasos omega-3 durante el embarazo relacionados sobre todo con el desarrollo adecuado del cerebro y la retina. De los dos AGPI-CL de la serie omega-3 más importantes, EPA y DHA, el DHA ha mostrado ser el más importante para mantener la funcionalidad de la membrana celular, además resulta vital para el desarrollo del cerebro y la retina en el feto (Judge et al. 2007; Swanson et al. 2012).

1.4.2.3 DHA en el desarrollo visual y neurológico del recién nacido

Los principales efectos de los elevados niveles de los AGPI n-3 durante el embarazo se asocian con el desarrollo adecuado del sistema nervioso central durante el período intrauterino de máxima acreción.

Se ha demostrado que en el tercer trimestre de gestación, el feto requiere aproximadamente entre 40-60 mg de AGPI n-3 al día por kilogramo de peso corporal. Durante el último trimestre y los primeros meses de vida, el crecimiento del cerebro es notable, debido principalmente a la mielinización y el gran aumento en el contenido cerebral de DHA y AA al indicarse la demanda fisiológica de estos nutrientes (Helland et al. 2008; Poniedziałek-Czajkowska et al. 2014).

Las membranas celulares del sistema nervioso son ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, sobre todo AA y DHA, lo que da lugar a que dentro de los muchos efectos de estos ácidos grasos, los concernientes al desarrollo neuronal y visual son de gran importancia. Así, la grasa de la leche es importante para el desarrollo cerebral, ya que se requieren ácidos grasos específicos para la formación de mielina, el crecimiento neuronal y desarrollo de la retina, por ser componentes clave de las membranas celulares (Gil-Campos M. 2010; Walczewska et al. 2011).

El neonato con prematuridad es muy vulnerable al aporte insuficiente de lípidos y DHA en concreto, ya que el periodo de acumulación de grasa in útero ocurre durante el tercer trimestre y por su inmadurez enzimática y mayor tasa de crecimiento (Gil-Campos M. 2010; Marc et al. 2011).

El cerebro es un órgano principalmente lipídico, un 60% de su peso en seco está compuesto por fosfolípidos y plasmalógenos, y más de la mitad de este porcentaje es DHA (Gil 2010). La tasa más rápida de acumulación del DHA en el cerebro ocurre durante el último trimestre intrauterino y primer año de vida (Carlson 2009). Durante el último trimestre de gestación se produce un explosivo aumento del tamaño cerebral, determinado por una neurogénesis muy activa, acompañada de procesos de migración neuronal y establecimiento de sinapsis. Este activo proceso requiere de un aporte adecuado de AA y DHA. Se ha propuesto que la capacidad del feto y probablemente del recién nacido para formar AA y DHA a partir de sus precursores no sería suficiente para cumplir los requerimientos metabólicos de estos ácidos grasos. Por esta razón, dichos ácidos grasos son aportados por la madre, provenientes de sus propias reservas, capacidad de biosíntesis y del aporte dietético. Estas etapas del desarrollo pueden estar influenciadas directamente por el estado nutricional de la madre si el feto permanece en el útero hasta el término y en el niño subsecuentemente alimentado con leche materna durante el primer año de vida (Gil 2010; De Giuseppe et al. 2014).

Los requerimientos de DHA no están del todo determinados, aunque los aportes deben basarse en imitar la composición de la leche humana (Gil-Campos M. 2010).

El hecho de que la ingesta de ácidos grasos n-3 de cadena larga son esenciales para el óptimo desarrollo visual y neurológico durante la edad temprana ha promovido diversos estudios observacionales y de intervención, con diferentes resultados (Drevon et al. 2008).

Un inadecuado aporte de DHA durante el temprano desarrollo disminuye el DHA en el cerebro y retina, perjudicando a la neurogénesis y función visual y resultando en déficit a largo plazo en el metabolismo de neurotransmisores y función visual (Innis & Friesen 2008). Benolken et al., 1973, demostraron en ratas alimentadas con dietas sin grasas que una disminución del contenido en DHA de la retina se asociaba con alteraciones en su función.

Estudios llevados a cabo en humanos han demostrado que en los fosfolípidos plasmáticos y eritrocitarios de recién nacidos pretérmino, los contenidos en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son predictores de la agudeza visual (Mataix 2009).

Los niños nacidos antes de término y alimentados con fórmulas con DHA muestran una mayor agudeza visual comparada con el grupo control (Carlson 2009). Birch et al., en 1992, ya demostró una mejor agudeza visual en los pretérminos que habían recibido fórmulas suplementadas con aceites de pescado rico en DHA, persistiendo estas diferencias hasta los 4 meses de edad.

En cuanto a los recién nacidos a término, los estudios que comparan lactados con fórmula y al pecho no son concluyentes, ya que algunos demuestran peor agudeza visual en los lactados con fórmula y otros no demuestran estas diferencias (Birch et al. 1992)(Makrides et al. 1995). En estudios randomizados donde se valora el efecto de la suplementación con AGPI-LC, tampoco existen datos absolutamente concluyentes en recién nacidos a término, existiendo trabajos que demuestran mejor agudeza visual en suplementados a los 4 y 8 meses (Makrides et al. 1995), otros que solo demuestran mejores resultados a los 2 meses pero no posteriormente (Bouwstra et al. 2005) e incluso, algunos autores que no han encontrado diferencias (Innis et al. 1997). La agudeza visual también ha sido medida en el RN a término cuyas madres fueron suplementadas con DHA durante el embarazo o lactancia. Resultados de varios estudios Judge et al, 2007, encontraron beneficios con la suplementación de DHA en estos parámetros (Judge et al. 2007; Hurtado et al. 2015).

De los datos existentes hasta la fecha podría inferirse que los AGPI-CL presentes en la alimentación de los RN, podría comportarse como un factor acelerador de la maduración visual en el RN pretérmino. En el RN a término, sin embargo, su posible efecto beneficioso es mucho más controvertido, debido a la diversidad de los hallazgos encontrados en los estudios (Mataix 2009).

En cuanto a las funciones cognitivas, diversos estudios muestran un efecto positivo de la suplementación con DHA sobre el desarrollo de funciones cognitivas, aunque también hay que indicar que otros estudios no han mostrado el mismo efecto positivo. Estudios realizados en ratas han mostrado que el aprendizaje y habilidades de comportamiento están relacionadas con el estatus cerebral de DHA (Auestad N. 2000). En recién nacidos a término que recibieron formulas suplementadas con DHA, el test de Brunet-Lezine mostró mejores resultados a los 4 meses de vida respecto a los que recibieron fórmulas sin DHA, sin embargo estas diferencias desaparecieron al realizar el test de nuevo a los 12 y 24 meses. Otros estudios por el contrario, no encontraron diferencias en recién nacidos a término alimentados al pecho o con fórmulas sin AA o DHA en pruebas visuales y de desarrollo neuronal (Hurtado et al. 2015).

Estudios que evaluaron el efecto de la suplementación de madres lactantes con DHA en el desarrollo cognitivo de sus hijos (Jensen et al. 2005; Helland et al. 2008; Hurtado et al. 2015) encuentran resultados positivos a nivel cognitivo entre los niños del grupo suplementado comparado con el control. En un estudio realizado por Judge et al., (2007) encontraron que los niños cuyas madres habían sido suplementadas con DHA durante el embarazo, tuvo significativamente mejores habilidades de resolución de problemas a los 9 meses de edad que aquellos cuyas madres no habían tomado la DHA. Otro estudio realizó una evaluación cognitiva de los niños 2,5 meses de vida y tras la suplementación materna con EPA y DHA durante el embarazo (desde la semana 20 de gestación hasta el parto). Los niños del grupo suplementado alcanzaron significativamente mayores calificaciones en test visuales y de coordinación motora, respecto a los del grupo control (Dunstan et al. 2008). Sin embargo, en uno de los estudios, estos resultados no se sostuvieron en el seguimiento a largo plazo a los 7 años de edad (Helland et al. 2008)

En revisiones sistemáticas recientes realizadas por Lo et al. (2012) y el meta-análisis realizado por Gould et al. (2013), se resumen 23 ensayos aleatorizados de doble ciego donde se estudiaba el efecto de la administración de suplementos con omega-3 durante el embarazo y la lactancia sobre el desarrollo neurológico y visual del recién nacido. Los autores evaluaron la puntuación estándar de desarrollo (DSS) en bebés, niños pequeños y niños en edad preescolar y el cociente de inteligencia (CI) en los niños pequeños; en segundo lugar, se evalúan otros aspectos del desarrollo neurológico (tales como el lenguaje, el comportamiento y el desarrollo motor) y el desarrollo visual.

Los autores observaron que las diferencias entre el tratamiento y los grupos de control para el desarrollo cognitivo se observaron sólo en niños en edad preescolar (de 2-5 años), los cuales obtuvieron un incremento de 3,92 puntos en el DSS, respecto al grupo control. Con respecto al desarrollo neurológico (psicomotor y lenguaje), no se observaron diferencias entre los grupos suplementado y el control. En cuanto a los resultados de agudeza visual y sensibilidad retiniana no se encontraron diferencias entre grupos a ninguna edad (Gould et al., 2013)

A pesar de los resultados positivos observados en los estudios realizados *in vivo* y los estudios observacionales, así como los reportados recientemente, no podemos concluir que los datos hallados apoyen o rechacen la hipótesis de que la suplementación durante el embarazo y la lactancia de ácidos grasos omega-3 mejoran la capacidad visual y cognitiva en los niños. Además muchos de los ensayos revisados tuvieron problemas metodológicos como tamaños de muestra escasos, fallos en la aleatorización y/o seguimiento inadecuado (De Giuseppe et al. 2014).

En definitiva, son numerosos los estudios en los que se le ha suministrado DHA a la madre y posteriormente se ha evaluado diversos aspectos del desarrollo del recién nacido, sobre todo desarrollo visual y psicomotor, aunque los resultados no son del todo concluyentes.

1.5 DHA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Resulta interesante el efecto del DHA en el campo de la agresión oxidativa. Diversos estudios muestran una protección antioxidante del DHA, sin embargo, no podemos olvidar que se trata de un ácido graso altamente poliinsaturado y por lo tanto susceptible a la agresión oxidativa. Por esta razón, en este campo existe controversia, dado que ciertos estudios muestran una menor agresión oxidativa (Mas et al. 2010; García-Rodríguez et al. 2012), mientras que otros muestran lo contrario, un aumento en el daño oxidativo tras la suplementación con DHA (Shoji et al. 2009; Boulis et al. 2014).

Este enlace entre DHA y estrés oxidativo es de gran importancia sobre todo el campo de la suplementación con DHA, dado que hay que sopesar los efectos beneficiosos de esta suplementación con los posibles o potenciales riesgos, entre los que se podría encontrar una mayor agresión oxidativa.

Como se ha comentado anteriormente, el embarazo es un estado fisiológico acompañado de una alta demanda metabólica, un incrementado requerimiento de oxígeno y por tanto una incrementada producción de radicales libres. Se ha observado una mayor agresión oxidativa en mujeres gestantes que en mujeres no gestantes, igualmente en el parto se ha observado un elevado daño oxidativo tanto en la madre como en el recién nacido (Ochoa et al. 2003 and 2007; Díaz-Castro et al., 2015).

El nacimiento también implica un fuerte estrés oxidativo tanto para el recién nacido como para la madre. En el caso del recién nacido a término y siempre que el proceso de gestación y el parto sean normales esta agresión oxidativa desaparece durante las primeras horas de vida. En el recién nacido prematuro por diversas razones (inmadurez de los órganos, inmadurez del sistema antioxidante, etc.) la agresión oxidativa es aún mayor que la observada en el recién nacido a término y además de una mayor duración (Ochoa et al. 2007).

Arab et al. (2006) encontraron que la incubación de células de fibroblasto humanos con 5 a 60 μ M DHA aumenta la concentración de glutatión reducido, el principal antioxidante

celular en respuesta al estrés oxidativo. El DHA añadido al medio de cultivo celular se incorpora en los fosfolípidos de las membranas, siendo capaz de modificar las características y funciones bioquímicas (Brown & Kelly 1994) (Arab et al. 2006). Shoji et al. (2009) también encontraron que el tratamiento con DHA lleva a un aumento no sólo de la propia concentración de DHA sino también de EPA en la composición de ácidos grasos de las células. Sin embargo, demostraron que una excesiva suplementación con DHA (tratamiento con 100µM DHA) inducía daño celular, causando peroxidación lipídica. Lo que sugiere que una dosis baja de DHA (1 ó 10µM) puede disminuir el daño oxidativo del ADN, mientras que dosis más elevadas aceleran la peroxidación lipídica en líneas celulares de trofoblasto placentario. Basándose en estos datos, se concluyó que la suplementación de las dietas de mujeres embarazadas con DHA podría tener efectos tanto pro-oxidantes como antioxidantes, dependiendo de la dosificación y de los diferentes mecanismos de acción.

Por otra parte, estudios realizados en ratones mostraron un efecto protector frente a la agresión sobre el ADN y el estrés oxidativo sobre células hepáticas en individuos sometidos a una dieta enriquecida en DHA, con respecto al grupo control, efecto que fue asociado a la disminución en la formación hepática de eicosanoides derivados de n-6, como la PGE2, junto con un incremento en la generación de mediadores derivados de los omega-3 como la protectina D1 y 17-S-hidroxi-DHA, cuyo papel a nivel hepatocitario se reflejaba en la abolición de la genotoxicidad y el daño oxidativo, simultáneamente con la disminución de la liberación de TNF- α y la expresión de 5-lipoxigenasa por parte de los macrófagos (González-Pérez et al. 2006; Chamorro López et al. 2013).

Numerosos estudios han mostrado efectos positivos derivados de la combinación de estatinas con ácidos grasos omega-3 a la hora de reducir los niveles plasmáticos de colesterol LDL y triglicéridos. Sin embargo, otros estudios han encontrado evidencias del aumento de estrés oxidativo en estas terapias, tras medir aumentos en los niveles de MDA en el grupo suplementado con respecto al placebo; aumento del estrés oxidativo que se asoció a cambios en la expresión o actividad de enzimas antioxidantes, incrementándose las actividad de SOD debido a la acción de los ω -3 y las estatinas, junto con la reducción por otro lado de la expresión de catalasa, efecto derivado de los ω -3. Por tanto, al aumentar los niveles de SOD y

no haber suficiente catalasa para convertir el peróxido de hidrogeno resultante en agua, un exceso de radicales libres se va acumulando en las células, provocando la oxidación lipídica y produciendo el aumento de los valores de MDA (Grundt et al. 2003; Carrepeiro et al. 2011).

Estudios más recientes llevados a cabo sobre cultivos celulares HEPG2 suplementados con DHA, mostraron ausencia de efectos adversos junto con una inducción de la actividad antioxidante de diversos sistemas enzimáticos, como la SOD, mientras no presentaron cambios sobre la catalasa. En el mismo estudio, se observó que suplementando con LA, ALA y DHA, se obtenía una mejora en la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la glutatión S-transferasa (Di Nunzio et al. 2011).

Con respecto al tratamiento de enfermedades como el cáncer, son muchas las líneas de investigación abiertas que relacionan DHA con esta enfermedad. Diversos estudios han mostrado cierto efecto inhibitor del crecimiento tumoral “*in vivo*” e “*in vitro*” tras la suplementación con AGPI-CL de la serie n-3, concretamente en un estudio llevado a cabo sobre células de cáncer de colon HT-29, se observó que el DHA presentaba un papel importante (dosis-dependiente) de inductor de la apoptosis celular, descubriéndose que este efecto no derivaba de su papel sobre la COX, pues pruebas con indometacina (potente inhibidor de esta enzima) no fueron capaces de bloquear la apoptosis generada por el DHA, en contraposición, este efecto apoptótico si era parcialmente suprimido por un antioxidante sintético, butirato de hidroxitolueno, indicando que la peroxidación lipídica se encuentra envuelta en las señales apoptóticas inducidas por DHA; así mismo se observó una disminución en la expresión de Bcl-2 (proteína clave en la apoptosis celular) relacionada con el DHA, lo cual puede asociarse con el aumento de la sensibilidad celular hacia la peroxidación lipídica (Chen et al. 2012; Hajjaji et al. 2012; Cai et al. 2013).

Por otro lado, el DHA también está involucrado en procesos antiinflamatorios donde participan las resolvinas. El DHA es precursor de docosanoides de los que deriva la neuroprotectina D1, que inhibe el estrés oxidativo y favorece la supervivencia celular (Bazan 2006).

La inflamación, se considera un proceso que se da como consecuencia de una agresión o alguna enfermedad, no obstante, esta reacción vital también se asocia con gran parte de las actuales enfermedades con mayor incidencia en las culturas occidentales (Salem et al. 2001).

Durante la fase inicial, las vías de señalización que dan lugar a las prostaglandinas E2 y D2 ponen en marcha, a su vez, la producción activa de los procesos de transcripción, de las enzimas necesarias para la génesis de otra clase de eicosanoides que también son generados a partir del ácido araquidónico, como las lipoxinas (LX) (Gilroy et al. 1999; Levy et al. 2001) y las familias de mediadores lipídicos más modernas, las resolvinas y las protectinas, generadas a partir de los AGPI ω -3 que envían señales para la resolución durante esta fase de la respuesta tisular (Serhan et al. 2002); se trata de compuestos y vías biosintéticas derivadas del EPA y el DHA que conllevan acciones biológicas potentes, afectan y actúan sobre diferentes sistemas del organismo, incluyendo el sistema nervioso, el tejido liso, la sangre y el sistema reproductor; juegan un papel importante en regular diversas funciones como la presión sanguínea, la coagulación de la sangre, la respuesta inflamatoria y la actividad del aparato digestivo. Las resolvinas de la serie E (resolvina E1 o RvE1) y de la serie D (resolvina D o RvD1), así como los miembros del DHA que transportan estructuras de trienos conjugados (docosatrienos), denominados protectinas, tienen efectos antiinflamatorios (Serhan et al., 2002) y neuroprotectores (Marcheselli et al. 2003), y cuando se generan a partir de tejidos nerviosos reciben el nombre de neuroprotectinas (NPD1) (Mukherjee et al. 2004).

Por otra parte, estudios basados en la suplementación con DHA durante la gestación y lactancia muestran datos beneficiosos respecto al estrés oxidativo que sufre la madre durante el parto y sobre todo el recién nacido, tanto en el parto como a posteriori.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación sobre antioxidantes liposolubles en la leche materna en diferentes estados de madurez, mostraron que el α -tocoferol, retinol y β -caroteno, se encontraban en mayores concentraciones en las madres suplementadas con DHA durante el embarazo y la lactancia, respecto a las madres control (datos no publicados). Estudios previos realizados por McGuire et al. (1997) sugieren que la suplementación con DHA puede ser beneficiosa para la biodisponibilidad de vitaminas

liposolubles, ya que puede comportarse como un transportador de lípidos y por tanto sustancias liposolubles, favoreciendo su absorción a nivel intestinal. Asimismo, la suplementación con DHA, también provoca un aumento de los niveles de este ácido graso en la leche materna y por lo tanto una mayor insaturación, lo que podría implicar un aumento de antioxidantes en la misma para su protección, algo similar a lo que ocurre en el aceite de girasol, que asociado a un mayor contenido en ácido linoleico presenta un mayor contenido en vitamina E.

Otro estudio llevado a cabo por (García-Rodríguez et al. 2012) en mujeres embarazadas, estudió el efecto de la suplementación con dos porciones de salmón (rico en ácidos grasos omega-3) durante el embarazo (a partir de la semana 20 de gestación) con respecto a otro control, para observar el efecto de esta suplementación sobre los sistemas de defensa antioxidante a nivel plasmático y eritrocitario; se mostró un incremento de las concentraciones de retinol a nivel plasmático en las muestras tomadas en la semana 34 y 38 al igual que los niveles de selenio eritrocitario en las mujeres embarazadas del grupo suplementado, pudiendo ser este incremento de selenio el responsable del incremento de la actividad de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa eritrocitarias reflejado durante el estudio, aunque sin llegar a poder considerarse significativo. En contraposición no se observó incremento de actividad a lo largo de la gestación para SOD y CAT, y tampoco se encontraron diferencias entre grupos con el resto de los antioxidantes no enzimáticos estudiados (tocoferol, caroteno y CoQ10). Aunque sí se observó un descenso significativo en todos los antioxidantes no enzimáticos a partir de la semana 20 de gestación. Este descenso ha sido puesto de manifiesto igualmente por otros investigadores (Palm et al. 2009), relacionándose con el incremento de estrés oxidativo derivado de la etapa final de la gestación y el aumento de volumen sanguíneo materno.

En estudios llevados a cabo donde se administró DHA durante la etapa intrauterina, se demostró que este ácido graso fue capaz de salvaguardar el tejido cerebral de las consecuencias derivadas del estrés oxidativo, presumiblemente incrementando la capacidad secuestradora de radicales libres. En este contexto, el rápido suministro de DHA antes del parto podría ser un mecanismo natural para proveer de capacidad antioxidante al feto y más

concretamente al cerebro en desarrollo (Yavin 2006). Sin embargo, el DHA también presenta otras funciones esenciales como servir de ligando endógeno de activación de factores de transcripción (Bazán, 2005) o como precursor de docosanoídeos, algunos de los cuales actúan como mediadores antiinflamatorios (Urquiza et al. 2000).

Por último, investigaciones basadas en la suplementación materna durante el embarazo con 4g diarios de aceite de pescado en un grupo y con 4g de aceite de oliva en otro. Al analizar los niveles de F2- isoprostano, como marcador de la peroxidación lipídica de ambos grupos a nivel plasmático y urinario, los neonatos cuyas madres fueron suplementadas con aceite de pescado mostraron un menor daño oxidativo, es decir, una menor peroxidación lipídica (Barden et al. 2004).

En definitiva, aunque el efecto del DHA sobre diversos aspectos de la gestación, parto y desarrollo del recién nacido ha sido ampliamente estudiado, el efecto potencial de esta suplementación en el estrés oxidativo observado en el recién nacido y sobre su evolución no ha sido hasta el momento estudiado. Por ello y en vista a todo lo comentado anteriormente, se hace necesaria una mayor investigación acerca del efecto de la suplementación con DHA sobre el estrés oxidativo en la madre gestante, así como en el recién nacido.

1.6 DHA Y REMODELADO ÓSEO

Las grasas presentes en la dieta pueden influenciar la salud ósea. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en particular, pueden ser beneficiosos en la regulación del metabolismo óseo. Así, cantidades óptimas de n-3 PUFA parecen inhibir la resorción ósea y promover la formación ósea (Griel et al. 2007; Kajarabille et al. 2013).

El mecanismo de acción de los omega-3 en el hueso es complejo y sus efectos pueden ser multifactoriales, envolviendo varias vías de señalización, citoquinas y factores del crecimiento. Hay varios mecanismos por los cuales los omega-3 y el aceite de pescado

pueden regular el metabolismo óseo, incluyendo una disminución en la liberación de prostaglandinas E2 (PGE2) y en el más importante factor de diferenciación de osteoclastos, el RANK-L. Además, el aceite de pescado puede modular varias citoquinas proinflamatorias, incrementar la producción de IGF1 y mejorar la acreción de calcio en el hueso (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010).

Se ha demostrado que las señales inflamatorias pueden modular los sistemas OPG/RANK-L disminuyendo la OPG y aumentando los niveles de RANK, produciendo así la resorción ósea. Por lo que, tanto el EPA como el DHA pueden resultar beneficiosos para hueso debido a sus conocidas acciones antiinflamatorias (Martin-Bautista et al. 2010).

El AGPI omega-3 EPA es un precursor de las prostaglandinas (PG), las cuales juegan un importante papel en la regulación de la inflamación. Las PGE2 en particular, son potentes moduladores del remodelado óseo que afectan a la resorción ósea, dado que estimulan la osteoclastogénesis a través del RANK-L. Ambos procesos de formación y resorción están relacionados con las PGE2 y sus efectos en el hueso pueden ser dosis-dependientes. Así, bajos niveles PGE2 estimula la formación ósea por medio de los osteoblastos, mientras que a altos niveles suprime la diferenciación osteoblástica y promueve la resorción ósea mediada por los osteoclastos a través del RANK-L (Korotkova et al. 2004; Kruger et al. 2010; Lukas et al. 2011).

El aceite de pescado y la baja proporción omega-6/omega-3, disminuyen los niveles de PGE2 tal y como se ha observado en cultivos de células óseas. Además, los ácidos grasos omega-3 inhiben citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y IL-1, inductoras de la resorción ósea e implicadas en la patogénesis de la osteoporosis (Högström et al. 2007).

Los diferentes tipos de lípidos en la dieta juegan un importante papel en el metabolismo del hueso. Entre los más importantes se encuentra el ratio omega-6/omega-3 el cual tiene influencia en la composición de los ácidos grasos del hueso y en la biosíntesis de prostaglandinas, las cuales regulan la formación y resorción ósea como se ha comentado anteriormente (Griel et al. 2007).

Algunos estudios relacionan un incremento en el ratio omega-6/omega-3 con la menor densidad de masa ósea en cadera e incremento del riesgo de enfermedad periodontal (Requirand et al. 2000; Weiss et al. 2005). Por otro lado, en otro estudio, diferentes ratios de omega-6/omega-3 fueron evaluados en cerdos y mostraron que unos mayores niveles de omega-3 estaban asociados a menor resorción ósea (Rahman et al. 2007).

La evidencia presentada en los últimos 20 años ha mostrado que los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente EPA y DHA son beneficiosos para la salud ósea. Investigaciones muy tempranas mostraban que la deficiencia de AGPI afectaba negativamente al hueso (Kruger et al. 2010). En 1931 Boraland & Jackson, demostraron que los animales deficientes en ácidos grasos esenciales desarrollaban osteoporosis severa asociada a calcificaciones renales y arteriales. Más recientemente se encontró la relación de las fracturas patológicas en ratas recién nacidas que seguían una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales.

Los cambios en los AGPI de la dieta se reflejan en la composición de los tejidos, incluyendo las células óseas como los osteoblastos, por lo que la composición de AGPI de las membranas celulares es dependiente de la ingesta. Se ha visto que cuando se ingieren pescado por largos periodos de tiempo, los AGPI omega-3 EPA y DHA de la dieta reemplazan parcialmente a los AGPI omega-6, incrementando así la fluidez de membrana (Kruger et al. 2010).

Estudios realizados en animales han mostrado que la ingesta de AGPI omega-3 puede influir tanto la formación de hueso como en la resorción. Se ha demostrado que la ingesta de AGPI omega-3 en forma de aceite de pescado modula el ratio omega-6/omega-3 en los tejidos, disminuyendo las PGE2 y mejorando la formación ósea en pollos y ratas, lo cual es probablemente debido a una reducción de la actividad osteoclástica y resorción ósea (Watkins et al. 2001).

Por otro lado, Kruger & Schollum (2005) encontraron que en una cohorte de ratas en crecimiento alimentadas con una dieta rica en aceite de atún, las concentraciones de DHA en

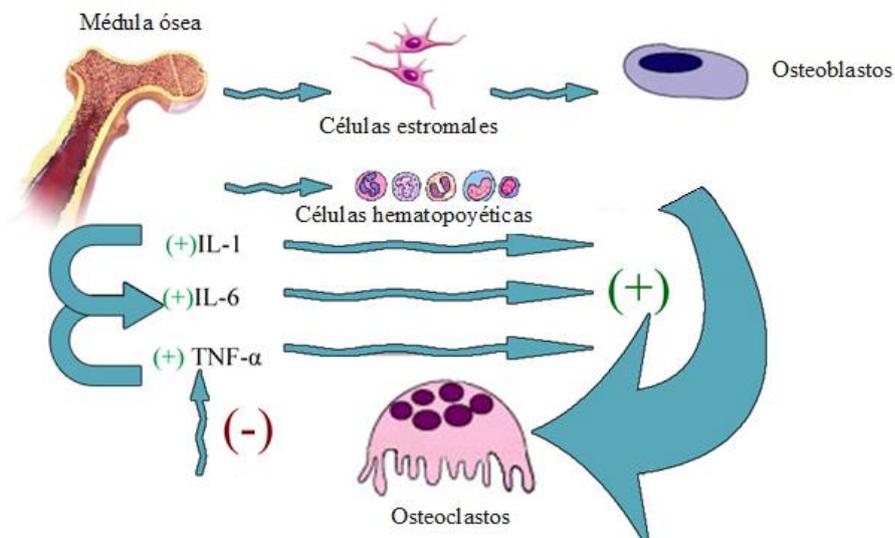
hematíes estaban asociadas a la densidad de la masa ósea (DMO) y con la absorción de Ca en el hueso,

Estudios en ratas han mostrado que el aceite de pescado (rico en ácido grasos omega-3) previene la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas y en modelos de ratas postmenopáusicas comparadas con dietas ricas en ácidos grasos omega-6 como el aceite de maíz (Arunabh et al., 2007).

Uno de estos estudios de investigación realizado en ratones hembra de edad avanzada comparaba los efectos del aceite de maíz (ácidos grasos omega-6) y el aceite de pescado (ácidos grasos omega-3) en la densidad de masa ósea. Tras 6 meses de tratamiento con la dieta, encontraron que las ratas alimentadas con aceite de pescado mantuvieron mayor densidad de masa ósea en distintas regiones, comparadas con las alimentadas con aceite de maíz. Estos resultados se acompañan de una disminución de la actividad pro-inflamatoria de citoquinas, TNF α , IL-1 e IL-6 y un (aunque no significativo estadísticamente) importante aumento en marcadores de formación ósea como la osteocalcina en plasma (ver Figura16). Se vio también una menor generación de osteoclastos en los cultivos de células de médula ósea en los ratones alimentados con aceite de pescado. Por lo que queda patente que, el efecto modulador de los ácidos grasos esenciales sobre las citoquinas juega un importante papel sobre el remodelado óseo (Arunabh et al., 2007).

De acuerdo con Casado-Díaz et al. (2013), el consumo de ácidos grasos omega-3 puede proteger contra la osteoporosis, ya que estos ácidos grasos tienen la capacidad de inhibir la osteoclastogénesis. Sin embargo, con el envejecimiento, las células madre mesenquimales (MSC) de la médula ósea se diferencian cada vez más en los adipocitos, reduciendo el número de osteoblastos. Los productos derivados de ácidos grasos omega-6 y omega-3, así como los propios ácidos grasos, pueden afectar el metabolismo de la diferenciación en las MSC a osteoblastos y adipocitos. De hecho, los precursores de las MSC pueden diferenciarse en adipocitos en lugar de osteoblastos, según avanza el proceso de envejecimiento.

Figura 16: Efecto de los ácidos grasos omega-3 en la relación entre las citoquinas y la osteoclastogénesis. IL-1 - interleucina-1; IL-6 - interleucina-6; TNF- α - factor de necrosis tumoral- α .



Kajarabille N et al., The ScientificWorld Journal, 2013.

Como se ha comentado anteriormente, de acuerdo con la relación de consumo entre omega-6/omega-3, se producirán ciertos tipos de metabolitos, con la consecuente modificación de algunos procesos fisiológicos y por tanto, la susceptibilidad o resistencia frente a diferentes patologías óseas. En general, los procesos fisiológicos que implican metabolitos derivados de estos dos tipos de ácidos grasos poliinsaturados actúan de forma opuesta entre sí. De este modo, los eicosanoides derivados de ácidos grasos omega-6 son considerados principalmente pro-inflamatorios, mientras que los derivados de ácidos grasos omega-3 actúan generalmente como anti-inflamatorios (Schmitz & Ecker 2008; Casado-Díaz et al. 2013).

Una dieta rica en ácidos grasos omega-6, eleva el ratio omega-6/omega-3, lo cual parece causar no sólo problemas cardiovasculares, sino también un aumento del tejido adiposo de la médula ósea, mediante el aumento de la diferenciación de adipocitos de las MSC, inhibiendo la diferenciación a osteoblastos, lo cual podría tener un impacto negativo

sobre el metabolismo óseo. Se ha comprobado que una dieta con una proporción adecuada de ácidos omega-6/omega-3 evita patologías óseas asociadas al envejecimiento, tales como la osteoporosis. Esto se debe a que los ácidos grasos omega-3 no ejercen una fuerte capacidad de inducción a la adipogénesis como sucede con los ácidos grasos omega-6, lo que permite al osteoblastogénesis. Este hecho, junto con su efecto inhibitor sobre la osteoclastogénesis, puede mejorar el mantenimiento de la masa mineral ósea (Salari & Abdollahi 2009).

El aceite de pescado y el bajo ratio omega-6/omega-3 ha mostrado promover la formación ósea en animales en crecimiento (Green et al. 2004; Iwami et al. 2011).

En ratas hembra ovariectomizadas a las que se dio una dieta baja en calcio vs. una normal, con o sin suplementos de EPA, se encontró que el peso óseo del fémur y tibia disminuían significativamente en el grupo bajo en calcio, sin embargo la disminución fue significativamente menor en el grupo suplementado con EPA. Los resultados sugieren que una dieta enriquecida en EPA previene la pérdida ósea y de fuerza causada por el déficit de estrógenos que podría ocurrir en la posmenopausia (Watkins et al. 2001).

En un estudio realizado por Lukas et al. (2011), se evaluó el efecto de diferentes fuentes de AGPI omega-3 en el hueso durante el crecimiento en ratas jóvenes. Fueron asignadas a grupos con una dieta consistente en aceite de maíz o diferentes fuentes de omega-3 (atún, lino, krill o salmón). Los resultados mostraron que las ratas alimentadas dietas ricas en DHA, tuvieron una mayor DMO en tibia y mayor contenido mineral óseo, además de una menor lipoperoxidación, comparada con las alimentadas con aceite de maíz.

Iwami-Marimoto et al. (1999), investigaron la influencia de la suplementación con aceite de pescado (rico en omega-3) comparada con el aceite de semillas (rico en omega-6) en el desarrollo de los dientes en ratas. La suplementación con omega-3 mostró una disminución de la formación osteoclástica en un 60% y la resorción alveolar ósea en un 80% en las ratas alimentadas con aceite de pescado, en comparación con las alimentadas con aceite de maíz.

Korotkova et al. (2004) investigaron los efectos a largo plazo de distintos ratios de ácidos grasos durante el periodo neonatal sobre los parámetros óseos en la descendencia en

ratas. Durante la gestación y lactancia las ratas fueron alimentadas con una dieta de semillas de lino (omega-3), soja (omega-3 y 6) o girasol (omega-6). Se hizo un seguimiento a la descendencia hasta las 30 semanas de edad. La longitud ósea y el contenido mineral óseo del área cortical fueron significativamente mayores con la dieta que aportaba n-6 junto con n-3, comparada con el resto de grupos.

A pesar de todo lo comentado y los resultados hallados, pocos estudios han evaluado la relación entre las grasas de la dieta y el estatus óseo en humanos. Estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre el ratio omega-6/omega-3 en la dieta y la densidad mineral ósea en adultos mayores (Griel et al. 2007).

Varios estudios han mostrado menor incidencia de fracturas en los países mediterráneos y se ha sugerido una asociación entre la dieta mediterránea, rica en omega-3 y con cantidades relativamente bajas de omega-6 con una menor tasa en la pérdida ósea en adultos mayores. Sin embargo, esto puede verse afectado por numerosos factores dentro del propio estilo de vida (Högström et al. 2007; Bonnet & Ferrari 2011).

En un estudio realizado en hombres jóvenes (entre 22 y 24 años) se vio que los omega-3, principalmente el DHA, están asociados positivamente con el aumento de la densidad mineral ósea y con el pico de masa ósea (Högström et al. 2007).

Estudios de suplementación en edad avanzada, sugieren que los omega-3 pueden mejorar el mantenimiento de la densidad de masa ósea en esta población. (En un estudio aleatorizado con 40 pacientes con osteoporosis, los sujetos que tomaban un suplemento rico en omega-3 mostraron mejor absorción de calcio, además de niveles más elevados de los marcadores de formación ósea, comparados con el grupo placebo (Rahman et al. 2007).

El efecto de los omega-3 en el esqueleto parece ser además dependiente del ratio entre los 2 principales ácidos grasos omega-3: EPA y DHA. En estudios *in vivo*, se demostró que el DHA inhibe la diferenciación de osteoclastos, activación y función, mediante la inhibición de PGE2, más eficientemente que el EPA. Además, los omega-3, particularmente DHA, mejora

la absorción de calcio, modificando la composición de las membranas intestinales y disminución de la pérdida de calcio intestinal (Bonnet & Ferrari 2011).

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Como se ha indicado anteriormente, el papel de la nutrición dentro de la medicina preventiva está ampliamente reconocido, adquiriendo últimamente una especial importancia la grasa como nutriente. En este campo de la prevención, el embarazo y lactancia son etapas en las cuales una adecuada nutrición cobra una especial relevancia para el óptimo desarrollo del feto primero y del recién nacido después. El suministro de nutrientes en estas etapas críticas de la vida, como son el periodo fetal y posnatal, tiene importantes efectos en la determinación del estado de salud en la edad adulta.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie omega-3, y especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA), son uno de los nutrientes más estudiados en etapas precoces de la vida, principalmente por su relación con el desarrollo del sistema nervioso central, ya que son componentes esenciales de las membranas neuronales y retinianas, además se acumulan de forma rápida en el cerebro y en la retina durante la última etapa de la gestación y el comienzo de la vida postnatal. La capacidad de biosíntesis endógena del DHA es limitada en el feto y en el recién nacido y, por tanto, se considera condicionalmente esencial y requerido en la dieta. Su aporte durante la vida fetal y del recién nacido va a depender de la transferencia placentaria y de la leche materna, siendo para ello fundamental el suministro de este nutriente en la dieta de la madre. Por tanto, la grasa podría ser utilizada en este periodo de la vida desde un punto preventivo de la enfermedad.

La suplementación con DHA durante el embarazo y la lactancia ha mostrado efectos positivos sobre diferentes aspectos relacionados con el desarrollo del recién nacido. A partir de diversos estudios, fundamentalmente en neonatos, se ha visto la asociación de la ingesta de DHA materna con el adecuado desarrollo cognitivo y visual, reforzando la necesidad de asegurar un aporte adecuado al feto y lactante a través de la alimentación materna.

Sin embargo, hay determinados aspectos relacionados con el aporte de DHA materno al feto y al niño relacionados con su desarrollo y salud en etapas posteriores de la vida que no han sido estudiados hasta el momento y podrían tener una influencia decisiva en esta etapa precoz de la vida.

Entre estos aspectos se encuentra la relación del DHA durante el embarazo y lactancia con respecto al metabolismo óseo y el estrés oxidativo tanto materno como del recién nacido, aspectos donde la suplementación materna podría jugar un papel importante.

En relación al estrés oxidativo, el embarazo es un estado fisiológico acompañado de una alta demanda metabólica, un incrementado requerimiento de oxígeno y una incrementada producción de radicales libres. Se ha observado una mayor agresión oxidativa en mujeres gestantes, respecto a las no gestantes. En el parto, se ha observado un elevado nivel de estrés oxidativo tanto en la madre como en el recién nacido. En este campo, la suplementación con DHA muestra controversias. Diversas líneas de investigación sugieren que existe una protección oxidativa tras la suplementación con DHA. Por otra parte, algunos autores consideran que el efecto que presenta este ácido graso es consecuencia de la mayor agresión oxidativa, ya que no debemos olvidar que se trata de un ácido graso altamente poliinsaturado y por tanto, diana de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

En relación al remodelado óseo, el consumo de omega-3 como el DHA podría ser beneficioso en este proceso, inhibiendo la resorción ósea y estimulando la formación. Este efecto podría ser importante en la etapa inicial del recién nacido, ya que durante el primer año de vida se produce un rápido proceso de osificación, en el que los procesos de formación ósea exceden los de resorción, lo que resulta en la adquisición de hueso. En este aspecto, la suplementación con DHA está poco estudiada y ausente en el campo de la gestación, parto y lactancia.

La existencia de estas controversias unido a la falta de información en las etapas fisiológicas de la gestación, lactación y desarrollo postnatal es lo que ha motivado el desarrollo de este trabajo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- Analizar si la suplementación materna durante la gestación (último trimestre) y lactación con un producto lácteo enriquecido con aceite de pescado (320 mg de DHA y 72 mg de EPA) puede afectar al estrés oxidativo materno y neonatal durante sus primeros meses de vida.
- Analizar si la suplementación materna durante la gestación (último trimestre) y lactación de un producto lácteo enriquecido con aceite de pescado (320 mg de DHA y 72 mg de EPA) puede afectar en el proceso de remodelado óseo materno y neonatal durante sus primeros meses de vida.

MATERIAL y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 TIPODE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trata de un ensayo nutricional controlado, aleatorizado y doble ciego con un tamaño de muestra de 110 mujeres junto con sus recién nacido a término, con una duración desde la semana 28 de gestación hasta el final de la lactancia materna, los 4 meses de vida del recién nacido. Las voluntarias fueron captadas en dos hospitales: Hospital Materno-Infantil Virgen de las Nieves de Granada y Hospital Universitario Materno-Infantil de las Islas Canarias.

Las mujeres embarazadas se adscribieron de forma aleatoria y mediante doble ciego a uno de los 2 grupos que se describen a continuación:

- **Grupo Control (n=54):** ingesta de 400 ml/día (en dos tomas de 200 ml) de la bebida láctea control.

- **Grupo DHA (n=56):** ingesta de 400 ml/día (en dos tomas de 200 ml) de la bebida láctea enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega-3 que supone un aporte de 392 mg/día EPA+DHA (320 mg DHA y 72 mg EPA).

Ambos productos lácteos, control y enriquecido en DHA, fueron cedidos por la empresa Lactalis Puleva (Granada, España). Actualmente no son productos comercializados y fueron producidos exclusivamente para el estudio. La composición de los mismos se muestra en la tabla 2. Los productos lácteos fueron distribuidos en envases blancos sin ningún etiquetado que reflejase el contenido. De esta forma, ni las gestantes ni los investigadores responsables del estudio conocían el grupo al que pertenecía cada voluntaria (doble ciego). Igualmente, a cada voluntaria se le asignó una clave para garantizar la confidencialidad de sus valores analíticos.

Tabla 2: Composición del producto lácteo utilizado como suplemento de DHA y el control.

	Producto lácteo DHA-EPA	Producto lácteo control
Energy (kcal-kJ/100 mL)	58-145	58-145
Protein (g/100 mL)	3.7	3.7
Carbohydrates (g/100 mL)	6.7	6.7
Fats (g/100 mL)	1.8	1.8
Saturated (g/100 mL)	0.32	0.36
Monounsaturated (g/100 mL)	1.06	1.10
Polyunsaturated (g/100 mL)	0.42	0.34
EPA (mg/100 mL)	18	-
DHA (mg/100mL)	80	-
Folic Acid (µg/100 mL)	80	80
Vitamin B ₁₂ (µg/100 mL)	0.4	0.4
Vitamin C (mg/100 mL)	9.0	9.0
Vitamin D (µg/100 mL)	0.75	0.75
Vitamin E (mg/100 mL)	1.5	1.5
Calcium (mg/100 mL)	160	160
Iron (mg/100mL)	2.2	2.2
Iodine (µg/100mL)	23.0	23.0

Estudio nutricional materno

Un factor importante en este ensayo es el estado nutricional, ya que la nutrición materna es un factor que puede indicar diferencias en el estudio, por lo que se supervisó la ingesta dietética de la madre durante el período de intervención, el cual comenzó en la semana 28 de gestación (sexto mes de embarazo) y concluyó a los 4 meses postparto.

La ingesta dietética materna fue evaluada mediante un cuestionario de frecuencia de consumo compuesto por 110 ítems que incluía preguntas específicas sobre el consumo de fuentes de DHA como peces de agua dulce, mariscos, conservas de atún y las sardinas, el salmón, la trucha y el aceite de hígado de bacalao (**VER ANEXO I**) (Parra-Cabrera et al. 2011; García-Rodríguez et al. 2012) junto con un recordatorio de la dieta de 72 horas. Los

cuestionarios de frecuencia de alimentos se registraron en el momento de la captación, un mes después de comenzar el estudio y en el primer mes de lactancia. Junto con estos cuestionarios, a las madres se les dieron recomendaciones nutricionales adaptados a sus condiciones de gestación y lactancia, además de recomendaciones relacionadas con el adecuado consumo de pescado como fuentes diarias de EPA + DHA (2/3 porciones por semana), algo realmente importante desde un punto de vista ético. El análisis de la ingesta nutricional se realizó utilizando el software v.1.1.1 Nutriber (FUNIBER, Barcelona (España)).

Toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de la madre en el momento de la captación a los 6 meses de embarazo (SM0), en el parto (SM1) y durante el periodo de lactancia, a los 2,5 meses post-parto (SM2) y 4 meses post-parto (SM3).

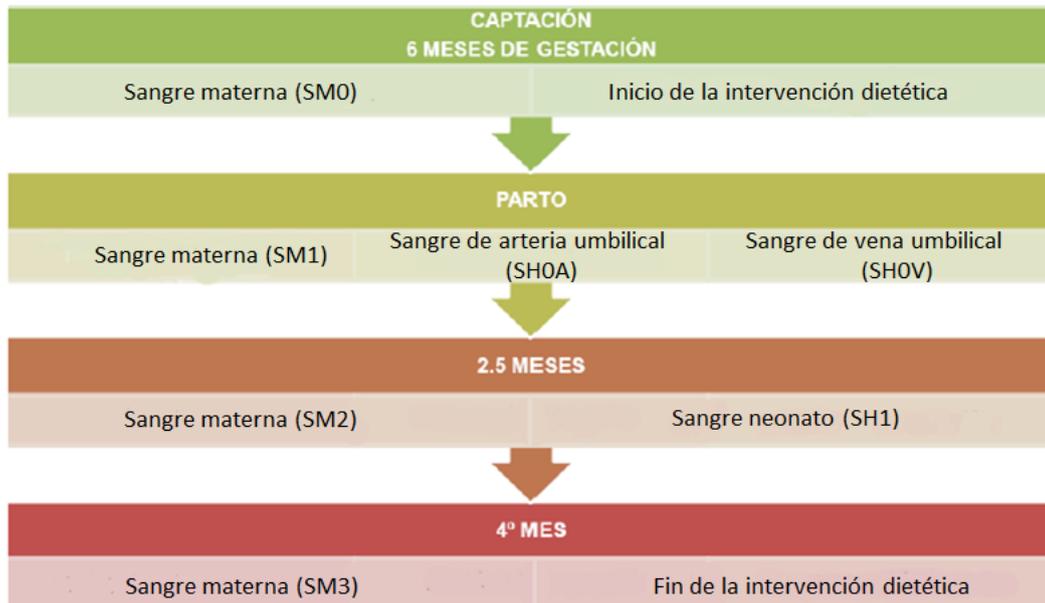
Se obtuvieron una muestra de sangre de cordón umbilical (5ml) venosa (SH0V) y otra arterial (SH0A) en el momento del parto y además, una muestra de sangre del niño a los 2,5 meses de vida (SH1).

Las diferentes muestras de sangre se tomaron en la consulta de obstetricia (durante el embarazo), en la sala de partos (muestra de cordón umbilical) y en la consulta de pediatría (muestras post-parto).

Este estudio cuenta con el informe favorable de los Comités de Bioética de Investigación en Seres Humanos de ambos hospitales.

Escrito el consentimiento informado se obtuvo de cada participante luego de una explicación detallada del estudio; las participantes eran libres de abandonar el estudio en cualquier momento sin consecuencia alguna. El estudio se ha registrado en www.clinicaltrials.gov (clinical trials identifier NCT01947426).

Figura 17: Esquema cronológico de la toma de muestras.



4.2 SELECCIÓN DE SUJETOS

La captación de las voluntarias se realizó en el servicio de Ginecología de los dos hospitales: Hospital Universitario Materno-Infantil Virgen de las Nieves (Granada) y Hospital Universitario Materno-Infantil de las Islas Canarias.

A continuación se exponen los criterios de inclusión y exclusión empleados:

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para la madre fueron los siguientes:

- No presentar ninguna enfermedad

- Embarazo de curso normal
- Índice de masa corporal de entre 18-30 kg/m² al inicio del embarazo
- Aumento de peso de entre 8-12kg desde el inicio del embarazo
- No toma suplementos con DHA.

Los criterios de inclusión para los recién nacidos:

- Edad gestacional entre 38-42 semanas
- Parto vaginal
- Peso adecuado para la edad gestacional
- Índice de Apgar ≥ 7 al primero y quinto minuto de vida
- Ausencia de patologías al nacimiento.

Criterios de exclusión

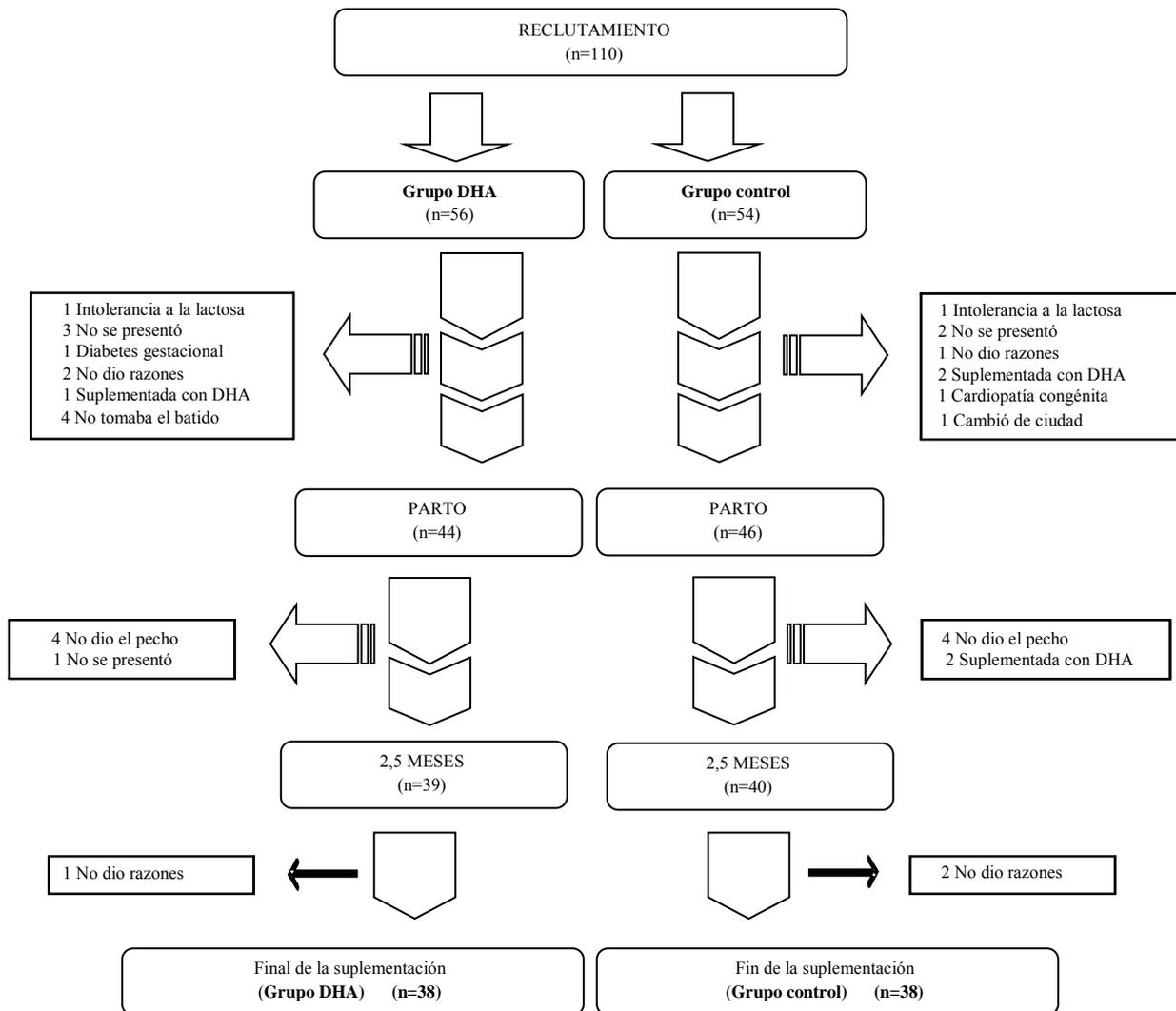
Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Factores de riesgo en el embarazo
- Intolerancia a la lactosa
- Intolerancia a las proteínas de la leche de vaca
- Enfermedad sistémica grave
- Alimentación incorrecta o alternativa
- Déficits que impliquen el uso de suplementos farmacológicos a partir de la semana 24
- Enfermedad metabólica (diabetes e hipertensión gestacional)

- Embarazos múltiples
- Cromosomopatías y malformaciones fetales
- Retraso del crecimiento intrauterino
- Muerte fetal
- Cualquier patología que requiera de una intervención terapéutica (oxigenoterapia, soporte ventilatorio, nutrición parenteral, terapia infecciosa)
- Madres con lactancia materna con alguna enfermedad que precise tratamiento médico que altere la composición de la leche materna
- Circunstancias que a juicio de los investigadores muestren bajas expectativas de cumplimiento con el protocolo del ensayo

Se partió de 110 mujeres, 54 en el grupo control y 56 en el grupo DHA (ver diagrama de flujo con el progreso de las participantes).

Figura 18: Diagrama de flujo que muestra el progreso de las participantes y el abandono durante el estudio.



4.3 DESCRIPCIÓN DE LA ANALÍTICA REALIZADA

4.3.1 Obtención de la muestra

Las muestras de sangre (5ml) se obtuvieron de las madres en el momento de la inscripción (semana 28 de gestación), en el parto, a los 2,5 meses de lactancia materna y al final de la intervención dietética (4 meses después del parto). En lo que respecta a los recién nacidos, se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical (vena y arteria), y a los 2,5 meses de vida.

Una porción de la sangre se centrifugó inmediatamente a 1750 g durante 10 min a 4°C (Beckman GS-6R, Fullerton, CA, USA) para separar el plasma del paquete eritrocitario. Las muestras de plasma fueron inmediatamente congeladas y almacenadas a -80 ° C hasta su análisis.

Para la obtención de citosol y membranas eritrocitarias se ha seguido el método descrito por Hanahan y Ekholm (Hanahan et al., 1974) ligeramente modificado. Una vez separado el plasma por centrifugación, se procede a la eliminación de los leucocitos de la muestra por medio de un lavado con tampón hipotónico 20mOSM de pH 7.6 y posterior centrifugación a 15.000 rpm durante 20 minutos a 4° C, del cual se obtiene el citosol. Este procedimiento de lavado se repite dos veces más, para obtener las membranas. Finalmente las muestras fueron congeladas a -80°C hasta el momento de ser analizadas.

4.4 DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

4.4.1 Indicadores de daño oxidativo en plasma y membrana eritrocitaria materna y del recién nacido

La concentración de peróxidos en muestras de plasma se midió mediante un kit comercial: Colorimetric assay for the quantitative determination of peroxides in EDTA plasma, serum and other biological fluids (Oxystat. Ref: BI-5007) (BIOMEDICA, Viena, Austria). La concentración de peróxidos se determina por reacción de los peróxidos biológicos con la peroxidasa y posterior reacción de color utilizando TMB (tetrametilbenzidina) como sustrato. Tras la adición de la solución de parada, se midió la absorbancia a 450nm. Mediante el uso del calibrador, se calculan los resultados que muestran una correlación directa entre los radicales libres y los peróxidos biológicos circulantes y permiten así la caracterización del nivel oxidativo en las muestras biológicas. La preparación de las muestras, reactivos y estándares, se realizó siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

La concentración de peróxidos en membranas de eritrocito se midió mediante un kit comercial: Pierce Quantitative Peroxide Assay Kit, aqueous-compatible formulation (Ref: 23280) (Thermo Scientific; Pierce Biotechnology, Rockford, USA). En este ensayo, los hidroperóxidos convierten el Fe^{2+} en Fe^{3+} en un pH ácido. Los peróxidos reaccionan primero con sorbitol, convirtiéndolo a radical peroxilo, el cual inicia la reacción, oxidando el Fe^{2+} a Fe^{3+} . En la solución de ácido sulfúrico, los complejos Fe^{3+} tiñen con el xylenol orange dando como resultado un producto de coloración púrpura, en el que tras 20 minutos de incubación, se mide la absorbancia a 560nm. La concentración de peróxidos en la muestra se calcula comparando su absorbancia con respecto a la absorbancia dada por la curva estándar. La preparación de las muestras, reactivos y estándares, se realizó siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para el procedimiento acuoso.

4.4.2 Determinación de antioxidantes liposolubles en plasma materno y del recién nacido

Se determinaron los antioxidantes liposolubles en plasma: Vitamina A (retinol), la vitamina E (tocoferol), β -caroteno, Coenzima Q9 y Coenzima Q10. Las muestras de plasma se mezclaron con etanol en tubos de polipropileno y se dejaron incubando en hielo durante 10 minutos, después se añadió hexano y se dejaron de nuevo en hielo durante 5 minutos. Las proporciones utilizadas fueron las siguientes: muestra / etanol / hexano (1: 2,4: 3,6 v / v). Tras el periodo de incubación las muestras se centrifugaron a 2200 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró la fase superior con cuidado y se pasó a un tubo nuevo. Al tubo original se adiciona otra vez hexano para realizar una segunda extracción. Las muestras se secaron finalmente en un Speed Vacum velocidad (a 45°C durante 25-30 minutos).

Las muestras se resuspendieron en una mezcla de Etanol: Isopropanol (90:10, v / v) y fueron analizadas mediante un sistema UPLC-MS/MS, “Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”.

El equipo utilizado fue un UPLC Acquity H-Class acoplado a un detector de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, USA).

Figura 19: Equipo utilizado. UPLC Acquity H-Class acoplado a un detector de triple cuadrupolo Xevo TQ-S.



La separación cromatográfica fue llevada a cabo usando un gradiente isocrático con fase móvil de metanol al 0.1% (v/v) de ácido fórmico. Con un flujo de 600 µl /min, la columna fue mantenida a 40°C y la inyección de volumen fue de 10 µl. La columna utilizada fue una Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 x 100 mm (Waters Corporation, Milford, USA).

La espectrometría de masas por su parte operaba mediante ionización química por presión atmosférica (APCI) en modo de ion positivo. Para incrementar la sensibilidad y selectividad, múltiples análisis de espectrometría de masas fueron llevados a cabo en múltiples reacciones de monitorización (MRM) y los parámetros MS/MS fueron optimizados individualmente utilizando soluciones estándar, de Sigma-Aldrich (mínimo 98% de pureza. Grado HPLC) y se prepara una disolución madre de 1000 mg/L en metanol de cada uno de ellos.

Tras seleccionar los iones precursores, los iones producto fueron obtenidos de la fragmentación de estos precursores tras actuar sobre la muestra el haz energético.

Estos parámetros fueron optimizados previamente para obtener la máxima sensibilidad con la mayor cantidad de iones producidos. Es esta la razón por la cual el triple cuadrupolo es tan sensible, sólo analiza aquello que me interesa, sin prestar atención al resto de cosas presentes en la muestra. Del mismo modo, de los dos iones selecciono el más estable (cuantificación) y el menos estable (cualificación). La función del de cualificación es simplemente localizar el pico, es decir, si está presente esa transición, cuantifica y si no lo está, no cuantifica.

Las transiciones de las moléculas seleccionadas son:

- Vitamina A: 269.287>92.924 (cuantificación), 269.287>80.777 (cualificación)
- Vitamina E: 431.415>165.022 (cuantificación), 431.415>136.975 (cualificación)
- B-Caroteno: 537.606>104.959 (cuantificación), 537.606>94.928 (cualificación)
- Coenzima Q9: 795.713>197.094 (cuantificación), 795.713>94.926 (cualificación)

- Coenzima Q10: 863.777>197.036 (cuantificación), 863.777>94.928 (cualificación)

El tiempo de permanencia para cada transición fue de 25ms, con un retraso entre medidas establecido de 3ms.

Los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

-Voltaje de descarga de corona: 3.80 kV

-Temperatura de la fuente: 150°C

-Temperatura de la sonda: 500°C

-Flujo de gas del cono: 150L/h

-Flujo de gas de desolvatación: 500 L/h

-Flujo de gas de colisión: 0.18 ml/min

-flujo de gas del nebulizador: 7.0 bar.

Nitrógeno (>99.995%) fue usado como gas de desolvatación y en el cono.

Argón (99.995%) fue usado como gas de colisión.

Finalmente, la adquisición de datos fue realizada bajo condiciones de tiempo segmentadas, basadas en la separación cromatográfica de los compuestos a estudio, para maximizar la sensibilidad de la detección. El software empleado fue el MassLynx 4.1. (Waters Corporation, Milford, USA).

4.4.3 Capacidad antioxidante total en plasma materno y del recién nacido

Por otro lado, se realizó la determinación de la capacidad antioxidante del plasma mediante ABTS, por el método descrito por Rice-Evans C et al. 1999 y González Santiago

MP. 2005. Se preparó la solución madre de ABTS (2,2'-Azino-Bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) dimmonium salt) 7mM y se dejó en oscuridad y en agitación 19h. Se preparó también la solución de Trolox 7mM (6-hidroxy-2,5,7,8 Tetramethylchroman-2-carbonane 97%). Las muestras de plasma fueron diluidas en PBS 1X (1:10 v/v). En la microplaca ponemos 4ul de la muestra previamente diluida, agregamos 196ul de la solución ABST (previamente a su uso, se ha de ajustar la absorbancia de la solución entre 680-720 DO a 734nm), y finalmente medimos la absorbancia a 734nm. La curva estándar se realizó utilizando una mezcla de Trolox:Etanol ultra-puro para HPLC (0µl; 125µl; 250µl; 500µl; 750µl; 1000µl). Para realizar los blancos se utilizó PBS1X.

4.4.4 Determinación de antioxidantes liposolubles en membrana de eritrocito materno y del recién nacido

Se determinaron antioxidantes liposolubles en membrana de eritrocito: Vitamina E y Coenzima Q10.

Las muestras de membrana de eritrocito se mezclaron con etanol en tubos de polipropileno y se dejaron incubando en hielo durante 10 minutos, después se añadió hexano y se dejaron de nuevo en hielo durante 5 minutos. Las proporciones utilizadas fueron las siguientes: muestra /etanol/hexano (1:2,4:3,6 v/v). Tras el periodo de incubación las muestras se centrifugaron a 2200 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró la fase superior con cuidado y se pasó a un tubo nuevo. Al tubo original se adiciona otra vez hexano para realizar una segunda extracción. Las muestras se secaron finalmente en un Speed Vacum velocidad (a 45°C durante 25-30 minutos).

Las muestras se resuspendieron en una mezcla de Etanol: Isopropanol (90:10, v / v) y fueron analizadas mediante un sistema UPLC-MS/MS, “Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”.

El equipo utilizado fue un UPLC Acquity H-Class acoplado a un detector de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, USA); las determinaciones se

realizaron siguiendo el mismo procedimiento utilizado y descrito anteriormente para las muestras de plasma.

4.4.5 Capacidad antioxidante enzimática en citosol de eritrocito materno y de recién nacido

En citosol de eritrocito se determinación las siguientes enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutación peroxidasa (GPx).

Para la determinación de SOD se utilizó la técnica descrita por Fridovich (Fridovich 1975. Superoxide dismutase), con algunas modificaciones. En la microplaca se añadió la solución citocromo C, la xantina y el buffer de trabajo con azida (v/v, 1: 1: 5,3). Se añadieron cantidades variables de xantina oxidasa para lograr la reducción adecuada. El aumento de la absorbancia se midió a 550nm durante 1 minuto a 25°C. El espectro resultante se utilizó como estándar. Las siguientes determinaciones se llevaron a cabo con la muestra: en cada pocillo se añade el volumen adecuado de la solución de citocromo C, la xantina, el buffer de trabajo con azida y el volumen adecuado de muestra. A continuación, se añade la cantidad adecuada de xantina oxidada que fue previamente encontrada. Finalmente se mide el aumento de absorbancia a 550nm durante 1 minuto a 25°C (temperatura ambiente). Los resultados se expresan como unidades de actividad por 1 mg de proteína (U/mg).

Para la determinación de la catalasa se utilizó la técnica descrita por (Aebi 1984). Se realizaron diluciones de las muestras de citosol para 1mg de proteína/ml. Para ello previamente se determinó la concentración de proteína mediante un kit comercial: Proteínas Totales (Biuret. Colorimétrico (SPINREACT. Ref: SP1001291)). Para la dilución de la muestra se utilizó un buffer de trabajo (tampón fosfato 50mM (KH₂PO₄), ajustado a pH 7 con Na₂HPO₄) con Triton X-100. En primer lugar, se añade el tampón de trabajo en cada pocillo de la microplaca, seguidamente se añade la cantidad adecuada de muestra (1mg proteína/ml) y por último se añade la solución de peróxido de 30mM (H₂O₂). Finalmente se mide la absorbancia a 240 nm durante 1 minuto a 25°C.

Por último, para la determinación GPx se realizó la técnica descrita por L. Flche & WA. Gunsther (1975), con algunas modificaciones. Se realizaron diluciones de las muestras de citosol para 3mg de proteína/ml. Para ello previamente se determinó la concentración de proteína mediante un kit comercial: Proteínas Totales (Biuret. Colorimétrico (SPINREACT. Ref: SP1001291)). Para la dilución de la muestra se utilizó el siguiente buffer de trabajo: tampón Tris-HCl 50mM ajustado a pH 7, al que se le adicionó EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dehydrate. SIGMA.) 2,5mM. En la placa se agregó el buffer de trabajo en cada pocillo, y seguidamente se añadió la cantidad adecuada de la muestra. Se preparó la solución reactiva: 0,02g de GSH (Reduced glutathione. SIGMA.) + NADPH 0,011g (NADPH Tetrasodium salt. CALBIOCHEM.) diluido en 20 ml de buffer de trabajo. Se tomaron 10 ml de la solución reactiva a la que se le añadieron 26,7 μ l la glutatión reductasa (Glutathione reductase. ROCHE). Se agita la placa por 30 segundos y se añade la cantidad adecuada de la solución reactiva a cada pocillo (75 μ l), por último se añade el Tert-Butil H₂O₂ (25 μ l). Se midió la absorbancia a 340 nm durante 1 minuto a 25°C.

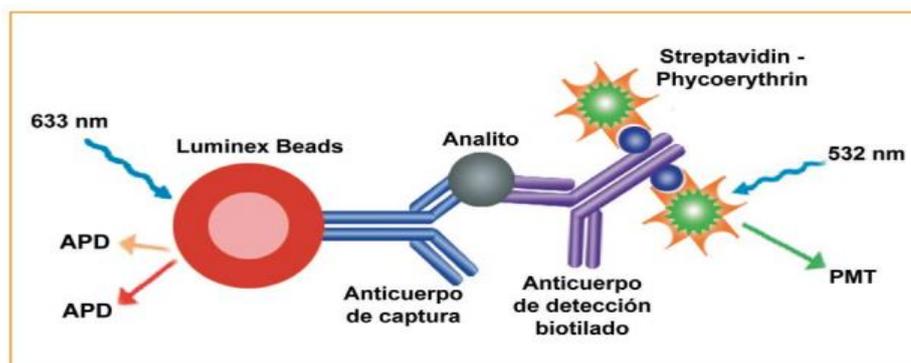
4.5 DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES ÓSEOS EN PLASMA MATERNO Y DE RECIÉN NACIDO

Para la determinación de los marcadores óseos, se utilizó un kit de tecnología MILLIPLEX MAP basado en la tecnología Luminex xMAP, una de las tecnologías de multiplexación capaz de llevar a cabo una serie de bioensayos incluyendo inmunoensayos mediante el uso de perlas fluorescentes codificadas, conocidas como microesferas.

Luminex utiliza técnicas propias de microesferas con un código de colores internos con dos tintes fluorescentes. A través de las concentraciones exactas de estos tintes, se pueden crear 100 conjuntos de perlas distintamente coloreados, cada una de las cuales está revestida con un anticuerpo de captura específica. Después de que un analito de la muestra de ensayo es

capturado por una de las perlas, se introduce un anticuerpo de detección biotilado. La mezcla de la reacción se incuba con estreptavidina-PE conjugada, la molécula informadora, para completar la reacción en la superficie de cada uno. Se pasan las microesferas rápidamente a través de un láser que excita los colorantes internos que marcan el conjunto de microesferas. Un segundo láser excita PE, el colorante fluorescente en la molécula informadora. Finalmente, procesadores digitales de alta velocidad identifican cada microesfera individual y cuantifican el resultado de su bioensayo basado en señales fluorescentes.

Figura 20: Fundamento de la técnica Luminex. (PMT: photomultiplier; APD: avalanche photodiode)



La capacidad de añadir múltiples perlas conjugadas a cada muestra da como resultado la capacidad de obtener varios resultados de cada muestra.

Para la determinación de los biomarcadores óseos ACTH, PTH, osteocalcina, osteopontina, OPG, leptina e insulina, se utilizó el panel óseo de Millipore (USA) Human Bone Panel 1A (Cat. No. HBNMAG-51K) y para la determinación del biomarcador óseo RANK-L el panel óseo de la misma compañía MILLIPLEX MAP RANK-L Single Plex (Cat. No. HBN51k1RANK-L). Para la realización de ambos paneles se siguieron las instrucciones dadas por la casa comercial tanto para la preparación de los reactivos, como de las muestras y los estándares. Aunque se modificó la dilución en el panel óseo 1A, en el que las muestras

fueron diluidas a la mitad con el buffer diluyente (1:2 v/v), mientras que en el panel RANK-L las muestras no fueron diluidas.

El protocolo de ensayo fue el siguiente:

- 1) Adicionar 25 μ l de buffer de ensayo a cada pocillo.
- 2) Adicionar 25 μ l de cada estándar o control en los pocillos apropiados.
- 3) Adicionar 25 μ l buffer de ensayo en los pocillos de muestras y adicionar 25 μ l de una matriz sérica al blanco, estándares y controles.
- 4) Adicionar 25 μ l de muestra en sus correspondientes pocillos.
- 5) Agitar mezclando el bote de mezcla y adicionar 25 μ l de la mezcla de microesferas a cada pocillo (durante la adición de las microesferas agitar el bote intermitentemente para evitar asentamientos)
- 6) Sellar la microplaca e incubar en oscuridad y con agitación toda la noche (16-18 horas) a 4°C.
- 7) Tras la incubación, eliminar el contenido y realizar los lavados como indica el protocolo con buffer de lavado.
- 8) Adicionar 50 μ l de los anticuerpos de detección en cada pocillo
- 9) Sellar e incubar con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 10) Adicionar 50 μ l de estreptavidina-ficoeritrina.
- 11) Sellar y agitar 30 minutos a temperatura ambiente. Mantener en oscuridad.
- 12) Lavar dos veces.

13) Adicionar 100µl de fluido del medio (seath fluido) y agitar durante 5 minutos.

14) Leer en el equipo LUMINEX 200TM (Rafer. Madrid, España).

Figura 21: Equipo LUMINEX 200TM.



Las condiciones del equipo fueron las indicadas por el protocolo del kit y fueron las siguientes: Events: 50 por microesfera; Sample Size: 50 µl; Gate Settings: 8.000 a 15.000; Reporter Gain: default (low PMT); Time Out: 60 seconds; Bead Set: OPG/61; OC/63; leptina/39, OPN/64; PTH/74; ACTH/12; Insulina/36; IL-6/34; TNF-α/55.

La curva patrón para el cálculo a partir de la concentración de los diversos biomarcadores óseos, se realizó mediante diluciones sucesivas (1:4) de una solución madre para cada biomarcador. En total se realizaron 6 diluciones por lo que se obtuvo una curva patrón de 7 puntos. Las concentraciones fueron las siguientes: OPG, 30000 pg/ml; ACTH 6000 pg/ml; Insulina, 250000 pg/ml; Leptina 200000 pg/ml; OC, 600000 pg/ml; osteopontina, 400000 pg/ml; PTH, 20000 pg/ml; RANK-L 20000 pg/ml ; IL-6, 6000 pg/ml; TNF-α, 1000 pg/ml.

4.6 CONTENIDO MINERAL EN CITOSOL DE ERITOCITO MATERNO Y DEL RECIÉN NACIDO

La concentración de los minerales en las fracciones citosólicas se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (espectrómetro de PerkinElmer AAnalyst 1100B con WinLab32 para el software de AA, Massachusetts, EE.UU.). Las muestras habían sido previamente mineralizada por el método húmedo en un baño de arena (JR Selecta, Barcelona, España), de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por nosotros (Díaz-Castro et al., 2008). Las muestras se colocaron en un matraz y se disolvieron usando ácido nítrico (HNO_3) al 69% (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta la eliminación total de la materia orgánica. Las muestras se diluyeron con 5 ml de agua Milli-Q para obtener un volumen adecuada. La concentración de P se analizó utilizando un kit comercial: Fósforo-UV SPINREACT (Ref: MI1001155), la preparación de las muestras, los reactivos y los estándares se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Del mismo modo, las muestras obtenidas de citosol liofilizado fueron utilizadas para medir el Ca, Mg, Fe, Cu y Zn.

Dada la importancia de una exacta determinación de los distintos parámetros estudiados se ha llevado a cabo un control de calidad de estas determinaciones. Este control incluye el análisis de un conjunto de patrones primarios y muestras problemas. Los estándar primarios son de dos tipos: propios de cada determinación y sueros controles liofilizados (BCR certified reference material BCR 185; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Los valores obtenidos para estos patrones fueron: Ca = $13,34 \pm 0,10$ mg / g; valor de p = $10,08 \pm 0,12$ mg / g; valor Mg = $1,19 \pm 0,08$ mg / g; valor Fe = 211 ± 3 mg / g; valor Cu = 187 ± 2 mg / g; valor Zn = 139 ± 2 mg / kg, con una media de cinco determinaciones SEM y los valores certificados fueron: Ca = $13,49 \pm 0,1$ mg / g; P = $11,10 \pm 0,13$ mg / g; Mg = $1,26 \pm 0,02$ mg / g; ; Fe = 214 ± 5 mg / g; Cu = 189 ± 4 mg / g; Zn = 143 ± 4 mg / kg.

En nuestro caso, tanto la desviación estándar de la media de los patrones primarios entre ellos, como en relación con las muestras problema no fueron significativos en ningún caso a lo largo de todo el tiempo de experimentación en que se ha realizado el trabajo.

4.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El cálculo del tamaño muestral se ha basado en la capacidad de detectar una diferencia en los niveles de DHA materno de 2.26, con una desviación estándar de 1.43 y usando una potencia del 80% y un nivel de significación de 0.05. Este cálculo nos indica la necesidad de 45 madres, cantidad incrementada en un 20%, para contrarrestar posibles pérdidas y por lo tanto obteniendo un tamaño muestral final de 55 madres por grupo. Los resultados se muestran como Media \pm Error Estándar de la Media (EEM). Se realizó una confirmación previa de seguimiento de criterios de normalidad mediante el uso del test de Kolmogorov-Smirnoff. Las variables categóricas se compararon mediante pruebas de chi-cuadrado. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el uso del test de la t de Student para muestras independientes. Este mismo test ha sido usado también para comparar las diferencias entre madre (SM0, SM1, SM2 y SM3) e hijo (SH0V, SH0A y SH1). Para comprobar las diferencias de los parámetros determinados en los diferentes periodos de tiempo, tanto maternos como del recién nacido, se ha realizado el Modelo Lineal General de medidas repetidas o ANOVA de medidas repetidas con un posterior ajuste mediante Bonferroni para ver las diferencias entre los diferentes tiempos.

En todos los casos se ha tomado $P < 0.05$ como significativo. Para el análisis de los datos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (IBM SPSS Statistics para Windows, 20.0.0. SPSS INC. Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La tabla 3 muestra las características generales de las madres y de los recién nacidos. Como se observa en la citada tabla, la población estudiada no muestra diferencias significativas entre los dos grupos objeto de estudio, observándose por lo tanto homogeneidad en los mismos.

Tabla 3: Características de las madres.

		Grupo Control	Grupo DHA
Madres			
Edad (years)		29.9 ± 4.7	31.6 ± 4.8
Peso (kg)		73.2 ± 12.3	71.7 ± 11.5
Talla (cm)		164.2 ± 6.5	163.2 ± 6.3
Índice de masa corporal (IMC)		27.2 ± 4.6	26.9 ± 4.1
Número de partos	Uno (%)	68.2 %	64.4 %
	Más de uno (%)	31.8 %	35.6 %
Aumento de peso		7.0 ± 2.8	7.4 ± 2.8
Tensión arterial sistólica (mm Hg)		110.5 ± 12.3	106.1 ± 8.7
Tensión arterial diastólica (mm Hg)		65.5 ± 8.1	64.3 ± 6.5
Hemoglobina (g/L)		11.7 ± 1.0	11.8 ± 0.8
Hematocrito (%)		34.4 ± 2.5	34.4 ± 2.5
Glucosa (g/dL)		101.2 ± 29.2	102.5 ± 34.0
Colesterol		257.3 ± 39.2	253.2 ± 41.1
Triglicéridos		169.2 ± 72.5	157.7 ± 42.2

Los datos son medias ± EEM y porcentajes.

Resultados

Tabla 4: Características de los neonatos.

<u>Neonatos</u>		<u>Grupo Control</u>	<u>Grupo DHA</u>
Edad gestacional (semanas)		39.6 ± 1.5	39.3 ± 1.8
Género	<u>varones (%)</u>	51.9 %	47,9 %
	<u>mujeres (%)</u>	48.1 %	52,1 %
<u>Apgar 1</u>		8.6 ± 0.8	8.7 ± 0.7
<u>Apgar 2</u>		8.9 ± 0.5	9.0 ± 0.4
Peso (kg)		3.2 ± 0.5	3.3 ± 0.5
Talla (cm)		50.2 ± 2.7	50.0 ± 2.5
Perímetro encefálico (cm)		34.1 ± 1.4	34.0 ± 1.5

Los datos son medias ± EEM y porcentajes.

5.2 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

5.2.1 Daño oxidativo en plasma: Determinación cuantitativa de peróxidos

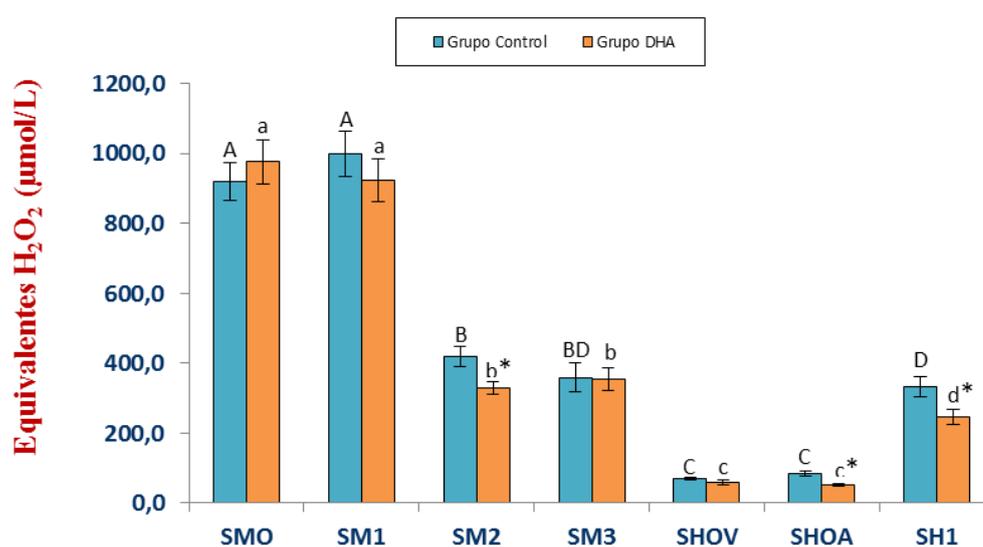


Figura 22: Contenido de peróxidos en plasma en madre (SM0, SM1, SM2 y SM3) y recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 22 muestra el contenido de peróxidos en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En ambos grupos se observaron en las madres mayores concentraciones de peróxidos durante el embarazo y en el parto, mostrando diferencias significativas respecto al resto de tomas. Estas concentraciones disminuyen a la mitad en el posparto, tanto a los 2,5 como a los

4 meses. Respecto a los recién nacidos, en general, las concentraciones de peróxidos son menores en comparación con las observadas en las madres; encontramos valores más bajos en la vena del cordón umbilical y de la arteria, mientras que a los 2,5 meses de vida aumenta la concentración. En el grupo DHA, tanto las madres como los recién nacidos, mostraron el mismo patrón mencionado para grupo de control.

Sin embargo, encontramos diferencias significativas entre los grupos (control vs. DHA), con concentraciones más bajas en el grupo experimental en las madres a 2,5 meses después del parto ($417,58 \pm 29,08 \mu\text{mol/L}$ vs. $329,02 \pm 18,16 \mu\text{mol/L}$; ($p < 0,05$)), en la arteria del cordón umbilical ($84,65 \pm 7,04 \mu\text{mol/L}$ vs. $51,70 \pm 3,83 \mu\text{mol/L}$) y a los 2,5 meses de vida del neonato ($333,33 \pm 29,23 \mu\text{mol/L}$ vs. $246,16 \pm 21,92 \mu\text{mol/L}$).

5.2.2 Daño oxidativo en membranas eritrocitarias: Determinación cuantitativa de peróxidos

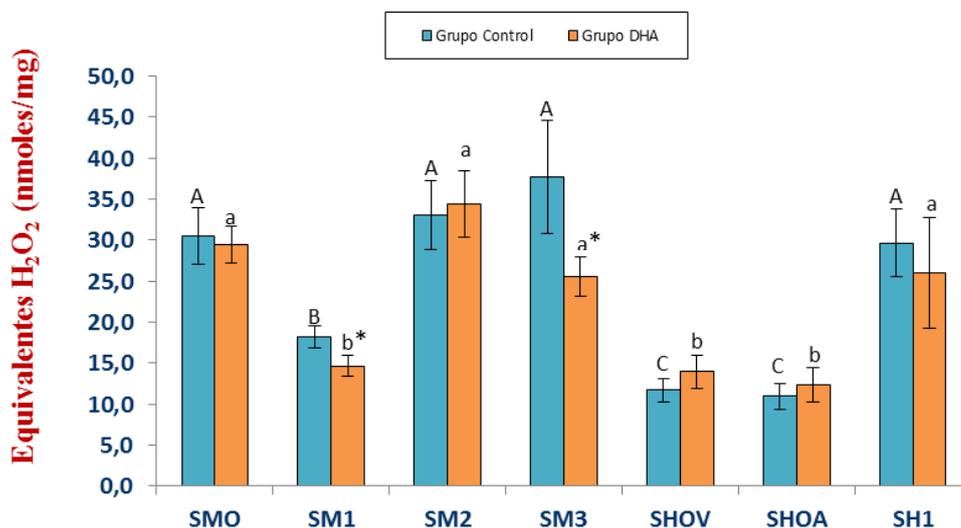


Figura 23: Contenido de peróxidos en membranas de eritrocito en madre (SM0, SM1, SM2 y SM3) y recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 23 muestra el contenido de peróxidos en membranas de eritrocito en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En ambos grupos se observaron mayores valores en las madres al sexto mes de embarazo, y durante el postparto, tanto a los 2,5 meses como a los 4 meses, así como en los recién nacidos a 2,5 meses de vida. Las concentraciones de peróxidos disminuyeron casi a la mitad en momento del parto. En el grupo control los menores valores se encontraron en las muestras obtenidas en el cordón umbilical (vena y arteria), con diferencias significativas a las encontradas en la madre en el momento del parto.

En cuanto a las diferencias entre ambos grupos, encontramos diferencias estadísticamente significativas sólo en el caso de las madres, en el parto ($18,18 \pm 1,30\text{nmol/mg}$ vs. $14,63 \pm 1,28\text{nmol/mg}$) y al cuarto mes posparto ($37,68 \pm 6,86\text{nmol/mg}$ vs. $25,52 \pm 2,44\text{nmol/mg}$).

5.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

5.3.1 Capacidad antioxidante total en plasma

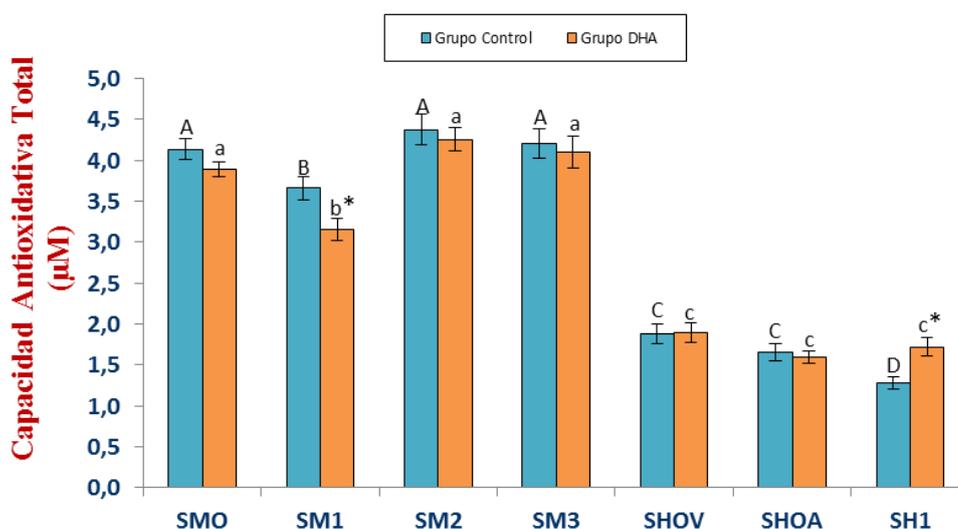


Figura 24: Capacidad antioxidante total en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 24 muestra la capacidad antioxidante en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Tanto en el grupo control como en el grupo DHA encontramos los mayores valores antioxidantes para las madres a los 6 meses de embarazo y durante el postparto tanto a los 2,5 meses como a los 4 meses, mientras que estos valores descienden en el momento del parto (SM1). En los niños en general se observa una menor capacidad antioxidante, siendo

aproximadamente la mitad respecto a encontrada en las madres; en el grupo control los valores se mantienen en vena (SH0V) y arteria (SH0A) de cordón umbilical, mientras que descienden a los 2,5 meses de vida del niño. En el grupo DHA en cambio los valores se mantienen tanto en vena y arteria de cordón umbilical, así como a los 2,5 meses de vida del niño (SH1).

Se observaron diferencias significativas entre grupos control vs. DHA en el parto ($3,66 \pm 0,14\mu\text{M}$ vs. $3,15 \pm 0,14\mu\text{M}$) y a los 2,5 meses de vida del recién nacido ($1,28 \pm 0,08\mu\text{M}$ vs. $1,72 \pm 0,11\mu\text{M}$).

5.3.2 Antioxidantes liposolubles en plasma

5.3.2.1 Retinol

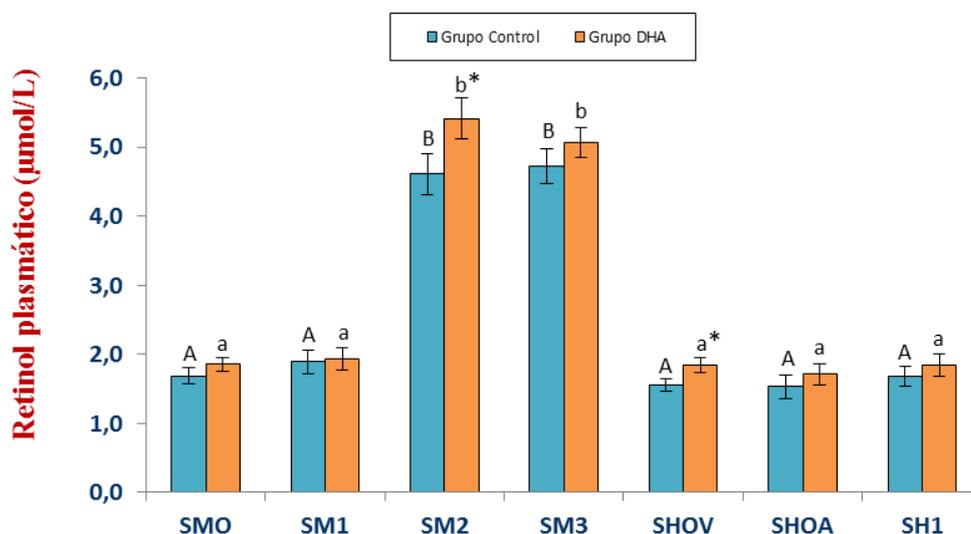


Figura 25: Contenido de retinol en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SH0V, SH0A y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 25 muestra los valores de retinol en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general encontramos diferencias en la evolución entre ambos grupos. Con respecto a las madres, tanto en el grupo DHA como en el grupo control se observó un aumento de los niveles de retinol tras el parto (SM2 y SM3), llegando a alcanzar valores superiores casi del 200% con respecto al momento del parto (SM1) y el embarazo (SMO). Por su parte, los valores presentes en los neonatos a los 2,5 meses de vida, aun siendo ligeramente superiores a los presentados en el momento del nacimiento, distan mucho de alcanzar niveles de las madres en el postparto, aunque sí son similares a los alcanzados por las madres durante el embarazo y el parto.

Se muestran diferencias significativas entre grupos (control vs.DHA) en madres a los 2,5 meses postparto ($4,61 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ vs. $5,41 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$) y en arteria de cordón umbilical ($1,55 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$ vs. $1,84 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$).

5.3.2.2 α -Tocoferol

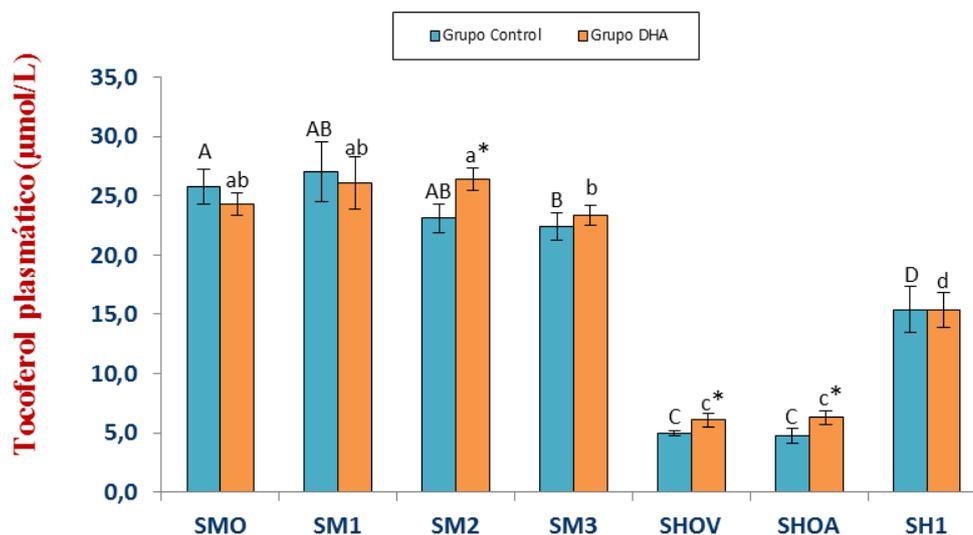


Figura 26: Contenido de tocoferol en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 26 muestra los valores de α -Tocoferol en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general en las madres tanto en el grupo control como en el grupo DHA, se alcanzan los máximos valores de α -Tocoferol en el momento del parto (SM1), sin embargo esos valores descienden en el postparto (SM2 y SM3) en el grupo control, mientras que en el grupo DHA los valores a los 2,5 meses postparto se mantienen al mismo nivel que en el parto. En cuanto a los recién nacidos, tanto el grupo control como el grupo DHA siguen la misma tendencia, siendo similares los valores observados tanto en vena como en arteria de cordón, y llegando a alcanzar los máximos valores a los 2,5 meses de vida, siendo estos los más

elevados, casi un 200% más altos en comparación con los valores encontrados en cordón umbilical.

Se pueden observar diferencias significativas entre grupos (control vs. DHA) en madres a los 2,5 meses tras el parto ($23.12 \pm 1.22\mu\text{mol/L}$ vs. $26.36 \pm 0.91\mu\text{mol/L}$) y en los valores presentes en cordón umbilical, tanto en vena ($4,97 \pm 0.24\mu\text{mol/L}$ vs. $6,09 \pm 0.56\mu\text{mol/L}$) como en arteria ($4,75 \pm 0.59\mu\text{mol/L}$ vs. $6,29 \pm 0.57\mu\text{mol/L}$).

5.3.2.3 β -caroteno

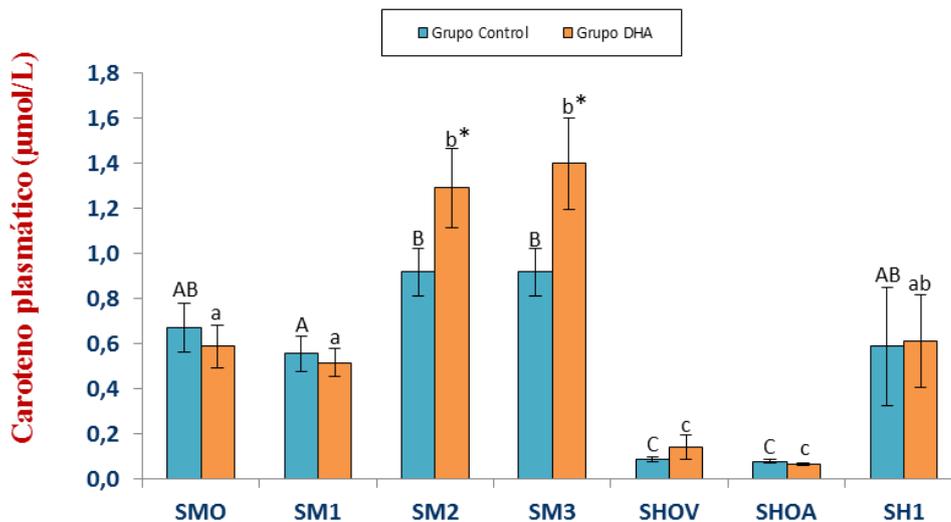


Figura 27: Contenido de β -caroteno en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 27 muestra los valores de β -caroteno en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Los datos obtenidos a los 6 meses de gestación y en el momento del parto en las madres muestran la presencia de mayores niveles de β -caroteno en el grupo control con respecto al grupo DHA, cambiando esta tendencia tras el parto, donde los niveles de β -caroteno aumentan exponencialmente en las madres suplementadas llegando a triplicarse a los 4 meses postparto ($1,40 \pm 0.20\mu\text{mol/L}$), siendo este aumento superior al registrado en el grupo control. En neonatos por su parte los niveles de β -caroteno encontrados en el momento del nacimiento (SH0V y SH0A) fueron muy escasos y sin variaciones significativas entre grupos; posteriormente a los 2,5 meses de vida, ambos grupos presentaban niveles casi 4 veces más altos con respecto al momento del nacimiento (control: $0,59 \pm 0.26\mu\text{mol/L}$ y DHA: $0,61 \pm 0.20\mu\text{mol/L}$).

Se mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en el postparto: SM2 ($0,92 \pm 0.11\mu\text{mol/L}$ vs. $1,29 \pm 0.18\mu\text{mol/L}$) y SM3 ($0,92 \pm 0.11\mu\text{mol/L}$ vs. $1,40 \pm 0.20\mu\text{mol/L}$).

5.3.2.4 Coenzima Q9

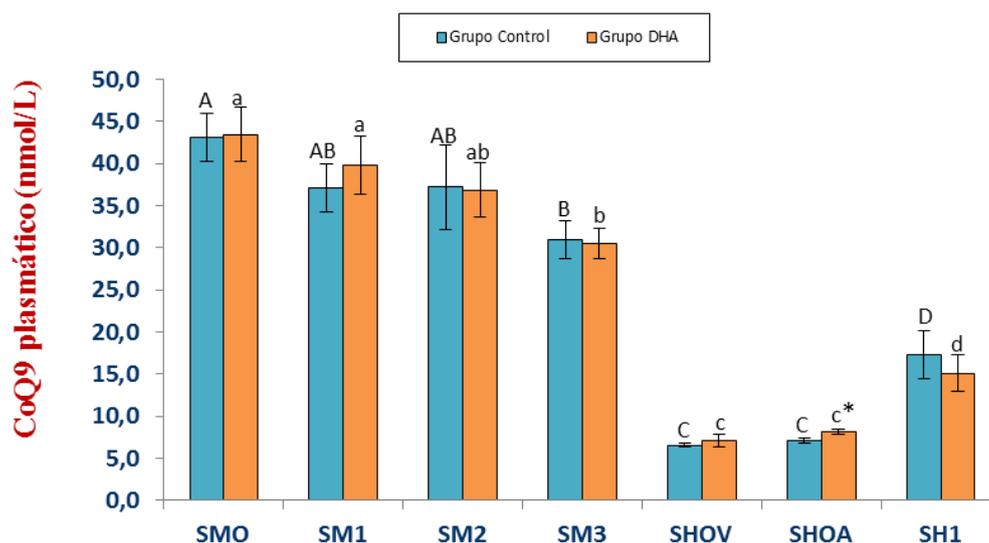


Figura 28: Contenido de Coenzima Q9 en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 28 muestra los valores de Coenzima Q9 en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Se observa una tendencia en las concentraciones obtenidas en madres, tanto suplementadas como en el grupo control, en la cual se parte de la mayor concentración a los 6 meses de embarazo siendo similares en ambos grupos, y se alcanzan los niveles mínimos a los 4 meses postparto, siendo en este caso nuevamente muy similares los valores en ambos grupos. Con respecto a los valores de Coenzima Q9 en neonatos, no existen grandes diferencias entre los valores de arteria y vena, aunque son ligeramente superiores en el grupo DHA, tendencia que se ve invertida a los 2,5 meses de vida, donde los valores para el grupo control ($17,30 \pm 2,91 \text{ nmol/L}$) superan a los del grupo DHA ($15,11 \pm 2,23 \text{ nmol/L}$).

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre grupos (control vs. DHA) en el nacimiento, en muestras de arteria de cordón umbilical ($7,07 \pm 0,34 \text{ mmol/L}$ vs. $8,16 \pm 0,29 \text{ nmol/L}$).

5.3.2.5 Coenzima Q10

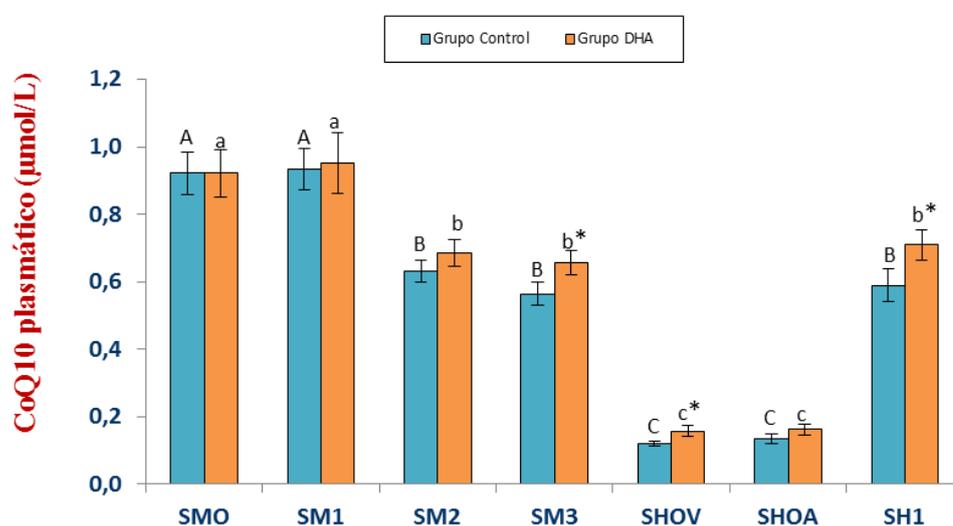


Figura 29: Contenido de Coenzima Q10 en plasma materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 29 muestra los valores de Coenzima Q10 en plasma en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Se observa una dinámica similar a la encontrada para el Coenzima Q9, aunque en mayor concentración (por tratarse de la especie mayoritaria en humanos). En madres las máximas

concentraciones en el caso de ambos grupos se observan durante la gestación y el parto, disminuyendo posteriormente en el parto y alcanzando valores mínimos a los cuatro meses postparto. En neonatos, se alcanzan los valores máximos a los 2,5 meses de vida, llegando a ser hasta cuatro veces superiores con respecto a los valores observados en la muestras de cordón (SH0A y SH0V).

En general, se observan mayores valores en el grupo DHA, con diferencias significativas en madres a los cuatro meses postparto ($0,56 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ vs. $0,66 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$) y en el caso de los recién nacidos en vena de cordón umbilical ($0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ vs. $0,16 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$) y a los 2,5 meses de vida ($0,59 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ vs. $0,71 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$).

5.3.3 Antioxidantes liposolubles en membranas eritrocitarias

5.3.3.1 α -Tocoferol

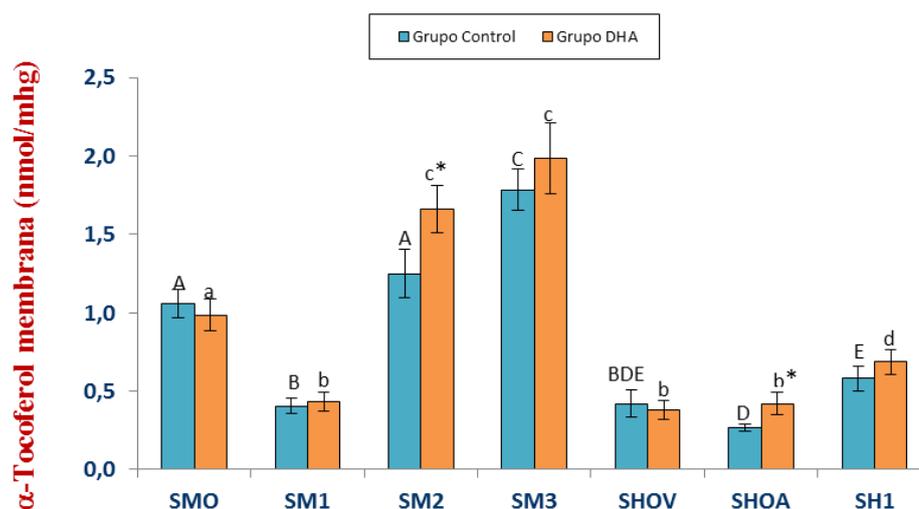


Figura 30: Concentraciones de α -tocoferol en membranas de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 30 muestra los valores de α -tocoferol en membranas de eritrocito en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4^o mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general, los valores más altos, tanto en el grupo control como en el grupo DHA, se observan en las madres durante el postparto, llegando a los máximos valores a los cuatro meses postparto, y duplicando los valores con respecto al momento del embarazo. Los valores más bajos se encuentran en el momento del parto, llegando a ser inferiores en un 50% con respecto a los valores observados durante el embarazo. Este mismo patrón se observó en los recién nacidos de ambos grupos, donde los valores más bajos se encuentran en el nacimiento (SHOA y SHOV). Estos valores ascienden ligeramente a los 2,5 meses de vida del neonato.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (control vs. DHA), en las madres a los 2,5 meses postparto ($1,25 \pm 0.15$ mmol / mg vs. $1,66 \pm 0.15$ nmol / mg) y en recién nacidos, en arteria del cordón umbilical ($0,27 \pm 0.02$ mmol / mg vs. $0,42 \pm 0.07$ nmol / mg).

5.3.3.2 Coenzima Q10

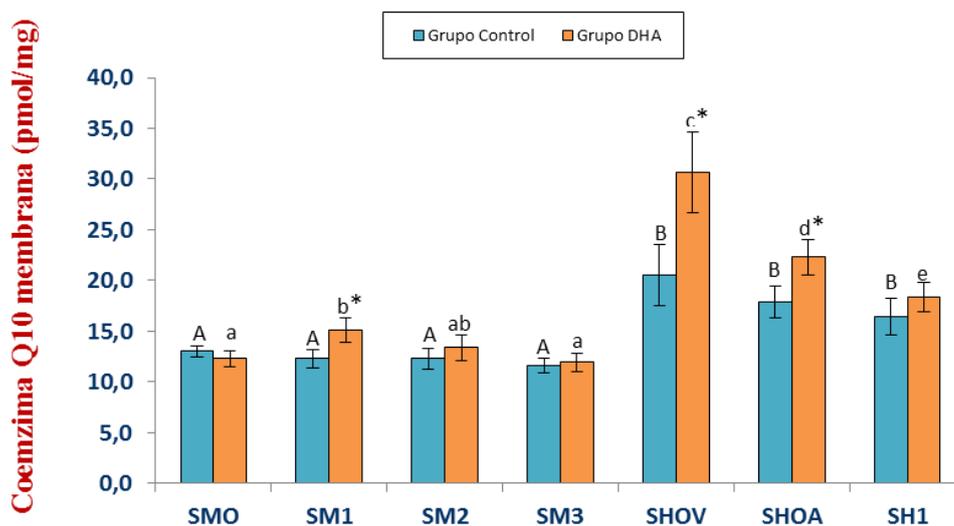


Figura 31: Concentraciones de Coenzima Q10 en membranas de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 31 muestra los valores de Coenzima Q10 en membranas de eritrocito en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Las madres mostraron valores similares desde el sexto mes de embarazo hasta el cuarto mes tras el parto. En general, los mayores niveles de CoQ10 se han encontrado en los recién nacidos, sobre todo en las muestras de vena del cordón umbilical, llegando a ser estas el 200% con respecto a los valores observados en las madres en cualquiera de las etapas.

Se observaron diferencias significativas entre grupos (control vs. DHA) en madres en el momento del parto ($12,29 \pm 0,91$ pmol / mg vs. $15,10 \pm 1,26$ pmol / mg), así como en los neonatos en el nacimiento, tanto en muestras de vena de cordón umbilical ($20,50 \pm 3,05$ pmol / mg vs. $30,69 \pm 3,96$ pmol / mg) como en arteria ($17,91 \pm 1,58$ pmol / mg vs. $22,29 \pm 1,76$ pmol / mg).

5.3.4 Enzimas antioxidantes en citosol de eritrocito

5.3.4.1 Superóxido dismutasa (SOD)

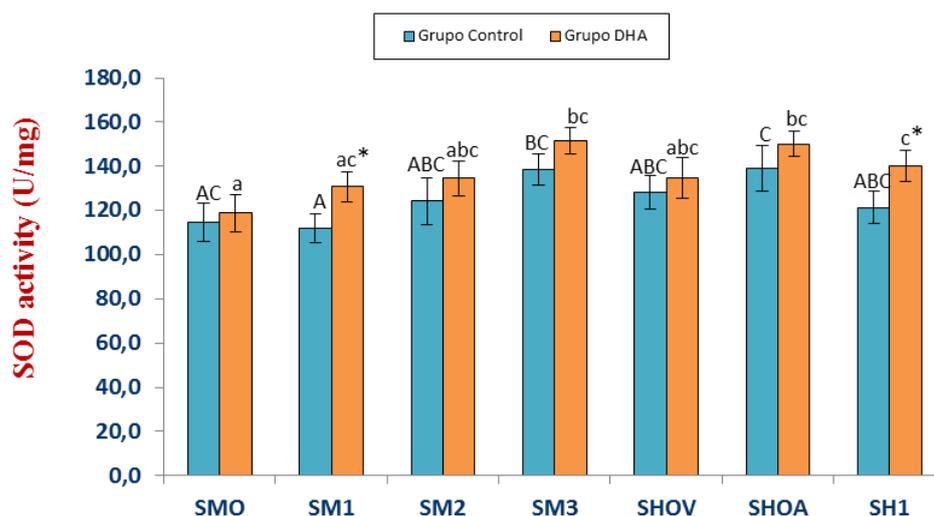


Figura 32: Concentraciones de Superóxido dismutasa (SOD) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 32 muestra las concentraciones de superóxido dismutasa en citosol de eritrocitos en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

La mayor concentración de superóxido dismutasa (SOD) se encuentra en las madres a los 4 meses post-parto en las madres (control: $138,58 \pm 7.04\text{U/mg}$; DHA: $151,55 \pm 5.93\text{U/mg}$) y en los niños en arteria del cordón umbilical (control: $139,06 \pm 10.42\text{U/mg}$; DHA: $150 \pm 5.68\text{U/mg}$). En el grupo control como en el grupo DHA, tanto en madres como en niños se observa una tendencia similar.

Se observan diferencias significativas entre grupos en el parto ($111,76 \pm 6.50\text{U/mg}$ vs. $130,62 \pm 6.78\text{U/mg}$), y a los 2,5 meses de vida del niño ($121,40 \pm 7.07\text{U/mg}$ vs. $140,09 \pm 6.98\text{U/mg}$).

5.3.4.2 Catalasa (CAT)

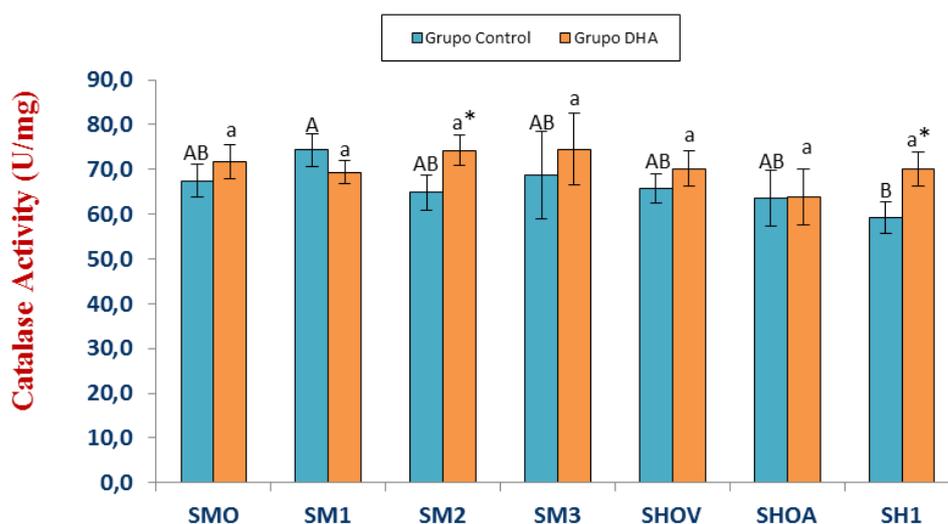


Figura 33: Concentraciones de Catalasa (CAT) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 33 muestra las concentraciones de catalasa en citosol de eritrocitos en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Ambos grupos mostraron valores y tendencias muy similares en las madres, así como en los recién nacidos.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las madres a los 2,5 meses postparto ($64,87 \pm 3,96 \text{U/mg}$ vs. $74,22 \pm 3,43 \text{U/mg}$), así como en los recién nacidos en 2,5 meses después del nacimiento ($59,22 \pm 3,49 \text{U/mg}$ vs. $70,02 \pm 3,71 \text{U/mg}$).

5.3.4.3 Glutathion Peroxidasa (GPx)

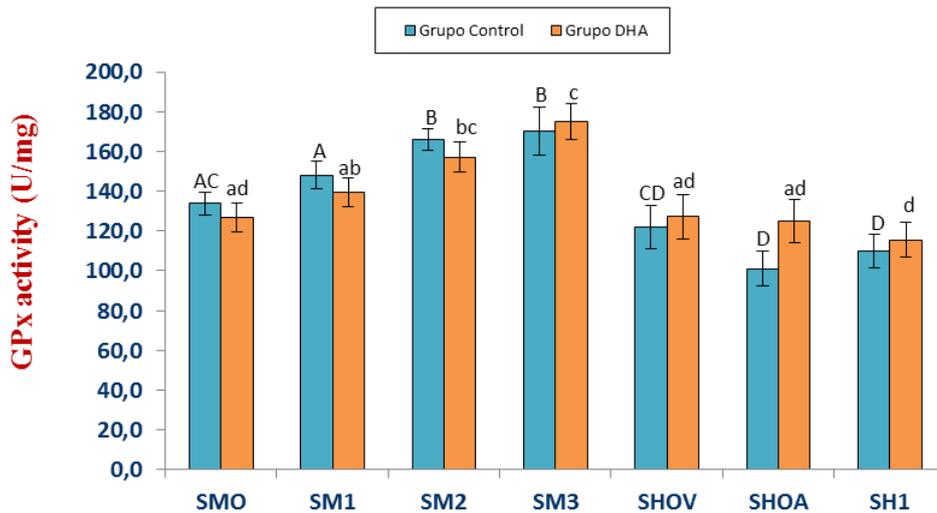


Figura 34: Concentraciones de Glutathion peroxidasa (GPx) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 34 muestra las concentraciones de glutatión peroxidasa en citosol de eritrocitos en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general se observaron mayores concentraciones en las madres en el periodo de postparto, especialmente al cuarto mes posparto. Los recién nacidos muestran menores valores a los observados en las madres, manteniendo estos niveles similares durante el nacimiento y a los 2,5 meses de vida.

En cuanto a las diferencias entre los grupos, no se encontraron diferencias significativas.

5.4 VALORES PLASMÁTICOS DE BIOMARCADORES ÓSEOS

5.4.1 Osteopontina (OPN)

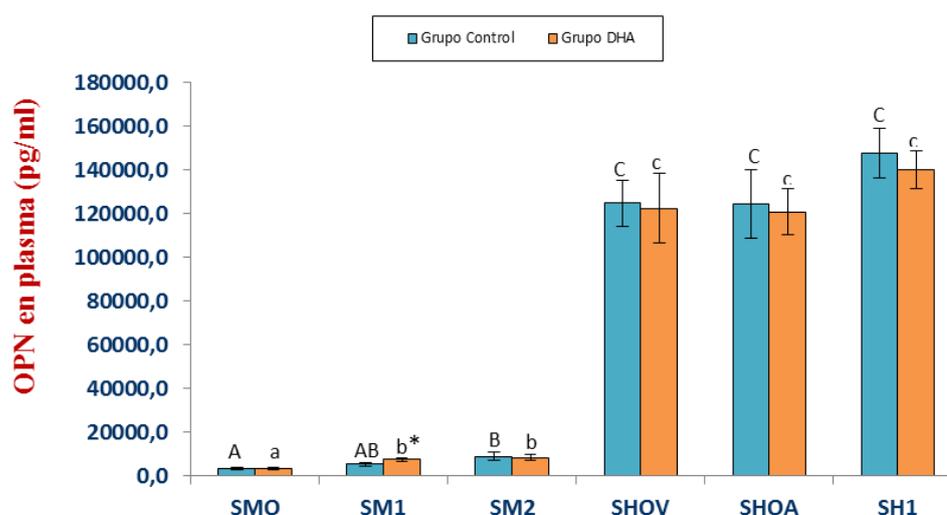


Figura 35: Concentraciones de osteopontina (OPN) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 35 muestra los niveles plasmáticos de osteopontina en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general tanto en el grupo control como en el grupo DHA, se observan valores en la madre (SM0, SM1 y SM2) muy inferiores a los obtenidos en el recién nacido. En el grupo control, se observan menores valores en SM0 con respecto a SM2 (3441,67 \pm 561,42 pg/ml vs 9095,35 \pm 1951,73 pg/ml). Los valores en el recién nacido se mantienen similares, tanto en sangre de cordón umbilical como en el niño a los 2,5 meses de vida, y para ambos grupos.

Se muestran diferencias significativas (control vs. DHA), en la madre durante el parto, con mayores niveles en el caso de las mujeres suplementadas (5469,23 +/- 940,95 pg/ml vs 7590,61 +/- 752 pg/ml).

5.4.2 Paratohormona (PTH)

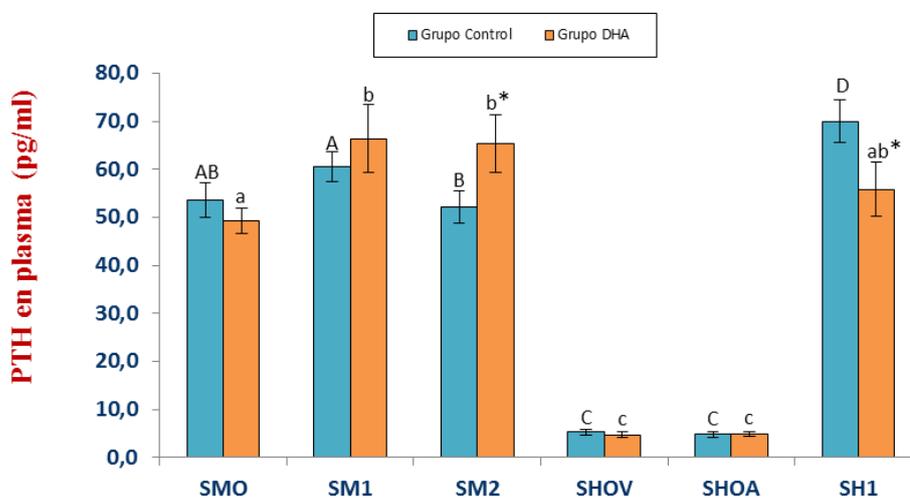


Figura 36: Concentraciones de paratohormona (PTH) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media ± EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 36 muestra los niveles plasmáticos de paratohormona en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En las madres en el grupo control, se observan valores más bajos de PTH en SM2 que en el parto (52,22 +/- 3,34 pg/ml vs 60,52 +/- 3,20 pg/ml), mientras que en el grupo DHA son menores en SM0 con respecto a SM1 y SM2 (49,25 +/- 2,58 pg/ml vs 66,36 +/- 7.08 pg/ml 65,35 +/- 6,03 pg/ml, respectivamente). En el neonato en general y para ambos grupos, los

valores de PTH se encuentran muy disminuidos en cordón umbilical con respecto al resto de las muestras tanto maternas como en el niño a los 2,5 meses de vida (SH1), donde se alcanzan valores similares a los de las madres, además los valores del grupo control superiores a los del grupo DHA.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en SM2 (control vs. DHA), con valores mayores de PTH en las madres suplementadas con DHA con respecto a las no suplementadas (52,22 +/- 3,44 pg/ml vs 65,35 +/- 6,03 pg/ml). Sin embargo, se observan menores valores de PTH en los neonatos del grupo DHA a los 2,5 meses de vida (70.03 +/- 4.46 pg/ml vs. 55.78 +/- 5.67 pg/ml).

5.4.3 Osteocalcina (OC)

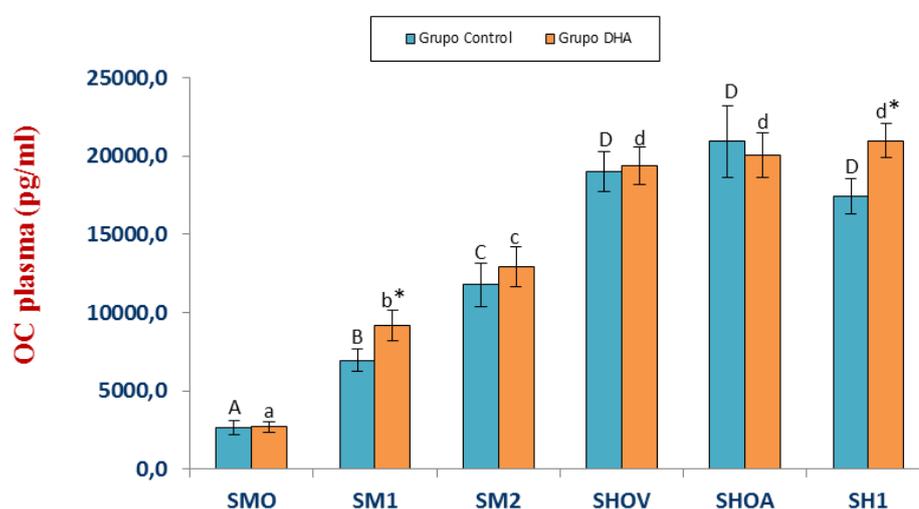


Figura 37: Concentraciones de osteocalcina (OC) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 37 muestra los niveles plasmáticos de osteocalcina en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En ambos grupos la madre durante el embarazo presenta menores valores que los encontrados en el parto y en la lactancia. Además los valores en el parto son menores que los encontrados en la lactancia, donde la madre alcanza los máximos valores; por lo que se observa una tendencia ascendente. En el neonato se observan valores superiores a los de la madre, llegando a duplicar e incluso triplicar estos valores. No se observan diferencias en la evolución, obteniendo así valores similares durante el nacimiento y a los 2,5 meses de vida.

En cuanto a las diferencias entre grupos (control vs.DHA), se muestra un aumento en los valores de osteocalcina en el grupo DHA con respecto al control a los 2, 5 meses de vida del niño, con diferencias significativas (17439,86 +/- 1118,93 pg/ml vs. 20983,85 +/- 1072,50 pg/ml) y también en la madre en la muestra obtenida en el momento del parto (6951,68 +/- 708,05 pg/ml vs. 9149,01 +/- 980,70 pg/ml).

5.4.4 Leptina

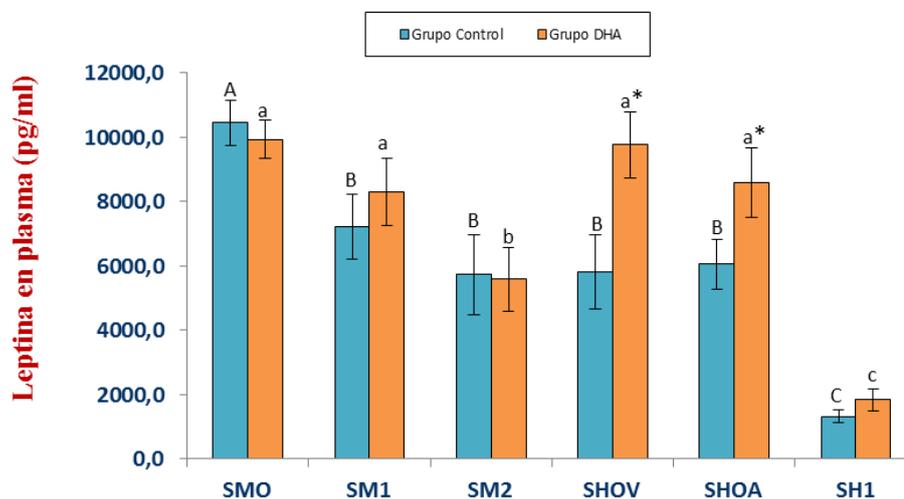


Figura 38: Concentraciones de leptina en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 38 muestra los niveles plasmáticos de leptina en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En las madres el grupo control, se observan mayores valores de leptina en SM0 con respecto a SM1 y SM2 (10435,92 \pm 702,03 pg/ml vs 7210,67 \pm 1007,00 pg/ml y 5725,67 \pm 1241,28 pg/ml, respectivamente). En el grupo intervención, en cambio, los niveles en SM0 y SM1 son mayores que en SM2 (9927,58 \pm 604,72 pg/ml y 8296,79 \pm 1042,12 pg/ml vs 5573,47 \pm 987,96 pg/ml). En cuanto a los recién nacidos, los valores más bajos se muestran en el neonato a los 2,5 meses de vida (control: 1323,65 pg/ml; DHA: 1830,24 pg/ml), con valores hasta cuatro veces menores respecto a los encontrados en cordón umbilical y en comparación con el resto de muestras maternas.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control y DHA en sangre de cordón umbilical, tanto en vena (5807,28 +/- 1137,79 pg/ml vs 9750,95 +/- 1028,71 pg/ml) como arteria (6048,00 +/- 773,59 pg/ml vs 8579,59 +/- 1091,74 pg/ml), aumentando los valores de leptina en los recién nacidos cuyas madres recibieron suplementación.

5.4.5 Insulina

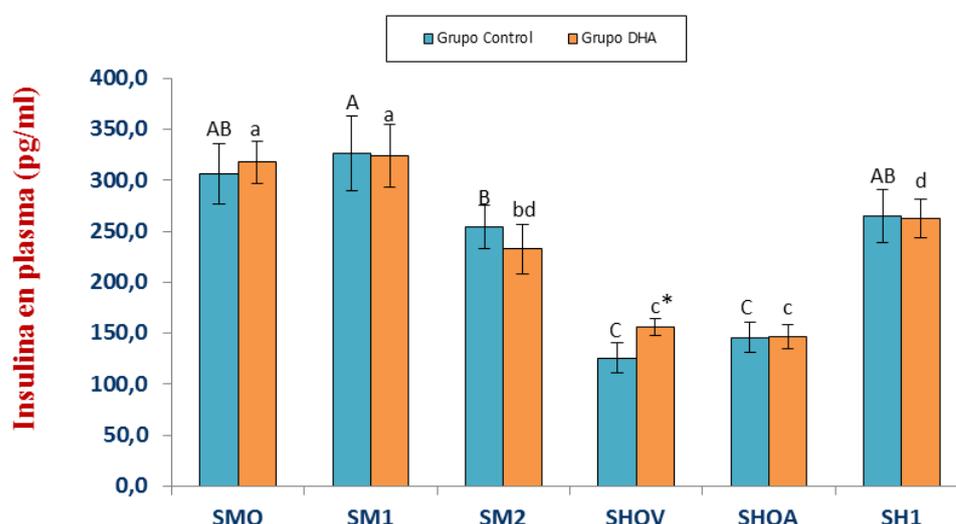


Figura 39: Concentraciones de insulina en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media ± EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 39 muestra los niveles plasmáticos de insulina en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En las madres en general se observan valores similares tanto en el embarazo como en el momento del parto. Por su parte el grupo control muestra menores niveles durante la lactancia (SM2) en comparación con el parto (253,95 +/- 21,21 pg/ml vs 326,55 +/- 36,81 pg/ml). En cambio, en el grupo DHA, SM2 presenta valores más bajos con respecto al parto y también con respecto a los 6 meses de gestación. En cuanto al neonato, en ambos grupos los valores de cordón umbilical son similares en vena y arteria, llegando a representar casi un 50% con respecto a los valores observados en SH1 y en comparación con los valores en las madres.

Se observan diferencias significativas entre grupos en sangre venosa de cordón umbilical, con mayores niveles de insulina en el grupo suplementando con DHA respecto al grupo control. (125,57 +/- 14,76 pg/ml vs 156,36 +/- 8,05 pg/ml).

5.4.6 Adrenocorticotropina (ACTH)

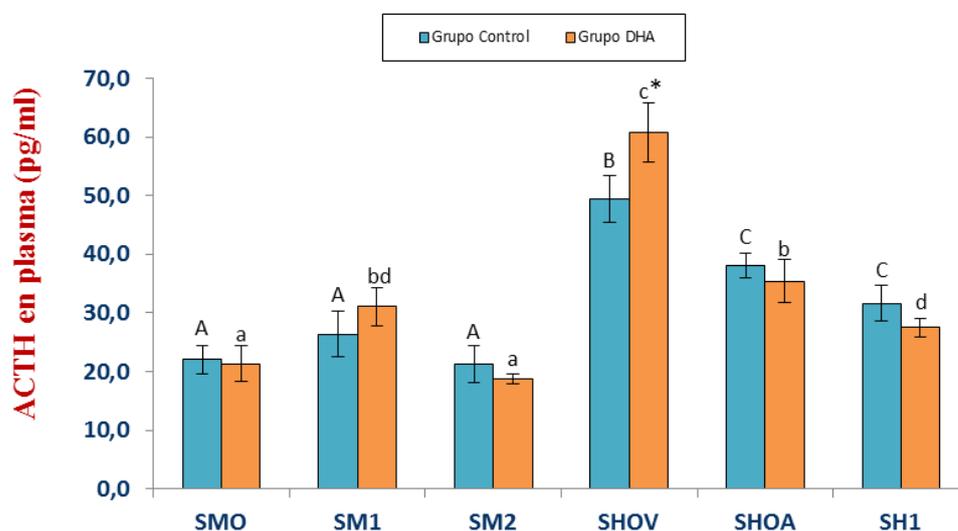


Figura 40: Concentraciones de adrenocorticotropina (ACTH) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 40 muestra los niveles plasmáticos de ACTH en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En madres, en el parto, los valores se ven aumentados ligeramente, aunque sólo muestran diferencias significativas con respecto a SM0 y SM2 en el caso del grupo DHA. En el recién nacido, tanto en el grupo control como en el grupo DHA, se observan valores superiores respecto a los encontrados en madre durante el embarazo y la lactancia, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Los valores máximos de ACTH se encuentran en vena de cordón umbilical. Los valores encontrados en arteria y en el neonato a los 2,5 meses de vida son similares en el grupo control, pero muestran diferencias en el caso del grupo DHA (35,43 +/- 3,61 pg/ml vs 27,50 +/- 1,59 pg/ml).

Al comparar el grupo control con el grupo DHA encontramos mayores niveles de ACTH en vena umbilical en el grupo DHA, con diferencias estadísticamente significativas (49,43 +/- 3,96 pg/ml vs. 60,71 +/- 5.0 pg/ml).

5.4.7 Receptor Activador para el Factor Nuclear-K β (RANK-L)

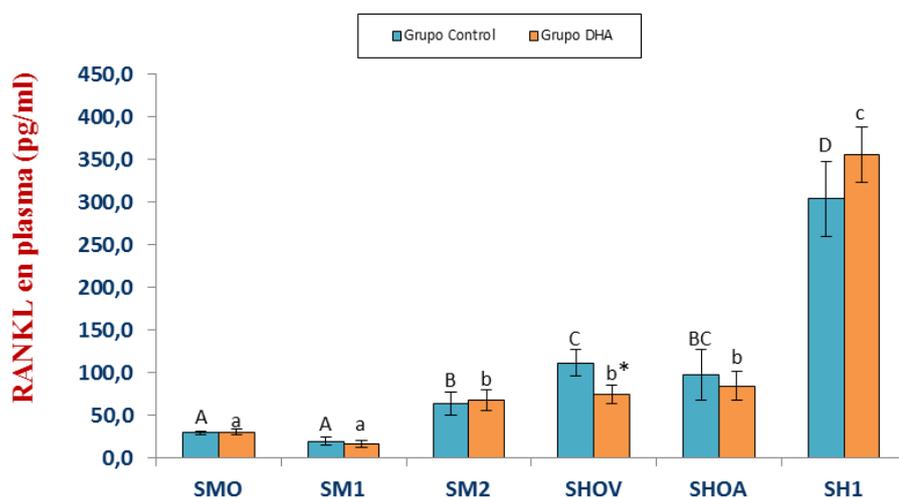


Figura 41: Concentraciones de Ligando del Receptor del activador del factor nuclear kB (RANK-L) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 41 muestra los niveles plasmáticos de RANK-L en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En las madres en general se observan valores similares en el embarazo y durante el parto, se observan diferencias significativas entre las muestras de la madre en el postparto (SM2) con respecto a las muestras tomadas durante el embarazo y el parto. En general, tanto en las madres como en los niños y para ambos grupos, el máximo valor para este biomarcador óseo se encuentra en el recién nacido a los 2,5 meses de vida (control: 303,64 \pm 43,58 pg/ml; DHA: 355,46 \pm 32,79), con diferencias estadísticamente significativas, con respecto al resto

de tomas. Los valores de arteria y vena de cordón umbilical son similares a los encontrados en la madre durante la lactancia y superiores a los encontrados durante el embarazo y el parto.

Se observan diferencias significativas entre grupos (control vs.DHA) en vena del cordón umbilical, observándose una disminución del RANK-L en el grupo DHA (111,56 +/- 15,80 pg/ml vs 75,02 +/- 10,76 pg/ml).

5.4.8 Osteoprotegerina (OPG)

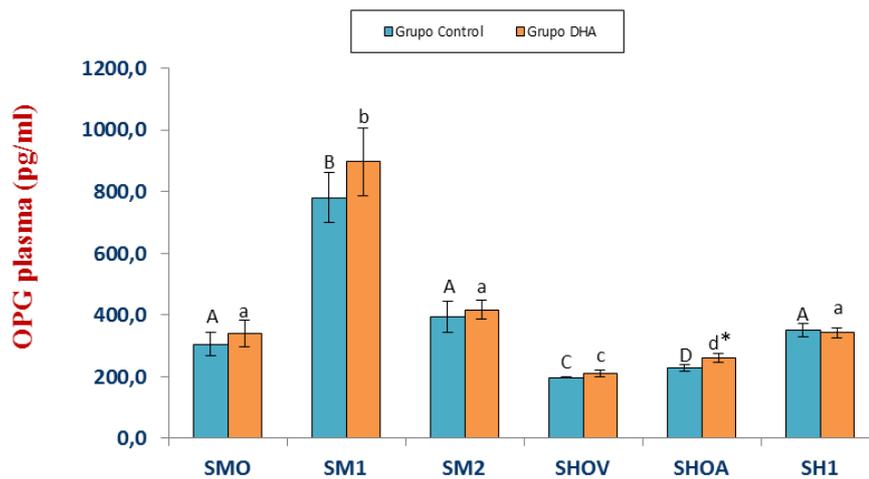


Figura 42: Concentraciones de Osteoprotegerina (OPG) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHO,A y SH1). Los resultados se expresan como Media ± EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 42 muestra los niveles plasmáticos de osteoprotegerina en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En las madres durante el parto (SM1) se encuentran los valores máximos de OPG en ambos grupos (control y DHA), llegando a representar el 200% con respecto al resto de muestras tanto maternas como del niño. Los valores maternos durante el embarazo y a los 2,5 meses postparto son menores que los encontrados en el momento del parto, aunque mayores que los encontrados en las muestras del neonato al nacimiento, tanto en arteria como vena umbilical, con diferencias estadísticamente significativas. En cuanto al recién nacido, los niveles en SH1 son mayores que los encontrados en sangre de cordón umbilical en el parto y menores que las encontradas en la madre en el momento del parto, con diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a las diferencias entre grupos, se observan diferencias estadísticamente significativas en las muestras de arteria de cordón umbilical, donde el grupo DHA presenta mayores valores con respecto al grupo control (227,76 +/- 9,41 pg/ml vs. 260,26 +/- 13,36 pg/ml).

5.4.9 Interleukina-6 (IL-6)

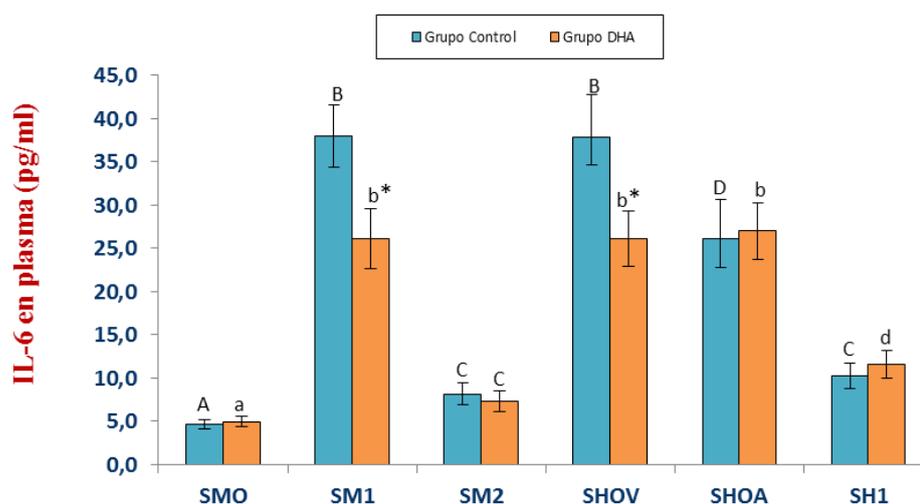


figura 43: Concentraciones de Interleukina-6 (IL-6) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 43 muestra los niveles plasmáticos de interleukina-6 en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general y para ambos grupos, los menores valores de IL-6 se encuentran en las madres durante el embarazo (control: 4,72 +/- 0.51 pg/ml; DHA: 4,99 +/- 0.56 pg/ml). Estos valores aumentan de manera considerable, llegando a ser casi hasta diez veces superiores (en el caso del control) y cinco veces superiores en el caso del grupo DHA, en el momento del parto. A los 2,5 meses postparto, los valores descienden bruscamente, aunque los niveles alcanzados son superiores a los del embarazo. En neonatos los mayores niveles se alcanzan en vena de cordón, concretamente el caso del grupo control (37,27 +/- 4.97 pg/ml). Estos valores se mantienen similares en el caso del grupo DHA, aunque descienden en el grupo control en muestras de arteria de cordón umbilical. Los mínimos valores se encuentran a los 2,5 de vida del neonato, llegando a representar valores menores del 50% en comparación con los observados en muestras de cordón.

Se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (control vs. DHA), en madres en el momento del parto (37,89 +/- 3.68 pg/ml vs 26,11 +/- 3.49 pg/ml) y en muestras de vena de cordón umbilical (37,27 +/- 4.97 pg/ml vs 26,09 +/- 3.24 pg/ml).

5.4.10 Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

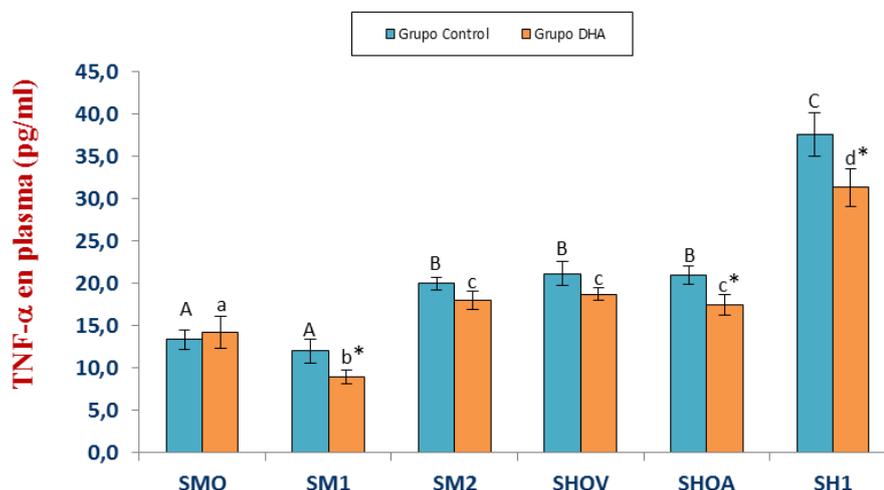


Figura 44: Concentraciones de Factor de Necrosis Tumoral - α (TNF- α) en plasma materno (SM0, SM1 y SM2) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 44 muestra los niveles plasmáticos de Factor de Necrosis Tumoral - α en la madre: gestación, parto y postparto (2,5 meses) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general los menores valores de TNF- α se encuentran en madres en el momento del embarazo y el parto, observándose además un descenso significativo en el momento del parto para el caso del grupo DHA. Estos valores aumentan casi en un 200% en el postparto (SM2). En cuanto al neonato, los valores de arteria y vena de cordón umbilical son similares a los encontrados en la madre durante la lactancia y superiores a los encontrados durante el embarazo y el parto. En general, tanto en las madres como en los niños y para ambos grupos, el máximo valor para este marcador óseo se encuentra en el recién nacido a los 2,5 meses de vida (control: 37,70 \pm 2.60pg/ml; DHA: 31,30 \pm 2.23pg/ml), mostrando diferencias significativas con respecto al resto de tomas.

Se observan diferencias significativas entre grupos (control vs. DHA), donde el grupo DHA muestra menores valores, en madres en el parto (12,02 +/- 1.39 pg/ml vs 8,90 +/- 0.80 pg/ml) y en recién nacido en arteria de cordón umbilical (21,02 +/- 1.07 pg/ml vs 17,45 +/- 1.19 pg/ml) y a los 2,5 meses de vida (37,60 +/- 2.60 pg/ml vs 31,30 +/- 2.23 pg/ml).

5.5 CONTENIDO MINERAL EN CITOSOL DE ERITROCITO

5.5.1 Calcio (Ca)

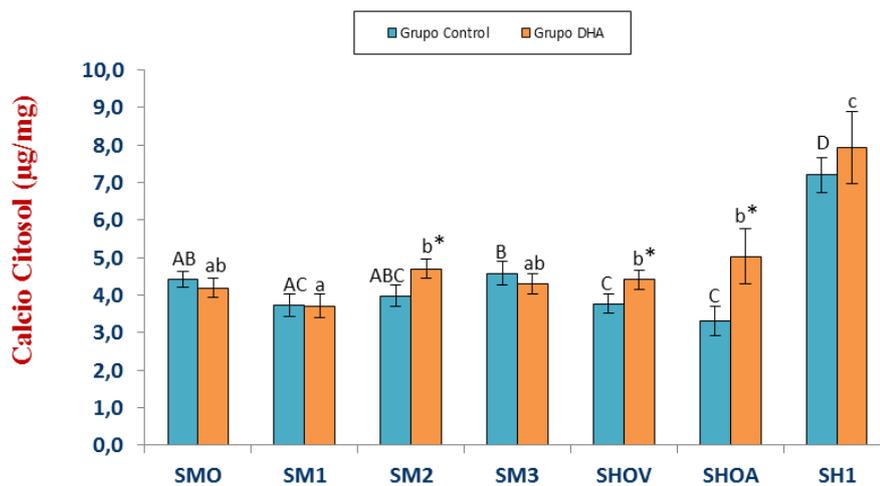


Figura 45: Concentraciones de calcio (Ca) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHO,V, SHO,A y SH1). Los resultados se expresan como Media ± EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 45 muestra las concentraciones de calcio en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general, tanto en las madres como en los niños y para ambos grupos, el máximo nivel se encuentra en los recién nacidos a los 2,5 meses de vida (control: $7,20 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{mg}$; DHA: $7,93 \pm 0,96 \mu\text{g}/\text{mg}$), mostrando diferencias significativas con respecto al resto de tomas. En el grupo control, los valores encontrados en la madre son ligeramente superiores a los encontrados en muestras de cordón umbilical. En cuanto al grupo DHA, se observaron valores ligeramente superiores en muestras tanto de cordón como en madres a los 2,5 meses postparto, respecto al momento del embarazo y los 4 meses postparto; los mínimos valores se presentan en el parto ($3,71 \pm 0,31 \mu\text{g}/\text{mg}$)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el grupo DHA en las madres a 2,5 meses después del parto ($3,97 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $4,70 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{mg}$), así como, en la vena del cordón umbilical del recién valores ($3,77 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $4,41 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$) y arteriales ($3,31 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $5,03 \pm 0,73 \mu\text{g}/\text{mg}$).

5.5.2 Fósforo (P)

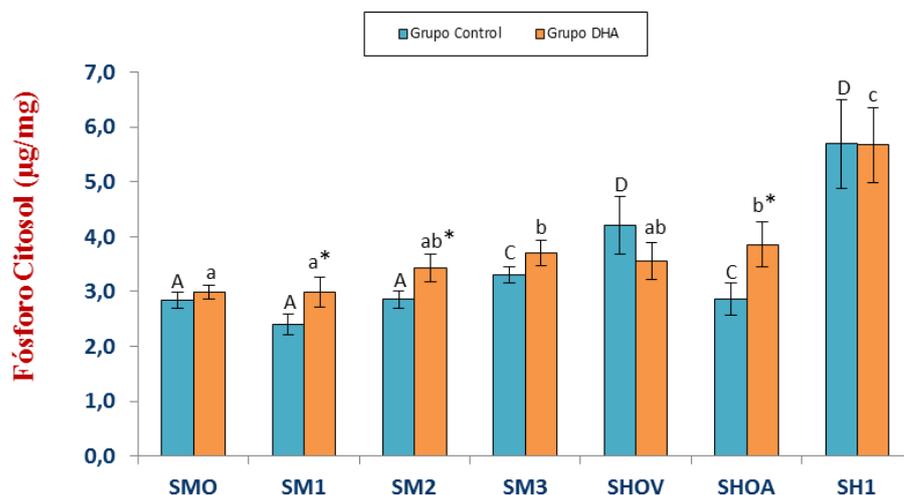


Figura 46: Concentraciones de fósforo (P) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 46 muestra las concentraciones de fosforo en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En general, tanto en las madres como en los niños y para ambos grupos, el máximo nivel se encuentra en los recién nacidos a los 2,5 meses de vida (control: $5,69 \pm 0.81 \mu\text{g}/\text{mg}$; DHA: $5,67 \pm 0.68 \mu\text{g}/\text{mg}$), mostrando diferencias significativas con respecto al resto de tomas. En el grupo control encontramos los valores más bajos durante el embarazo, el parto y a los 2,5 meses postparto, mientras que estos valores aumentan en madres a los 4 meses tras el parto y en arteria de cordón umbilical, donde se observa una diferencia significativa respecto a los valores de vena umbilical, los cuales son superiores. En el grupo DHA se observa una tendencia parecida, pero en este caso los valores más bajos se encontraron durante embarazo y el parto, siendo ligeramente superiores en el caso de las muestras obtenidas a los 2,5 meses postparto y vena de cordón umbilical, y mostrando diferencia significativa respecto a las obtenidas a los 4 meses postparto y arteria umbilical, donde se obtuvieron niveles superiores.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las madres durante el parto ($2,40 \pm 0.19 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $3,00 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{mg}$) y a los 2, 5 meses tras el parto ($2,86 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $3,43 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{mg}$), así como en el recién nacido en muestras de arteria umbilical ($2,86 \pm 0.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $3,86 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{mg}$).

5.5.3 Magnesio (Mg)

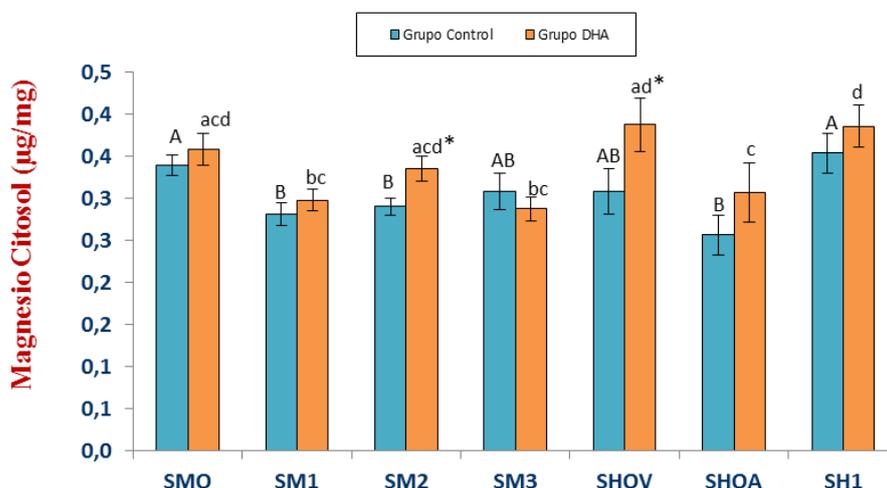


Figura 47: Concentraciones de magnesio (Mg) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHO, V, SHO, A y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 47 muestra las concentraciones de magnesio en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

En el grupo control se observan los menores niveles en el momento del parto y a los 2,5 meses postparto en el caso de las madres y en arteria umbilical en caso del recién nacido. Los valores aumentan ligeramente a los 4 meses postparto y en vena de cordón umbilical, y muestran los máximos valores durante el embarazo y a los 2,5 meses de vida del neonato. Con respecto al grupo DHA, los menores valores se observan en el parto y a los cuatro meses postparto, pero muestran diferencia significativa respecto a los valores hallados en arteria umbilical, donde los valores son ligeramente superiores. La concentración de Ca se ve

aumentada en el embarazo y a los 2,5 meses postparto, llegando a su máximo en el caso de las muestras de vena umbilical y a los 2,5 meses de vida del neonato.

Se muestran diferencias significativas entre ambos grupos (control vs. grupo DHA), en las madres a los 2,5 meses postparto (0,29 +/- 0.01 µg/mg vs 0,33 +/- 0.02 µg/mg), así como en vena de cordón umbilical (0,31 +/- 0.03 µg/mg vs 0,39 +/- 0.03 µg/mg).

5.5.4 Hierro (Fe)

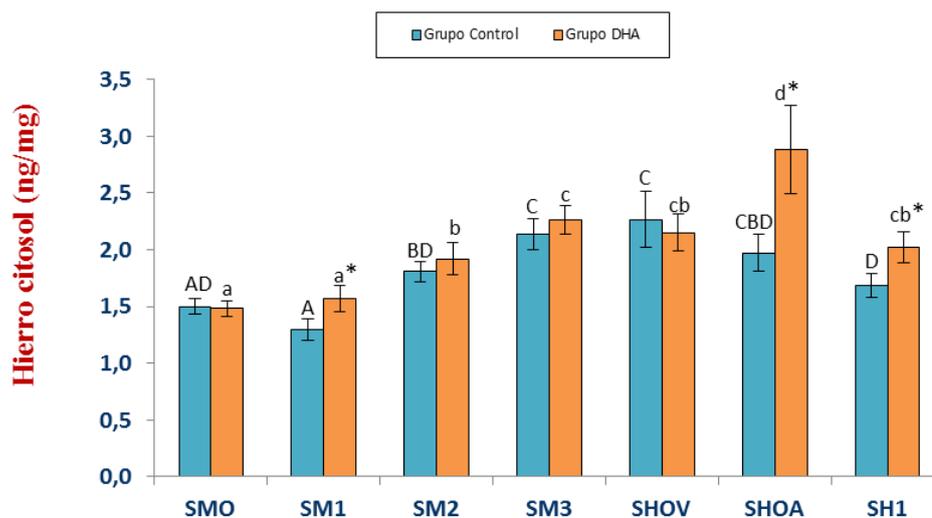


Figura 48: Concentraciones de hierro (Fe) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media ± EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 48 muestra las concentraciones de hierro en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Tanto en las madres como en los niños y para ambos grupos se observa la misma tendencia. Los valores más bajos los encontramos en las madres durante el embarazo y el parto. Estos valores aumentan en el postparto, especialmente al 4º mes postparto donde alcanzan valores muy similares a los encontrados en vena de cordón umbilical (control: 2,27 +/- 0.25 ng/mg; DHA: 2,15 +/- 0.16 ng/mg). En el caso de las muestras de arteria umbilical los grupos tienen diferentes tendencias, mientras los valores del grupo control descienden (respecto a los encontrados en SHOV), en el grupo DHA la concentración de Mg alcanza su máximo (SHOA: 2,88 +/- 0.39 ng/mg). A los 2,5 meses de vida del neonato, los valores vuelven a descender en ambos grupos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (control vs complementado) en las madres durante el parto (1,30 +/- 0.09 ng/mg vs 1,57 +/- 0.11 ng/mg) y sobre todo en la arteria del cordón umbilical (1,97 +/- 0.16 ng/mg vs 2,88 +/- 0.39 ng/mg), sino también en el recién nacido a 2,5 meses de vida (1,69 +/- 0.11 ng/mg vs 2,02 +/- 0.14 ng/mg).

5.5.5 Cobre (Cu)

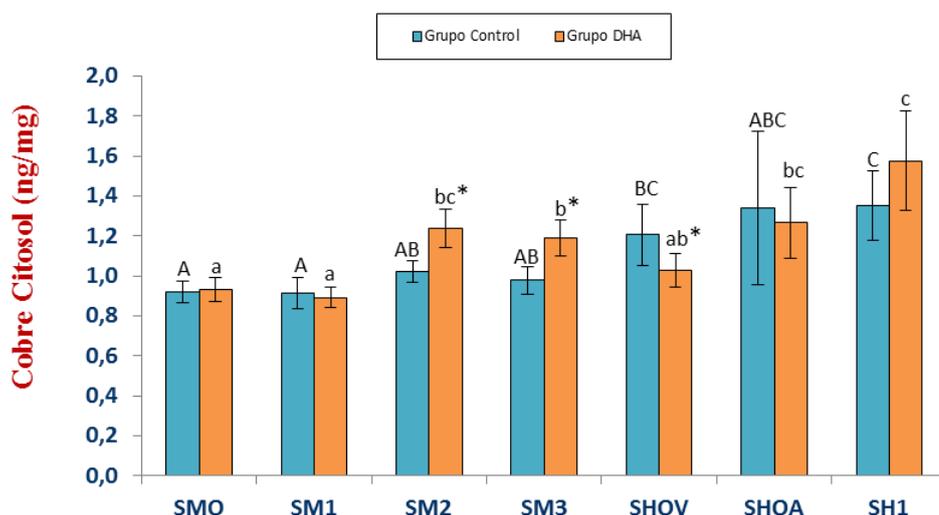


Figura 49: Concentraciones de cobre (Cu) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 49 muestra las concentraciones de cobre en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Para ambos grupos, el máximo nivel se encuentra en los recién nacidos a los 2,5 meses de vida (control: 1.35 \pm 0.17 ng/mg; DHA: 1.58 \pm 0.28 ng/mg). En el grupo control, se ve un aumento progresivo, donde los menores valores se encuentran en el embarazo y el momento del parto y aumentan en el periodo de postparto; en muestras de cordón umbilical, aunque en arteria se observan mayores concentraciones, los valores son similares a los encontrados en madres. En el grupo DHA observamos el mismo patrón descrito para el grupo control.

Se muestran diferencias significativas entre ambos grupos (control vs. grupo DHA), en las madres a los 2,5 meses postparto (1.02 ± 0.06 ng/mg vs 1.24 ± 0.10 ng/mg), así como en vena de cordón umbilical (1.21 ± 0.15 ng/mg vs 1.03 ± 0.08 ng/mg).

5.5.6 Cinc (Zn)

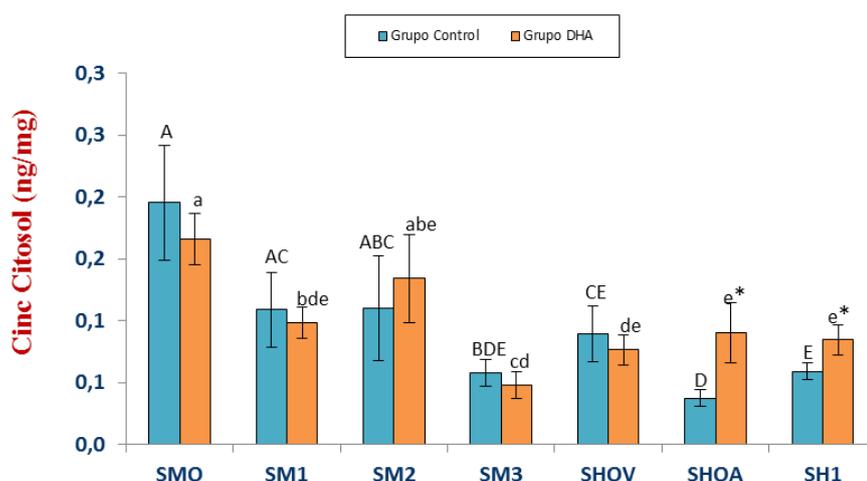


Figura 50: Concentraciones de cinc (Zn) en citosol de eritrocito materno (SM0, SM1, SM2 y SM3) y del recién nacido (SHOV, SHOA y SH1). Los resultados se expresan como Media \pm EEM. La aparición de letras no coincidentes en cada grupo indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Grupo Control: A, B, C, D, E, F, G; Grupo DHA: a, b, c, d, e, f, g). * muestra la existencia de diferencias significativas entre grupos en cada toma de muestra.

La figura 50 muestra las concentraciones de cinc en citosol en la madre: gestación, parto y postparto (a los 2,5 meses y al 4º mes del periodo de lactancia) y en el recién nacido: cordón umbilical (vena y arteria) y a los 2,5 meses de vida postnatal.

Para ambos grupos se observa la misma tendencia, donde se observan los mayores valores en el embarazo (control: $0,20 \pm 0,05$ ng/mg; DHA: $0,17 \pm 0,02$ ng/mg), mostrando diferencias significativas respecto al resto de tomas. Estos valores disminuyen en el parto y a los 2,5 meses postparto. A los 4 meses postparto es cuando el grupo DHA alcanza sus

mínimos valores (SM3: 0,05 +/- 0.01 ng/mg). En el grupo control sin embargo encontramos valores significativamente más bajos en (con respecto al 4º mes postparto) en muestras de arteria umbilical (SHOA: 0,04 +/- 0.01 ng/mg). Valores que se ven aumentados significativamente en SH0V y a los 2,5 meses de vida del neonato tanto en el grupo control como en el grupo DHA.

Con respecto a las diferencias entre el control y el grupo DHA, se observaron diferencias significativas en recién nacidos en muestras de arteria del cordón umbilical (0,04 +/- 0.01 ng/mg vs 0,09 +/- 0.02 ng/mg) y a los 2,5 meses de vida (0,06 +/- 0.01 ng/mg vs 0,08 +/- 0.01 ng/mg).

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la suplementación materna con un producto lácteo enriquecido con aceite de pescado (aproximadamente 320 mg de DHA + 80 mg EPA /día) durante el último trimestre de gestación y el periodo de lactancia, sobre la capacidad antioxidante y diversos parámetros del remodelado óseo así como el contenido mineral, tanto en el recién nacido a término como en la madre. El estudio se ha realizado con 110 mujeres embarazadas que han sido captadas en los servicios de Ginecología de dos hospitales: Hospital Materno-Infantil Virgen de las Nieves de Granada y el Hospital Universitario Materno-Infantil de las Islas Canarias.

La mayoría de los estudios sobre suplementación con DHA en madres y recién nacidos se han centrado en el desarrollo neuronal y visual del recién nacido. Sin embargo, existen aspectos relacionados con el parto y el desarrollo del recién nacido en los cuales la suplementación con DHA podría tener un efecto importante al tratarse de las primeras etapas del desarrollo del recién nacido, pero que no han sido estudiados hasta el momento. Entre estos nos encontramos el metabolismo óseo y el estrés oxidativo, siendo este último un importante componente de múltiples patologías en el ser humano.

Como se ha comentado anteriormente, durante la gestación se produce un aumento de la tasa metabólica, incrementado requerimiento de oxígeno y por tanto de la actividad mitocondrial, lo que lleva a un incremento en producción de radicales libres. (Ochoa et al. 2003 and 2007; Díaz-Castro et al., 2015). El estrés oxidativo se manifiesta en la interfase materno-fetal desde las primeras etapas del embarazo, debido al papel que desempeña en el correcto desarrollo de la placenta, así como en la fisiopatología relacionada con complicaciones tales como abortos, preeclampsia, crecimiento intrauterino restrictivo y prematura ruptura de membranas (Burton & Jauniaux 2011).

El parto además implica un fuerte estrés oxidativo tanto para el recién nacido como para la madre. En el momento del parto, los recién nacidos son especialmente susceptibles al estrés ya que implica el paso de un ambiente hipóxico/anaerobio (en el útero) a un ambiente mucho más saturado en oxígeno, lo cual puede disminuir la eficiencia de los sistemas antioxidantes (Saugstad 2005). Además, el nuevo ambiente extrauterino puede generar factores relacionados con una producción excesiva de ROS, llevando a un desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes en el recién nacido (Bernardi et al. 2012; Mutinati et al. 2014).

Durante el parto en la madre se liberan prostaglandinas y tromboxanos, lo cual induce peroxidación lipídica. El dolor y el estrés sufridos en el parto aumentan la producción de malondialdehído (MDA) y proteínas carboniladas, estos productos se transfieren al feto a través de la placenta (Gitto et al. 2009). En el momento del parto también ocurren de forma periódica periodos de isquemia-reperusión que se dan al compás de las contracciones uterinas, provocando la formación de xantinas y de radicales libres (Graham et al. 2011).

Resulta interesante el efecto del DHA en el campo de la agresión oxidativa. Diversos estudios muestran una protección antioxidante del DHA, sin embargo, no podemos olvidar que se trata de un ácido graso altamente poliinsaturado y por lo tanto susceptible a la agresión oxidativa. Por esta razón, en este campo existe controversia, dado que ciertos estudios muestran una menor agresión oxidativa (Mas et al. 2010)(García-Rodríguez et al. 2012), mientras que otros muestran lo contrario, un aumento en el daño oxidativo tras la suplementación con DHA (Shoji et al. 2009; Boulis et al. 2014).

Esta relación entre DHA y estrés oxidativo es de gran importancia sobre todo el campo de la suplementación con DHA, dado que habría que sopesar los efectos beneficiosos de esta suplementación con los posibles o potenciales riesgos, entre los que se podría encontrar precisamente una mayor agresión oxidativa.

Pese a su importancia, los estudios existentes en relación al efecto del DHA en el estrés oxidativo durante el embarazo, parto y lactancia en la madre, como en el neonato, son escasos. Por lo que nuestros resultados resultarán de gran ayuda para posteriores investigaciones.

En relación a los resultados obtenidos en nuestro estudio con respecto a los indicadores de daño oxidativo en plasma, se observan mayores valores de peróxidos en las madres durante el embarazo así como en el momento del parto, siendo estos resultados semejantes a los mostrados por Kankofer et al. (2001) que mostraban un mayor contenido en peróxidos en las madres durante el embarazo. Aunque en menores concentraciones, los peróxidos también aumentan en el neonato a los 2,5 meses de vida, alcanzando valores semejantes a los encontrados en las madres durante el periodo de lactación.

En las membranas eritocitarias, se observan las mayores concentraciones de peróxidos en el embarazo, tal y como se observa en muestras de plasma, pero además también se muestran niveles elevados durante el periodo de postparto/lactancia en la madre, así como a los 2,5 meses de vida del recién nacido. Wachter et al. (1999) observaron una disminución de la actividad antioxidante a medida que avanzaba la lactancia en la madre, lo que probablemente podría estar relacionado con el agotamiento de los antioxidantes solubles en la grasa de la leche, y podría llevar a un aumento del estrés oxidativo.

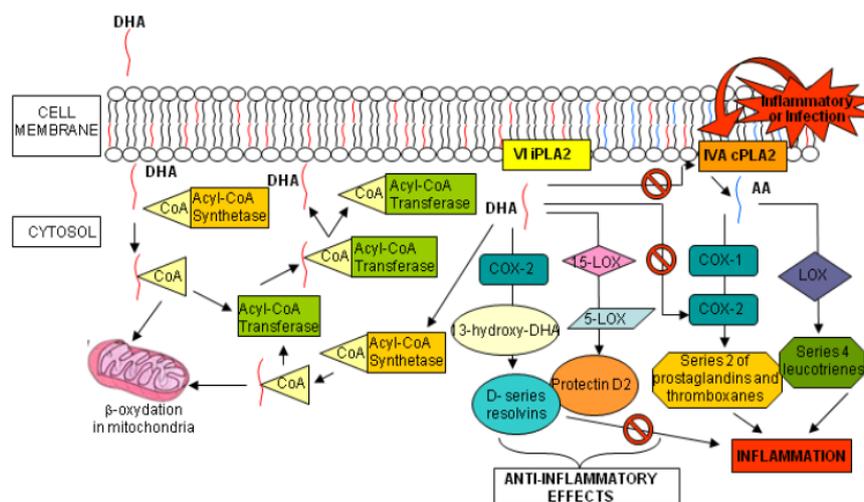
En plasma la suplementación con DHA muestra un claro efecto sobre los niveles de peróxidos en el recién nacido, disminuyéndolos de manera significativa tanto en arteria de cordón umbilical como a los 2.5 meses de vida. De la misma manera, el efecto de la suplementación se observó en madres a los 2,5 meses postparto, donde los niveles de peróxido se redujeron significativamente. En el caso de las membranas de eritrocito el DHA muestra un efecto en las madres, en el momento del parto y a los cuatro meses postparto, donde también actúa disminuyendo significativamente los niveles de peróxidos.

Otros estudios han mostrado un efecto del DHA sobre el estrés oxidativo, aunque en campos de investigación diferentes. Esta disminución en el contenido en peróxidos tanto en plasma como en membranas eritocitarias tras la suplementación con DHA, puede ser debida al efecto de este ácido graso sobre algunos de los factores productores de radicales libres y/o al efecto que ejerce sobre el sistema antioxidante tanto de la madre como del recién nacido.

Como ya se ha comentado uno de los posibles mecanismos de protección de los ácidos grasos omega-3 AGPI-CL al estrés oxidativo subyace en los mecanismos de generación de

radicales libres, incluyendo la señalización inflamatoria. El DHA tiene un efecto anti-inflamatorio que parece estar correlacionado con su acción inhibitoria sobre el ácido araquidónico (Pietrantonni et al. 2014). El ácido araquidónico es liberado a través de una fosfolipasa A2 citosólica Ca^{2+} dependiente (IVA cPLA2), sin embargo, este mecanismo también implica su conversión a eicosanoides, generando así radicales libres (Vericel et al. 2015). En este sentido, el posible efecto antioxidante de DHA podría atribuirse a su acción inhibitoria sobre el ácido araquidónico y la producción de eicosanoides, y a las propiedades anti-inflamatorias y protectoras de las protectinas y las resolvinas (Cai et al. 2013; Pietrantonni et al. 2014) (Figura 51). En este sentido, González-Pérez et al. (2006) demostraron que el DHA evita daños en el ADN, así como el estrés oxidativo en células hepáticas, efecto que se asoció con una disminución en la síntesis hepática de eicosanoides derivados de los omega-6, así como un aumento de la formación de mediadores lipídicos derivados del DHA.

Figura51: Metabolismo del DHA. Interacciones de las cascadas metabólicas en el DHA y el ácido araquidónico (AA).



Pietrantonni et al., 2014. International Journal of Molecular Sciences.

En un estudio reciente realizado por Zgorzynska et al. 2015, se ha demostrado que la incubación de fibroblastos gingivales humanos (HGF) con DHA redujo notablemente el número de células muertas (necrosadas), debido a tanto la apoptosis como al aumento

permeabilidad de la membrana inducida por los compuestos citotóxicos. Según varios estudios realizados, el DHA aumenta el potencial redox en la célula, en parte mediante la restauración del potencial de la membrana mitocondrial, lo cual contribuye a una eliminación más eficiente de ROS (Zgorzynska et al. 2015).

Un posible mecanismo descrito según estudios realizados ha demostrado que el contenido de cardiolipina mitocondrial aumenta con el DHA, modificando así la fluidez de la membrana mitocondrial. El DHA secuestra el citocromo C, inhibiendo así la formación de poros en la membrana, ayudando así a mantener la viabilidad y supervivencia celular (Raza Shaikh & Brown 2013; Zgorzynska et al. 2015). Es de sobra conocido que la eficiencia del flujo de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial depende directamente del estado de reducción de los transportadores de electrones de la cadena. La succinato deshidrogenasa anclada a la membrana mitocondrial interna es responsable del envío de electrones al complejo III, así como del control de la concentración de ubiquinona para asegurar la presencia de complejos reducidos en la cadena. El estudio realizado por Zgorzynska et al. 2015, muestra que el aumento en la mitocondria de la actividad succinato:ubiquinol reductasa se da gracias al DHA, contribuyendo así a aumentar la eliminación de ROS (Starkov & Fiskum 2003; Zgorzynska et al. 2015).

En referencia a la capacidad antioxidativa total en plasma, los resultados obtenidos muestran los valores de antioxidantes más altos en las madres durante el embarazo y la lactancia (2,5 y 4 mes postparto), mientras que estos niveles disminuyen durante el parto. En ambos grupos, la capacidad antioxidante es casi el doble en las madres en comparación con los recién nacidos.

Las principales diferencias entre el grupo control y el DHA se encontraron en las madres en momento del parto, así como en el recién nacido a los 2,5 meses de vida. La menor capacidad antioxidante se encuentran en las madres suplementadas en el momento del parto, que junto con un nivel bajo de los peróxidos, especialmente en membrana eritrocitaria, podría indicar una menor necesidad de defensa antioxidante en el grupo DHA, debido probablemente a una menor producción de radicales libres (Yavin 2006; Shoji et al. 2009; Vericel et al. 2015). En este sentido, también se podría considerar una mayor transferencia de antioxidantes al

recién nacido, explicando así el bajo contenido de hidroperóxidos en plasma que se encuentra en muestras arteria del cordón umbilical en el grupo DHA.

Los recién nacidos son particularmente susceptibles al estrés oxidativo debido a los cambios en la presión de oxígeno y el inicio de una respiración regular, lo cual puede disminuir la eficiencia de los sistemas antioxidantes (Saugstad 2005). Nuestros resultados muestran que la suplementación con ácidos grasos omega-3 evita la disminución de la capacidad antioxidante a los 2,5 meses de vida en los recién nacidos. Además la suplementación también reduce los niveles de peróxido en el plasma en comparación con el grupo control. Esta mayor concentración de antioxidantes en el recién nacido se puede deber, al menos en parte, a un mayor aporte de antioxidantes por parte de la madre, en concreto a través de la leche materna. En este sentido, tanto el calostro como la leche materna proporcionan al recién nacido protección antioxidante frente al exceso de ROS (Albera & Kankofer 2009; Lipko-Przybylska & Kankofer 2012).

En cuanto a los niveles de antioxidantes liposolubles en el plasma y membrana de eritrocito, en las madres no encontramos diferencias significativas entre el control y el grupo DHA con respecto al último trimestre del embarazo; estos resultados concuerdan con los hallados en un estudio realizado con madres que fueron suplementadas dos porciones de salmón por semana durante el embarazo (García-Rodríguez et al. 2012), donde tampoco observaron diferencias significativas con respecto al α -tocoferol, β -caroteno y la CoQ10 en el grupo DHA en comparación con el control. Sin embargo, los niveles de retinol en plasma difieren de los que encontramos en nuestro estudio, ya que en el estudio observaron concentraciones significativamente más altas de retinol en las madres suplementadas con salmón, lo que podría estar relacionado según los autores con la alta concentración de retinol presente en el propio salmón. En nuestros resultados, observamos diferencias significativas en las muestras de plasma y de membrana de eritrocito a los 2,5 meses posparto, así como en la arteria del cordón umbilical, lo cual sugiere que la suplementación con DHA tiene efectos beneficiosos en el recién nacido, dado que mejora la capacidad antioxidante en el recién nacido reduciendo el estrés oxidativo.

Tras el parto, a los 2,5 meses postparto se observó un aumento de α -tocoferol, retinol y CoQ9 en plasma de madres suplementadas, así como un aumento de β -caroteno y CoQ10 a los 4 meses postparto. En membrana de eritrocitos, los valores más altos de CoQ10 se encontraron en el momento del parto y los niveles de α -tocoferol más elevados los encontramos a los 2,5 meses postparto. Estos datos sugieren una alta defensa de antioxidantes liposolubles en el grupo de madres suplementadas, especialmente a los 4 meses postparto. Resulta interesante el resultado hallado en α -tocoferol en el plasma a los 2,5 meses después del parto. Schweigert et al. (2004) realizaron un estudio con madres durante la lactancia sin suplementación, donde encontraron una disminución significativa en los niveles de α -tocoferol en plasma a las 3 semanas después del parto, lo cual concuerda con nuestros resultados, aunque en nuestro caso en el grupo DHA no se ha observado esta disminución. Esto concuerda con la hipótesis de que, en la mayoría de las especies de mamíferos, muchos componentes lipofílicos (excepto los triglicéridos) son transferidos desde el plasma a la leche materna; aunque el mecanismo de transferencia aún no se conoce, esta transferencia probablemente es diferente durante colostrogenesis y el resto del periodo de lactancia (Schweigert et al. 2004). Lo cual hace pensar que la madre cede estos antioxidantes al niño a través de la leche.

Con respecto a los recién nacidos, en general se observó un mayor contenido en retinol, α -tocoferol y CoQ10 (tanto en el plasma como en membrana de los eritrocitos) en las muestras obtenidas de cordón umbilical del grupo DHA. Lo cual indica una vez más, una defensa antioxidante más alta en el momento del nacimiento, justamente el momento en que se da la máxima agresión de estrés oxidativo (Saugstad 2005; Ochoa et al. 2007). Del mismo modo, a los 2,5 meses de vida postnatal se observa un mayor contenido CoQ10 en el grupo DHA. Estos resultados pueden correlacionarse con los resultados de peróxidos en las muestras de plasma, donde el grupo DHA mostró una disminución de peróxidos en muestras de vena y arteria de cordón umbilical, así como a los 2,5 meses de vida del recién nacido.

Por otro lado, para evitar el daño oxidativo el sistema de defensa antioxidante es el encargado de proporcionar la protección adecuada, la capacidad de este sistema de defensa está determinada por la interacción entre los componentes individuales, donde se incluyen las

vitaminas liposolubles como las analizadas anteriormente (α -tocoferol, β - caroteno, CoQ10, CoQ9, retinol), además de las enzimas antioxidantes (Ochoa et al. 2003; Makrides et al. 2010; García-Rodríguez et al. 2012). Entre estas enzimas, los antioxidantes enzimáticos más importantes son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx).

En general, con respecto a los datos encontrados para las enzimas antioxidantes, se observa que tanto en el grupo DHA así como en el grupo de control, las madres y sus recién nacidos muestran una tendencia similar.

En cuanto a la superóxido dismutasa (SOD), la mayor concentración se encuentra a los 4 meses postparto en las madres y en arteria de cordón umbilical en neonatos, mientras que la menor concentración se da en el parto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la suplementación con ácidos grasos omega-3 conduce a un aumento de la actividad de SOD, aunque este aumento sólo es significativo en el momento del parto en las madres y a los 2,5 meses de vida del recién nacido. En el estudio realizado por García-Rodríguez et al. (2012) en el que suplementaban a las madres con dos porciones de salmón por semana durante la gestación, no encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima, pero este estudio sólo se centró en el período del embarazo, pero ni momento del parto ni los valores en el recién nacido fueron estudiados. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Garrel et al. (2012), observaron un aumento significativo en la actividad de SOD en el cerebro de ratas que fueron alimentadas con una dieta rica en DHA durante el desarrollo postnatal. Esta investigación apoya nuestros resultados en relación al aumento en los niveles de SOD observados en el grupo DHA, hecho que puede resultar muy beneficioso para el desarrollo de estos recién nacidos, ya que la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes es una de las principales alteraciones que promueven el daño oxidativo en proteínas y los lípidos (Slater et al. 1987; Garrel et al. 2012).

Con respecto a la catalasa (CAT), en el grupo control se observaron los valores más altos en las madres en el momento del parto, mientras que los niveles más bajos se encontraron a los 2,5 meses de vida del recién nacido. En el grupo DHA, observamos valores

más altos en el posparto en las madres, así como a 2,5 meses de vida de los neonatos, mientras que los niveles más bajos se encuentran en muestras de arteria del cordón umbilical. No encontramos diferencias significativas para CAT durante el embarazo ni el parto, lo que coincide con los resultados encontrados por García-Rodríguez et al., 2012 y Garrel et al. (2012). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en las madres a los 2,5 meses postparto, así como en los recién nacidos a los 2,5 meses de vida, donde los grupos DHA mostraban concentraciones más altas CAT en comparación con el grupo control. Lo cual indicaría que la suplementación ayuda a reforzar y aumentar los niveles de esta enzima en la madre precisamente durante el periodo de lactancia, para que la madre pueda pasar esta defensa al recién nacido, ayudando así a la formación de su sistema antioxidante durante la primera fase de la vida postnatal.

Con respecto a la glutatión peroxidasa (GPx), encontramos los valores más altos en ambos grupos en el posparto, especialmente a los cuatro meses posparto. Los valores más bajos se observaron en muestras de arteria de cordón umbilical en el grupo de control, mientras que los niveles más bajos en el grupo DHA se observaron a los 2,5 meses de vida del recién nacido. De acuerdo con estudios anteriores (García-Rodríguez et al. 2012), no se han encontrado diferencias significativas entre las diferentes tomas, sin embargo, hemos encontrado mayores valores de GPx en el grupo (vs. control) en madres a los cuatro meses posparto, así como en neonatos en el nacimiento y a los 2,5 meses de vida. García-Rodríguez et al. (2012) encontraron en eritrocitos de las madres concentraciones de selenio significativamente más altas durante la mitad del embarazo en el caso de las madres que consumieron dos porciones de salmón a la semana durante el periodo de gestación, lo cual refleja el efecto de la ingesta de salmón, ya que se trata de un pescado rico en este mineral. Por tato, los autores concluyeron que el elevado nivel de selenio debido al consumo de salmón, podría ser el factor principal para el incremento observado en la actividad de GPx. De hecho, la ingesta de selenio en la dieta se ha relacionado con una mayor actividad enzimática antioxidante y una menor peroxidación lipídica. Además, la deficiencia de selenio lleva a una disminución de las enzimas antioxidantes de selenio-dependientes y por lo tanto al aumento del daño oxidativo (Shoji et al. 2009).

Yavin (2006) en un experimento donde se administra DHA a través de la ruta intra-amniótica a los fetos en ratas, concluyó que la suplementación de DHA mejoraba la capacidad antioxidante frente a los radicales libres en el cerebro de los fetos de ratas. De esta manera, propusieron la hipótesis de que la rápida acumulación de DHA antes del nacimiento, podría servir como mecanismo antioxidante de gran relevancia durante la vida prenatal, cuando se generan altas concentraciones de radicales libres (Green et al. 2004). Además, el DHA administrado durante la vida intrauterina, reaccionó frente al estrés oxidativo en el tejido cerebral, probablemente potenciando la capacidad de captación de radicales libres por medio de las enzimas antioxidantes. Por lo tanto, concluyeron que la rápida acumulación de DHA previa al parto es un mecanismo natural para proporcionar al feto en desarrollo un sistema de defensa antioxidante. Además, se ha demostrado que el DHA tiene importantes funciones tales como ligando endógeno en la activación de factores de transcripción o como precursor para los productos de docosanoídes oxidados, algunos de los cuales también pueden actuar contra mediadores proinflamatorios (Urquiza et al. 2000; Bazan 2006; Yavin 2006). Esto concuerda con el aumento de la capacidad antioxidante observada en nuestros resultados, poniendo de manifiesto la respuesta del sistema antioxidante ante el elevado estrés oxidativo inducido durante el embarazo, lo que resulta fundamental para llevar a cabo un correcto embarazo y un óptimo desarrollo y crecimiento en el feto.

Como se ha comentado anteriormente, otro aspecto importante relacionado con el desarrollo del recién nacido es el metabolismo óseo y el contenido mineral.

El DHA ha mostrado en diversos estudios efectos significativos sobre el proceso de remodelado óseo. Pero, los datos de estos estudios que evalúan el papel de los omega-3 y en particular el DHA en la salud ósea son escasos y más aún en el caso de la suplementación en madres (Korotkova et al. 2004; Högström et al. 2007; Rahman et al. 2009).

Hasta nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que investiga los efectos de la suplementación con DHA durante el embarazo y la lactancia sobre el metabolismo óseo en recién nacidos y sus madres.

Sin embargo, sí se han realizado investigaciones en animales, las cuales sugieren que el DHA podría tener un efecto beneficioso. Iwami & Moriyama (1993), investigaron la influencia de la suplementación con aceite de pescado (rico en Omega-3) comparado con aceite de maíz (rico en omega-6) en un estudio experimental sobre el desarrollo dental en ratas. Se vio que el aceite de pescado favorecía una reducción del número de osteoclastos en un 60% y la resorción alveolar hasta un 80%. Por otro lado, Kruger & Schollum (2005), encontraron que las concentraciones de DHA en las membranas de hematíe estaban asociadas con la densidad de la masa ósea y con la absorción de calcio en hueso en una cohorte de ratas en crecimiento alimentadas con una dieta suplementada con aceite de atún.

Además, los datos de estudios en adultos suplementados en edad avanzada sugieren que los omega-3 pueden mejorar el mantenimiento de la densidad de masa ósea en esta población (Högström et al. 2007).

El metabolismo óseo resulta muy importante en la etapa perinatal, puesto que entre otros aspectos, el proceso de osificación ocurre de forma rápida sobre todo durante los primeros meses y hasta el primer año de vida del recién nacido (Kovacs 2011; Kovacs 2013). Por ello, se ha estudiado el efecto del DHA sobre el metabolismo óseo tanto de la madre como del recién nacido, analizando la evolución de los diferentes parámetros del metabolismo óseo así como el contenido mineral. Se han evaluado diversos parámetros del remodelado óseo en plasma y también se ha estudiado el contenido de diversos minerales en citosol de eritrocitos, tanto en el recién nacido como de la madre.

Se han evaluado parámetros como la osteopontina (OPN), la cual es utilizada como marcador de la resorción ósea (Cons Molina 2003; Franco L. 2010; Chen et al. 2012). Observamos valores mucho más elevados en el niño, lo que nos muestra el alto turnover óseo en el recién nacido (Møller et al. 2013; Kovacs 2013). El efecto de la suplementación solo se observa durante el parto, mostrando mayores valores en las mujeres que recibieron la suplementación con DHA. Este aumento podría estar relacionado con una mayor resorción ósea en la madre para ceder más calcio a la leche, el cual ha sido descrito como uno de los mecanismos fisiológicos que se dan en esta etapa con el objetivo de cubrir las necesidades de calcio en la leche materna para el niño (Glerean 2000; Vidal et al. 2008); de hecho, se observa

en el aumento progresivo de éste marcador desde SM0 a SM2, siendo significativo el aumento en éste último con respecto al primero. Por otro lado, tampoco podemos olvidar el papel de señalización inflamatoria de esta citoquina y el hecho de que el parto da lugar a un elevado proceso inflamatorio (Terzidou et al. 2011; Chen et al. 2012).

Otro de los parámetros hormonales estudiados es la paratohormona (PTH), la cual controla el metabolismo del calcio (Fernández-Tresguerres et al. 2006; Neyro Bilbao et al., 2011). Se encontraron valores muy reducidos en sangre de cordón con respecto al resto de muestras. Estos resultados corresponden con los mostrados por Uemura et al. (2002), en un estudio que evaluaba marcadores del remodelado óseo, donde el análisis mostró que la PTH se mantuvo disminuida en sangre de cordón umbilical, es decir, se mantuvo por debajo los niveles fisiológicos normales. Los valores normales oscilan entre 10-55 pg/mL, mientras que las muestras de sangre de cordón mostraron valores menores de 10 pg/ml. Por otro lado, los valores maternos también coinciden con lo indicado en la literatura, con valores normales, dentro del rango fisiológico, sin cambios significativos durante los periodos de gestación y lactancia (Uemura et al. 2002; Vidal et al. 2008).

Con respecto a las diferencias entre los grupos control y DHA, se ha observado un aumento estadísticamente significativo en las madres lactantes suplementadas con DHA respecto al grupo control. Esta es una hormona hipercalcemiante, estimuladora de los osteoclastos (Fernández-Tresguerres et al. 2006; Neyro Bilbao et al., 2011), lo cual podría resultar negativo desde el punto de vista de la madre, sin embargo positivo para el recién nacido, dado que al aumentar los procesos de resorción, se da una recuperación de calcio a nivel renal así como una mayor absorción intestinal Ca, aumentando el aporte de calcio en la leche materna, lo cual apoya los resultados obtenidos para la OPN, donde precisamente se observa también este aumento de la resorción ósea, que como se ha explicado anteriormente, es uno de los mecanismos fisiológicos que se dan en esta etapa con el objetivo de cubrir las necesidades de calcio en la leche materna (Yoon et al. 2000; Vidal et al. 2008).

Otro aspecto relevante, son los niveles encontrados en el recién nacido, similares o incluso superiores a los encontrados en el adulto, resaltando la alta tasa de metabolismo óseo en los recién nacidos, como muestran diferentes estudios (Uemura et al. 2002; Manjón et al.,

2003). En referente a la suplementación con omega-3, disminuye esta hormona en el lactante a los 2,5 meses de vida, lo cual podría favorecer al neonato, ya que la disminución de la PTH, lleva a una disminución de la tasa de la resorción ósea, favoreciendo así la formación ósea en el recién nacido.

Por otro lado, también se ha estudiado la interleucina-6 (IL-6), que junto con el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), son citoquinas que juegan un papel importante en el proceso de remodelado óseo (Poulsen et al. 2008; Barba 2011).

La evidencia sugiere que los biomarcadores pro-inflamatorios actúan sobre las células madre mesenquimales y precursores de osteoclastos aumentando de la resorción ósea. En primera instancia, estas citoquinas se unen a las células del estroma y aumentan la expresión del receptor RANK-L y disminuyen la producción de OPG, que por otro lado conduce a un aumento de la activación de los osteoclastos (Quinn et al. 2005) La activación de una vía secundaria, se da cuando una deficiencia de estrógenos lleva a una activación de los osteoclastos mediada por las citoquinas (Barbour et al. 2012; Korczowska et al. 2013).

Encontramos valores máximos de IL-6 en las madres durante el parto (SM1), así como en vena del cordón umbilical del recién nacido (SH0V). Del mismo modo, se observan diferencias significativas entre los grupos control y DHA, con mayores concentraciones de IL-6 en el caso del grupo control.

De acuerdo con la evidencia científica, la ingesta dietética de ω -3 PUFA está asociada con la disminución de factores proinflamatorios como son las interleucinas (Kajarabille et al., 2013). Suplementos de ácidos grasos omega-3 (de entre 3g a 6g/día) mostraron un efecto beneficioso en el caso de enfermedades de las articulaciones. De la misma manera, las síntesis de factores pro-inflamatorias como interleucinas y TNF- α en el tejido de cartílago fue inhibida por la suplementación de la dietas ricas en con aceite de pescado, que contiene EPA y DHA (Shapiro et al. 1996; Watkins et al. 2001).

Por otra parte, la inflamación durante el embarazo resulta necesaria durante varias etapas de desarrollo fetal, sin embargo estos niveles deben estar regulados para evitar daños en el tejido de la interfase materno-fetal (Misra & Khurana 2008; Hannan 2014). Partiendo de

la base de que la inflamación es un proceso común a todos los embarazos, bien es cierto que una respuesta inflamatoria excesiva durante el embarazo está relacionada con la fisiopatología de embarazos anormales, pudiendo causar complicaciones tales como la preeclampsia (Takahashi & Ide 2000; Misra & Khurana 2008). Entre las citoquinas inflamatorias y las expresadas por las células del trofoblasto, la IL-6 es una citoquina proinflamatoria multifuncional, la cual es producida por que se produce por las células endoteliales del tejido vascular y el tejido placentario (Yin et al. 2014; Hannan 2014; Demirturk et al. 2014). Además, el parto da lugar a un elevado proceso inflamatorio, momento donde se acentúa el papel de esta citoquina como señal inflamatoria (Chen et al. 2012).

En nuestro estudio, el efecto de la suplementación de DHA lleva a una disminución de los niveles de IL-6 en muestras de vena umbilical en el recién nacido, lo cual podría resultar beneficiosos para la formación de hueso el neonato, además de disminuir el proceso inflamatorio en la madre en el mismo momento del parto. Dado que una de las funciones de la IL-6 es promover la osteoclastogénesis mediante el aumento de la liberación de RANK-L por los osteoblastos (Le Goff et al. 2010; Abdel Meguid et al. 2013), una disminución de la IL-6 provocaría una disminución de la formación de osteoclastos, por lo que disminuiría la resorción ósea en el neonato.

Otra de las citoquinas pro-inflamatorias estrechamente relacionada con la IL-6 es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual promueve directamente la resorción ósea a través de la activación de los osteoclastos (Bonewald 2005; Bonewald 2011), e indirectamente a través de la expresión de los activadores de osteoclastos (Smith 2005). TNF- α también inhibe la formación de hueso, ya que causa el aumento de la apoptosis de los osteoblastos, así como la reducción de la diferenciación y la proliferación de los osteoblastos y sus progenitores (Kawai et al. 2012; Panuccio et al. 2012; Straburzyńska-Lupa et al. 2013).

Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en la madre en el momento del parto, donde el grupo DHA muestra valores más bajos, lo cual demuestra que el DHA contribuye disminuyendo el proceso inflamatorio en el parto, tal y como muestran también los resultados encontrados para la IL-6 (Marchioni & Lichtenstein 2013). Del mismo

modo, la suplementación también disminuye los niveles de TNF- α en arteria umbilical del recién nacido (SH0A).

En el neonato, a posteriori, también se observa una reducción en los valores de TNF- α a los 2,5 meses de vida, en los recién nacidos cuyas madres fueron suplementadas, lo que complementa los resultados hallados para la IL-6, donde se muestra que el DHA podría ayudar a la formación de hueso, disminuyendo la resorción ósea causada en este caso por TNF- α (Coates et al. 2011; Munro & Garg 2013; Kajarabille et al. 2013).

Otro de los parámetros estudiados, el cual puede ser utilizado como marcador de resorción ósea es el RANK-L, componente del sistema RANK-L/RANK/OPG, un sistema de gran importancia en la regulación del metabolismo óseo e implicado en la fisiopatología ósea, y la interrupción de este sistema conduce a la inhibición de la resorción ósea (Montenegro et al. 2002). Aunque muchos estudios describen el papel del sistema RANK-L/RANK/OPG en los adultos, muy poco se sabe acerca de estos marcadores del metabolismo óseo en neonatos y menos aún sobre la posible relación entre estos marcadores en los recién nacidos y madres (Tenta et al. 2013).

En nuestros resultados encontramos los niveles más elevados de RANK-L en el niño a los 2,5 meses de vida, durante la lactancia. En la madre, al igual que en el recién nacido, se observan mayores valores durante la lactancia con respecto a la gestación y parto, lo cual podría ser explicado por el alto grado de remodelado óseo necesario como mecanismo compensatorio para permitir el hacer frente a las elevadas necesidades de calcio en la leche materna para el neonato en crecimiento. En los niños, este aumento podría ser consecuencia de un elevado turnover óseo. Niveles elevados de RANK-L se corresponden con una mayor resorción ósea, ya que estimula el proceso de diferenciación de los osteoclastos, su maduración e inhibición de la apoptosis de los osteoclastos (Fernández-Tresguerres, 2006; Tenta et al. 2013).

Uno de los mecanismos propuestos por el que los ácidos grasos omega-3, entre los que se encuentra el DHA regulan el metabolismo óseo es la influencia sobre el RANK-L, provocando una disminución de este parámetro de resorción ósea. Así, en nuestro estudio

encontramos una disminución significativa de este parámetro en sangre venosa de cordón cuando las madres eran suplementadas con DHA, lo cual podría corresponder con una disminución de los procesos de resorción ósea (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010).

Otro parámetro íntimamente relacionado con el RANK-L es la osteoprotegerina (OPG), la cual actuaría como antagonista del RANK-L impidiendo la unión a su receptor y por tanto impidiendo su efecto (Tenta et al. 2013). Los resultados encontrados muestran valores máximos de OPG en las madres durante el parto, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de muestras tanto maternas como del niño. Los valores maternos en la gestación (6 meses de gestación) y en el posparto son menores que los encontrados en el momento del parto (SM1) y mayores que los encontrados en las muestras del niño en el nacimiento.

Estos altos niveles de OPG en el parto, podrían estar relacionados con los elevados niveles de estrógenos, dado que se sabe que esta hormona puede modificar los niveles de OPG (Takahashi et al., 1998; Murakami et al. 1998). Nuestros resultados concuerdan con el mostrado por Uemura et al. (2002), en el que no se observaron diferencias en la OPG durante el embarazo, pero sí aumento en concentraciones plasmáticas durante el parto que luego descendían tras el parto en la madre. Contrariamente, en otros estudios se halló un aumento progresivo de OPG durante el embarazo acompañado de una caída de RANK-L (Taylor et al., 2003 ; Hossein-Nezhad et al. 2011). La fuente de OPG durante el embarazo es desconocida, pero su rápido descenso en el posparto, junto con los bajos niveles en el neonato y la presencia de OPG en el tejido placentario, señalan a la placenta como la probable fuente (Naylor et al. 2003; Sarli et al. 2005).

La suplementación con DHA produjo un aumento en los niveles de OPG en el recién nacido en el momento del nacimiento, mostrando valores significativamente más altos en sangre de cordón arterial, lo cual podría beneficiar al neonato frente al elevado proceso de recambio óseo, ya que la OPG actúa como un factor protector previniendo una pérdida ósea excesiva. Teniendo en cuenta los efectos antagónicos de las proteínas RANK-L y OPG, el remodelado óseo depende en última instancia del equilibrio entre ambas, a la vez que influenciado por otros factores (Naylor et al. 2003; Neyro 2011).

Según la evidencia, los recién nacidos prematuros presentan un aumento de resorción ósea, manifestando un aumento en los marcadores de resorción ósea en orina comparado con los recién nacidos a término (Miller 2003). En estos recién nacidos, un descenso de la resorción ósea como significaría la disminución del RANK-L y aumento de la OPG podría resultar beneficioso para protegerlos de la enfermedad metabólica ósea del prematuro.

Uno de los marcadores directamente relacionados con la velocidad de recambio óseo es la osteocalcina (OC). Es un marcador de la función de los osteoblastos y sus niveles se relacionan con los rangos de formación ósea (Barba 2011). Durante los primeros meses de vida y hasta cumplir el primer año, es el momento en el que los fenómenos de recambio óseo alcanzan la máxima intensidad, manifestándose altos niveles de osteocalcina (Manjon et al., 2003), lo cual concuerda con nuestros resultados encontrados, donde los niveles más altos de osteocalcina se observan en las muestras del niño, con respecto a la madre. Estos niveles máximos de osteocalcina en el niño se corresponden con el elevado turnover óseo y ritmo de crecimiento, característicos de este periodo de la vida. Durante el periodo fetal y la fase de crecimiento acelerado, los elevados niveles de osteocalcina muestran la predominante formación ósea, pudiendo ejercer incluso un efecto inhibitor sobre la mineralización excesiva, para permitir el crecimiento óseo normal. Los recién nacidos, a juzgar por los elevados niveles de osteocalcina sérica en las primeras horas tras el nacimiento, tienen bien desarrollada la capacidad de sintetizar su propia osteocalcina (Martin 1988).

En el caso de las madres, los resultados mostraron mayores concentraciones de osteocalcina durante el periodo de lactancia con respecto a la gestación y el parto, con un aumento progresivo desde el embarazo (SM0) hasta los 2,5 meses postparto (SM2), resultados similares a los mostrados por Yoon et al., 2000, quienes también encontraron niveles de osteocalcina significativamente reducidos durante el embarazo (16 semana gestacional), mostrando así una disminución progresiva de la masa ósea durante el embarazo; esta pérdida de masa ósea se recupera tras el parto, mostrando unos niveles más elevados de osteocalcina a las 6 semanas posparto. Los niveles mínimos de osteocalcina durante el embarazo encontrados en nuestros resultados, muestran una menor formación ósea, hecho lógico teniendo en cuenta que las necesidades del feto son prioritarias. Por otro lado, el aumento

progresivo observado junto con los valores altos durante la lactancia, muestran el alto turnover óseo existente durante este último periodo, en el cual se da una destrucción ósea para obtener el calcio necesario para el recién nacido tal y como se ha explicado anteriormente; pero para contrarrestar esta pérdida, también debe haber formación, tal y como se indica en nuestros resultados y otros estudios que muestran elevados niveles de osteocalcina durante la lactancia (Yoon et al. 2000; Barba 2011).

Respecto a la suplementación con DHA, se ha encontrado un aumento estadísticamente significativo de osteocalcina en los niños a los 2,5 meses de vida y en las madres durante el parto, lo cual podría suponer un efecto beneficioso principalmente para el neonato, en una fase tan importante de su desarrollo y crecimiento óseo, pues podría indicar una mayor formación ósea en este grupo. Para la madre también resultaría beneficioso, ya que ese aumento en la formación, le ayudaría a empezar a recuperar la masa ósea perdida durante el periodo de embarazo.

Otra de las hormonas estudiadas es la adrenocorticotropina (ACTH), implicada también en el metabolismo óseo, presenta un doble efecto sobre el hueso: por un lado un efecto indirecto negativo a través del cortisol promoviendo la resorción, y por otro lado, un efecto directo positivo sobre los osteoblastos (Mancini et al., 2004). Se han observado valores superiores en el recién nacido (en muestras de cordón umbilical y a los 2,5 meses de vida) con respecto a las encontradas en las muestras de madre durante el embarazo y la lactancia, con diferencias estadísticamente significativas, lo cual vuelve a poner de manifiesto el alto turnover óseo en el neonato; aunque quizás en este caso, el efecto que hay que destacar es el efecto sobre el cortisol, dado que en esta etapa, el cortisol adquiere una relevante importancia desde el punto de vista de un adecuado desarrollo nervioso, así como muscular y óseo (Riancho J.A. 2003).

Adquieren un especial interés los valores obtenidos en muestras de vena de cordón umbilical, ya que son los máximos valores obtenidos, superiores incluso a los encontrados en la sangre fetal (arterial) y en la madre, lo que parece indicar un origen placentario de la ACTH. Miyakawa & Ikeda (1974), también encontraron niveles de ACTH en sangre de cordón umbilical significativamente mayores que los encontrados en la madre, por lo cual

concluyeron que la ACTH no atravesaba la barrera placentaria. La corticotropina coriónica de la placenta podría ser la responsable de este aumento de ACTH en el neonato, con la finalidad de liberar ACTH hacia el feto. Este aumento de ACTH, entre otros efectos, aumentaría los niveles de glucocorticoides como el cortisol, hormonas responsables de la respuesta al estrés oxidativo y que podrían mejorar la capacidad del recién nacido para hacer frente al nacimiento y su adaptación de un entorno intrauterino (aerobio) a un ambiente extrauterino, colaborando en la movilización de sustratos energéticos, mantenimiento de la glucemia e incluso en la maduración pulmonar del niño (Fernández-Tresguerres et al. 2006; Raga et al. 2006). En cuanto a la influencia que pudiera tener sobre el metabolismo óseo, se sabe que niveles fisiológicos de cortisol no parecen tener efectos perjudiciales sobre la formación ósea, sino que son necesarios para la normal diferenciación celular y probablemente también para el propia formación del hueso (Riancho et al., 2003). Por otro lado se ha demostrado también, que la ACTH podría estimular la proliferación de osteoblastos a través de receptores específicos en estas células, lo cual potenciaría la formación ósea (Zhong et al. 2005; Isales et al. 2010).

Con respecto a la suplementación, se observa que aumentan los niveles de ACTH en la sangre venosa de cordón, con diferencias estadísticamente significativas, lo cual considerando lo comentado anteriormente respecto al mecanismo de afrontamiento al estrés del nacimiento, podría tener efectos beneficiosos para el recién nacido. Además, en el grupo DHA los niveles de ACTH en la sangre materna durante el parto (SM1), muestra diferencias estadísticamente significativas con los valores encontrados en el embarazo (SM0) y el postparto (SM2), lo cual considerando que el cortisol es una hormona liberada para combatir el estrés, también resultaría beneficioso para la madre por ejercer una respuesta fisiológica moduladora y adaptativa al estrés del parto (Fernández-Tresguerres et al. 2006; Raga et al. 2006).

Otro de los parámetros hormonales estudiados y relacionados con el hueso es la leptina. En estudios anteriores se ha visto que sus niveles aumentan en mujeres embarazadas como resultado de la secreción placentaria, en suma a la producción de tejido adiposo (Lecke et al. 2011). En el recién nacido en cambio, disminuyen sus niveles en relación a los días de vida, en un estudio donde se evalúan los niveles de leptina en recién nacidos, sugieren que la

placenta puede ser una importante fuente de leptina en la circulación fetal, explicando el brusco descenso en los niveles de leptina de forma temprana tras el nacimiento (Valuniene. et al. 2009; Lecke et al. 2011), lo cual concuerda con los resultados de nuestro estudio, donde observamos valores muy disminuidos de leptina en el plasma de los niños lactantes a los 2,5 meses de vida, en comparación con los observados en cordón umbilical, donde los valores de leptina son mayores.

A escala placentaria y en cordón umbilical, la leptina podría actuar como un factor de crecimiento o como una señal del estatus nutritivo y energético entre la madre y el feto, asegurando un adecuado aporte alimentario. Diversos autores han descrito que en situaciones de balance energético positivo se observa un aumento de los niveles de leptina, sin originarse previos cambios en el acumulo adiposo, lo cual provoca un incremento del consumo de oxígeno a nivel de tejido así como de la termogénesis y de la tasa metabólica. La leptina parece intervenir, por tanto, en la homeostasis energética evitando un incremento excesivo del porcentaje graso (Ahima et al. 1996; Campfield et al. 1998; Ahima et al. 2000).

En cuanto a la suplementación, se observa un aumento de leptina en sangre de cordón en los niños cuyas madres fueron suplementadas con DHA, aunque sus posibles efectos sobre el metabolismo óseo no están claros, debido a que presenta un doble mecanismo alternativo: uno periférico que estimula la formación y crecimiento óseo, inhibiendo la resorción y otro central indirecto, que inhibe la formación ósea, aunque parece ser que existe un predominio de su efecto periférico según estudios *in vivo*, por lo cual podría beneficiar al niño (Williams et al. 2011; Schwetz et al. 2012).

En definitiva, si consideramos que la leptina tiene un posible efecto positivo sobre el remodelado óseo (Barbour et al. 2012), la suplementación con DHA tendría un efecto positivo en esta primera etapa, pero quizás el efecto más interesante esté en el papel sobre el balance energético que ejerce ésta sustancia y que se vería potenciado por la suplementación con DHA. Lo cual podría resultar beneficioso para el recién nacido, ya que la leptina está directamente relacionada con la grasa corporal, por lo que participa en la regulación del metabolismo de la grasa y en el control del apetito, ayudando así a la adecuada alimentación/ingesta del neonato.

Respecto a la insulina, otra hormona del sistema endocrino que también puede participar en el remodelado óseo (Fernández-Tresguerres et al. 2006; Quesada 2006), en nuestros resultados se observaron menores niveles en sangre de cordón umbilical, tanto en sangre arterial como venosa, respecto al resto de muestras. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la concentración de insulina en la sangre venosa de cordón en el caso de los recién nacidos cuyas madres fueron suplementadas, con respecto al grupo control. El estudio realizado por Wijendran et al. (2000) demostró que la concentración de fosfolípidos (DHA) en sangre de cordón umbilical se ve comprometida en madres con diabetes mellitus gestacional, lo cual tendría relación con nuestros resultados.

La sensibilidad a la insulina está negativamente asociada con la concentración de ácidos grasos omega-6 en el plasma (Simopoulos 1999), lo que apunta la importancia de la presencia de los AGPI omega-3 ácidos grasos en la dieta de las madres. El DHA presente en la dieta materna puede aumentar la sensibilidad (disminuye la resistencia) a la insulina en el neonato, lo cual puede resultar beneficioso para el correcto desarrollo del recién nacido, ayudando al correcto transporte de nutrientes al feto, y actuando por tanto como un promotor para el crecimiento fetal. Altas concentraciones de insulina en sangre del cordón se han asociado con la ganancia de peso adecuada a su edad gestacional en los neonatos (Mazaki-Tovi et al. 2005). Otro estudio demostró que altas concentraciones de insulina en la sangre del cordón estaban relacionadas con un aumento de talla adecuada a su edad gestacional, mostrando así una correlación positiva entre de la concentración de insulina con el peso y talla del recién nacido (Tsai et al. 2004).

Un estudio en el que se evaluó la influencia de un suplemento de DHA durante el embarazo sobre los niveles de insulina en plasma de cordón umbilical, encontraron, a diferencia de lo observado en nuestros resultados, una menor concentración de insulina en plasma de cordón de los recién nacidos cuyas madres consumían el producto con DHA, comparadas con el placebo (Courville et al. 2011). Los autores apuntan que estos resultados pueden ser debidos al periodo y dosis utilizada para la suplementación (200mg DHA/día aprox., desde la mitad del embarazo (semana gestacional 20-24) hasta el momento del parto;

Suplementado: n 22 y Placebo: n 25), recomendado realizar otros estudios con un mayor número de sujetos, además de una mayor dosis en la suplementación.

Otro aspecto importante relacionado tanto con el metabolismo óseo, por su participación en el mismo, como con el estrés oxidativo, por su papel como cofactor es el contenido en minerales. Se ha analizado el contenido de diversos minerales como el calcio (Ca) y el fósforo P en citosol de eritrocito.

De acuerdo con la evidencia, los AGPI-CL omega-3 también desempeñan su papel en el proceso de remodelado óseo con respecto al efecto que ejercen sobre el contenido mineral. Resultados hallados en diferentes estudios muestran que los ácidos grasos omega-3, especialmente el DHA, están asociados positivamente con el aumento de la densidad mineral ósea (Högström et al. 2007). Otras investigaciones también sugieren que los suplementos ricos en ácidos grasos omega-3, podrían ayudar a mantener el contenido mineral del hueso tras la menopausia en las mujeres. Teniendo en cuenta todo esto, es posible que las dietas ricas en AGPI-CL omega-3 puedan ayudar a construir y mantener un esqueleto sano en los seres humanos (Iwami-Morimoto et al. 1999; Watkins et al. 2004).

El calcio (Ca) es uno de los minerales que junto con la homeostasis ósea también sufre cambios durante el embarazo y la lactancia, debido a los elevados requerimientos de calcio por parte del feto, especialmente durante el tercer trimestre de embarazo, cuando se da una rápida mineralización del esqueleto fetal, lo cual puede llevar a aumentar el riesgo de fracturas óseas en la madre durante el embarazo y lactancia (Iwamoto et al. 2012).

Durante el embarazo, el aumento de las necesidades de calcio no queda completamente compensada mediante el aumento de la absorción intestinal de calcio. Además, el calcio también se moviliza desde el hueso, debido a un aumento de la resorción ósea, dando como resultado una menor densidad mineral ósea. Sin embargo, estudios previos han mostrado resultados divergentes, con aumento de la resorción ósea a partir de principios del embarazo, y otro en cambio sólo durante la última etapa del embarazo (Kovacs 2011; Møller et al. 2013).

La mayoría de estudios han demostrado que existe un incremento en el recambio óseo durante la lactancia. Esto puede explicarse en parte por una disminución en los niveles

plasmáticos de estradiol y un aumento de la prolactina y la PTHrP plasmáticas, durante la lactancia. Por otra parte, los niveles de dihidroxi-vitamina D disminuyen tras el parto causando una normalización de la absorción intestinal de calcio. De este modo, el aumento de la movilización del calcio en los huesos, resulta ser la única forma de obtener suficiente calcio para la leche materna (Møller et al. 2013).

Los resultados han mostrado diferencias significativas entre ambos grupos en la madre a los 2,5 meses postparto (SM2), donde el grupo DHA muestra mayor concentración de Ca, lo cual sugiere que el DHA podría ayudar a hacer frente a la gran demanda de Ca durante la lactancia, a fin de concentrar grandes cantidades de Ca en la leche materna, ya que como apuntan Yoon et al. (2000) la concentración de Ca disminuye en las madres durante la lactancia. Estos resultados observados en el caso del Ca, concuerdan con el mecanismo fisiológico descrito previamente para el caso de la PTH y la OPN, el cual se da precisamente en esta etapa con el objetivo de cubrir las necesidades de calcio en la leche materna para el recién nacido.

Con respecto a los recién nacidos, se observan diferencias significativas en el nacimiento en muestras de vena y arteria de cordón umbilical, donde el grupo DHA también mostró mayores niveles de Ca. Esto es consistente con los estudios que señalan que los AGPI omega-3 pueden mejorar la acumulación de calcio en el hueso (Griel et al. 2007; Kruger et al. 2010). Además, en un estudio realizado por Kruger & Schollum (2005), encontraron que las concentraciones de DHA en membrana de eritrocitos se asociaron con la densidad ósea y la absorción de calcio en el hueso en una cohorte de ratas en crecimiento alimentados con una dieta suplementada con aceite de atún. En otro estudio aleatorizado con 40 pacientes con osteoporosis, también se observó que los sujetos que tomaron un suplemento con omega-3, tuvieron una mejor absorción del calcio en comparación con el grupo placebo (Rahman et al. 2007).

Por tanto y de acuerdo con la bibliografía, los ácidos grasos omega-3 y en particular DHA, mejora la absorción de calcio, además de cambiar la composición de las membranas celulares intestinales y disminuir la pérdida de calcio intestinal, aumentando su absorción (Bonnet & Ferrari 2011). La absorción de Ca duodenal es un proceso que consiste

básicamente en tres pasos: la absorción a través de los canales de Ca de la membrana, el transporte a través de la célula por una proteína transportadora (Ca binding protein) la cual está estimulada por la vitamina D, así como la expulsión de calcio a través de la membrana basolateral por Ca-ATPasa acompañado del intercambio entre Na-Ca, este último impulsado por Na⁺ / K⁺ -ATPasa presenta en la membrana basolateral (Haag et al. 2003). Se ha comprobado que los AGPI-CL omega-3, y especialmente el EPA y DHA, potencian la acción de la vitamina D, además de aumentar la actividad de la enzima Ca-ATPasa en los enterocitos, aumentando así la absorción de Ca duodenal (Kruger & Schollum 2005). Además en un estudio realizado por Coetzer et al. (1994) observaron que el aceite de pescado aumentaba el grado de insaturación de las membranas de los enterocitos, por consiguiente, dedujeron que la absorción de Ca puede ser facilitada por el aumento del grado insaturación de las membranas, aumentando así la actividad de la Ca-ATPasa (Kruger & Schollum 2005). Por otro lado, estudios han demostrado que el aceite de pescado aumenta la reabsorción de calcio por los riñones (Buck et al. 1991). Este efecto no ha sido demostrado en el caso del DHA, pero es posible que una alta concentración de este ácido graso sea capaz de causar retención de calcio por los riñones (Kruger & Schollum 2005). Hallazgos realizados por de Kelly et al. (2003) apoyan también este mecanismo, donde observaron que los AGPI-CL omega-3 interactuaban con los ácidos linoleicos conjugados promoviendo así la absorción de Ca intestinal, la cual beneficia al metabolismo y masa ósea.

Junto con el Ca, el fósforo (P) es otro mineral esencial en la primera etapa del desarrollo, durante la cual los recién nacidos muestra una acreción mineral más rápida, y por tanto tienen requisitos más altos que en el resto de etapas de la vida (Christmann et al. 2013).

En cuanto a los datos observados, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en la madre en el momento del parto y tras el parto, donde las madres que fueron suplementadas con DHA mostraron mayor concentración de fósforo. En el recién nacido se observaron valores significativamente más altos de P en arteria de cordón umbilical, en el caso de los neonatos cuyas madres fueron suplementadas.

El P junto con Ca, son los principales minerales para la mineralización ósea en el recién nacido. Como se ha comentado anteriormente, para satisfacer la elevada demanda de Ca y P

durante el último trimestre de gestación, donde se da una rápida formación ósea, hay un transporte activo transplacentario de calcio y fósforo de la madre al feto (Kovacs 2011; Kovacs 2013). Se ha supuesto que para una formación ósea extrauterina normal, en el neonato (y especialmente en el caso del recién nacido prematuro) los requerimientos diarios de Ca y P, aunque menores que los requeridos durante el periodo fetal, siguen siendo elevados. Sin embargo, en el ambiente extrauterino es más difícil de lograr este alto nivel de calcio y fósforo (Miller 2003). En este aspecto, tal y como se ha comentado en el caso del Ca, el DHA podría aumentar la retención de P por los riñones, aumentando así los niveles de P. Por lo tanto, la suplementación con DHA, no sólo ayuda en la recuperación de P tras el parto en las madres, sino que además aumenta la cantidad de P en la leche materna con el objetivo de cubrir las necesidades de fósforo para el recién nacido (Miller 2003).

Por otro lado el hierro (Fe) es un micronutriente esencial que resulta necesario para una amplia variedad de procesos enzimáticos, así como para el propio feto en desarrollo. Es esencial para el transporte de oxígeno en los eritrocitos y la síntesis de ácidos nucleicos, también juega un papel importante en el crecimiento celular y la replicación, ya que muchas proteínas que se unen al hierro catalizan reacciones implicadas en el metabolismo energético. Además, es esencial en la maduración de los linfocitos, el desarrollo visual y la síntesis de mielina y neurotransmisores (Li et al. 2008). Los recién nacidos son particularmente sensibles a los desequilibrios en el metabolismo del hierro, por lo que tiene especial importancia asegurar su adecuada concentración durante las primeras etapas de vida (Cornock et al. 2013).

En las madres se encuentran menores niveles de P que los observados en el neonato, estos niveles aumentan ligeramente durante el momento del parto, así como en el postparto, donde a los 4 meses se alcanzan valores similares a los hallados en vena de cordón umbilical en el neonato. Los valores en arteria de cordón y en el neonato a los 2,5 meses de vida del neonato son ligeramente superiores a los observados en la madre durante el embarazo y en el momento del parto y similares a los de la madre a los 2,5 meses postparto. En un estudio encontraron que la concentración de Fe de sangre, disminuyó progresivamente a medida que avanzaba la gestación (Zhang et al. 2013). Además según la bibliografía, los niveles de hierro en la parte fetal de la placenta eran significativamente mayores que los niveles hallados en la

parte materna (De Moraes et al. 2011). Raghunath et al. (2000) observaron que el hierro es absorbido por las células trofoblásticas y transportado mediante la transferrina unidireccionalmente desde la madre al feto en contra de un gradiente de concentración, lo cual actúa en contra de las necesidades de Fe maternas, incluso cuando la madre sufre deficiencia de hierro.

Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en las madres en el momento del parto, así como en los recién nacidos en arteria del cordón umbilical y a los 2,5 meses de vida. El Fe es un elemento esencial para el desarrollo del feto, ya es esencial para el transporte de nutrientes al feto. Además resulta esencial para las enzimas que utilizan al hierro como cofactor, así como para enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores (Gambling et al. 2011). Por lo tanto la suplementación con DHA, aumenta la concentración de Fe con el fin de asegurar un correcto desarrollo del feto, y del mismo modo, ayuda a evitar la deficiencia de Fe durante el parto en las madres.

Se ha demostrado que los genes asociados con el transporte y captación de hierro se sobreexpresan con el aporte de DHA. De hecho, se ha observado que aumenta la expresión génica del DMT-1 (Transportador de Metales Divalentes-1) en células sometidas a un enriquecimiento del medio con DHA, acompañado por un aumento marcado de la absorción de hierro. El DMT-1 es el transportador principal que modula la respuesta de hierro en las células. Asimismo, el receptor de transferrina (TfR) también se eleva considerablemente tras la incubación en un medio enriquecido con DHA (Zecca et al. 2004)(Brand et al. 2008). Por otra parte, otro estudio también observó un aumento del contenido de ferritina tras la exposición de células endoteliales al DHA (Ober & Hart 1998). Todos estos hallazgos previos explican y concuerdan con el mayor contenido de Fe que encontramos, tanto en madres como en neonatos, en el grupo DHA respecto al grupo control.

El Magnesio (Mg) es un elemento de gran importancia, que junto con Ca y hierro Fe, son esenciales para la salud de las mujeres embarazadas y el propio feto.

Las concentraciones de Mg se ven especialmente alteradas durante el embarazo, debido a los elevados requisitos por parte del feto en crecimiento, así como los grandes cambios y

requerimientos fisiológicos que se dan en la madre durante este periodo (Zhang et al. 2013). El magnesio es un importante cofactor para las enzimas que están involucrados en el metabolismo de los hidratos de carbono, por lo que el Mg tiene un importante papel en sobre la insulina. Unos bajos niveles de Mg pueden causar resistencia a la insulina, tanto en niños y adultos. Además, varios estudios han demostrado un menor tamaño al nacer o índices de crecimiento fetal deficientes, e incluso desarrollo del síndrome metabólico y resistencia a la insulina, todos ellos asociados a una deficiencia de Mg. Además, el Mg puede afectar a la función muscular en los vasos sanguíneos y su déficit puede inducir una inflamación en el endotelio (Nielsen & Rylander 2011; Takaya & Kaneko 2011).

Los datos mostraron diferencias significativas entre los grupos en madres a los 2,5 meses postparto y en muestras de vena del cordón umbilical en recién nacidos, donde el grupo DHA muestra mayores concentraciones de Mg. Por lo tanto en este caso también, al igual que ocurre con el Fe, el DHA podría ayudar en la recuperación de la concentración adecuada de este mineral tras el parto y de la misma manera, asegurar unas concentraciones óptimas para el correcto desarrollo del recién nacido.

Estudios realizados han mostrado que la administración materna de $MgSO_4$ de forma prolongada puede inducir a una mineralización ósea anormal en el recién nacido, como ha mostrado el estudio realizado por Yokoyama et al. (2010). Como se ha comentado anteriormente, el Ca es transportado desde la madre al feto atravesando la placenta, sobre todo tras la 28 semana gestacional. Este transporte está regulado por la PTH fetal, la PTHrP, la calcitonina, así como la PTHrP y la vitamin D maternas. El Mg presente en la madre también cruza la placenta y puede competir con el metabolismo del Ca fetal. El Mg por tanto podría influir en el equilibrio de la PTH fetal, de este modo el Ca en el hueso fetal podría ser sustituido por Mg, lo que podría conducir a la atrofia ósea en el recién nacido. Por el contrario y de acuerdo con varios estudios, el magnesio resulta esencial para el bienestar del feto, el $MgSO_4$ ha sido ampliamente utilizado no sólo para la prevención del parto prematuro, sino también para proteger contra el daño cerebral a los recién nacidos (Costantine & Weiner 2009; Yokoyama et al. 2010). El estudio realizado por Almonte et al. (1999) utiliza un modelo de roedor con hipomagnesemia inducida mediante la dieta para investigar los efectos

de la deficiencia de magnesio antes y durante la gestación sobre la morbilidad y mortalidad neonatal. La deficiencia de magnesio durante la gestación aumenta significativamente la mortalidad y morbilidad neonatal, lo cual fue asociado con una reducida concentración de Mg libre tanto en las madres como en sus cachorros. Los animales alimentados con una dieta deficiente en magnesio antes del apareamiento, pero que sin embargo tomaron suplementos de magnesio durante la gestación no mostraron un cambio significativo en la mortalidad y morbilidad neonatal en comparación con los animales control que no tomaron el suplemento.

Finalmente y con respecto a cinc (Zn), se sabe que es un elemento esencial para más de 200 metaloenzimas, además de formar parte del metabolismo de los carbohidratos y participar en funciones antioxidantes, juega un papel vital en algunas funciones biológicas incluyendo la división celular, la síntesis de proteínas y el metabolismo nucleico (Izquierdo Alvarez et al. 2007).

El requerimiento de zinc durante el tercer trimestre es aproximadamente dos veces más alto que en mujeres no embarazadas (Mistry et al., 2014). Los suplementos de zinc durante el embarazo han demostrado que ayudan a aumentar significativamente el peso del neonato al nacer, así como el perímetro craneal, poniendo de manifiesto la importancia del adecuado suministro de zinc durante el embarazo (Goldenberg et al. 1995; Mistry et al. 2014).

Junto con el Zn el Cu es especialmente importante por su papel como cofactor de enzimas antioxidantes de pendientes del Cu (Cu/Zn SOD). Además es necesario para los sistemas que incluyen la enzima la citocromo oxidasa y la catalasa. Su deficiencia puede causar diversos tipos de trastornos nutricional y vasculares (Zhang et al. 2013).

Los datos mostraron diferencias significativas entre los grupos en madres durante el postparto, tanto a los 2,5 meses como a los 4 meses postparto, así como en muestras de vena del cordón umbilical en recién nacidos, donde el grupo DHA muestra mayores concentraciones de Cu.

En el caso del Zn, se han observado diferencias significativas sólo en los recién nacidos en vena de cordón umbilical, así como a los 2,5 meses de vida, en ambos casos los grupos DHA mostraron un mayor contenido de Zn en comparación con el grupo control.

Estos resultados podrían sugerir que mediante ese aumento en la concentración de Cu y Zn que se da por medio de la suplementación de DHA, también podría aumentar la función antioxidante por el aumento de las enzimas antioxidantes dependientes del zinc (Cu/Zn SOD), por lo que esta protección antioxidante resultaría beneficiosa para la formación de hueso, al disminuir el daño oxidativo (Torsdottir et al. 2010; Filaire & Toumi 2012).

CONCLUSIONS

7 CONCLUSIONS

First conclusion

During gestation and due to the increased metabolic rate, an increased production of free radicals occurs. We found the highest concentrations of plasma peroxides in the mother during the gestation, as well as during labor. Delivery also implies a strong oxidative stress for both the mother who suffers pain and stress, and for the newborn, who is in the transition between the uterine hypoxic/anaerobic environment to an oxygen saturated atmosphere, leading to an increased peroxide production. In erythrocyte membrane high levels of peroxides are also shown during the postpartum/breastfeeding period in mothers as well as, at 2,5 months of the newborn's life.

Second conclusion

DHA supplementation during last trimester of pregnancy and lactation showed a moderated beneficial effect on oxidative stress in mothers during labor and breastfeeding period. Supplementation decreases oxidative stress in mother, supplementation prevents oxidative damage by increasing fat soluble vitamins in plasma and erythrocyte membrane, as well an increase in activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase in erythrocyte cytosol. DHA leads to a moderately higher level in plasma retinol, as well as an increased concentration in α -tocopherol and Coenzyme Q10 especially during the breastfeeding.

Third conclusion

DHA supplementation during the last trimester of pregnancy and lactation showed a beneficial effect on oxidative stress in the newborn at birth as well as during the first months of life. Supplementation decreased oxidative stress in the neonate, by increasing total antioxidant capacity in plasma and antioxidant enzymes activities such as superoxide dismutase and catalase in erythrocyte cytosol. Moreover, supplementation showed a beneficial effects preventing oxidative damage by increasing fat soluble vitamins in plasma and erythrocyte membrane. DHA leads to higher level in plasma retinol, as well as a higher concentration in α -tocopherol and Coenzyme Q10 in plasma and erythrocyte membrane of neonates. This increase shown in newborns was more evident compared to that observed in mothers.

Fourth conclusion

In mothers during labor bone formation seems to predominate, with high levels in ACTH, osteocalcin and OPG, along with lower levels of RANKL. In contrast, during lactation bone resorption predominates, with higher concentrations in osteopontin and RANKL and low levels of ACTH and OPG. Regarding to newborns, in general, an increased bone remodeling activity was observed, compared to the activity found in mothers. Thus, we observed PTH levels greatly reduced in umbilical cord blood, together with highest levels of RANKL in neonates at 2,5 months of life, and higher ACTH values in both, umbilical cord samples as well as at 2,5 months of newborn's life. Furthermore, we found highly decreased leptin levels in neonates at 2,5 months of life compared to those observed in umbilical cord.

Fifth conclusion

With regard to the effects of DHA supplementation in mothers, we could highlight the following ones: supplemented mothers showed higher OPN values during delivery as well as

greater PTH values during lactation, which leads to an increased calcium mobilization, probably towards breast milk. Moreover, DHA decreases IL-6 levels, diminishing the inflammatory process in mothers at delivery. Supplementation also increased levels of osteocalcin (OC) in mothers during labor, which might help to restore the bone mass lost during pregnancy.

Sixth conclusion

DHA supplementation in newborns led to specific results on bone biomarkers, which overall they appear to be beneficial for the neonate. From the standpoint of bone formation, supplementation increased osteocalcin, and decreased PTH levels at 2,5 months of life, besides it increased ACTH levels and decreased RANKL levels in umbilical cord vein; OPG levels were higher in cord artery and leptin levels were also increased in umbilical cord vein and artery. On the other hand, from the point of view of energy metabolism, DHA supplementation increased leptin and ACTH levels at birth, together with a decrease in the inflammatory signaling, decreasing IL-6 and TNF- α at birth and at 2.5 months of newborn's life.

Seventh conclusion

DHA supplementation during the last trimester of pregnancy and lactation showed a beneficial effect on the mineral content in erythrocyte cytosol, increasing calcium, phosphorus and iron content. These findings are especially important from the point of view of bone metabolism and erythropoiesis, as well as to ensure an adequate development of the newborn during the early stages of life. Supplementation also increased copper and zinc concentration, which might benefit antioxidant function by increasing copper and zinc dependent antioxidant enzymes such as Cu/Zn SOD, this antioxidant protection would benefit bone formation, since it reduces oxidative damage.

Overall conclusion

DHA supplementation during the last trimester of pregnancy and lactation could be postulated as a nutritional strategy to avoid and ameliorate oxidative stress in mother and neonates. Supplementation decreased oxidative damage, leading to higher levels in plasma retinol, as well as increased concentration in tocopherol and Coenzyme Q10, in both plasma and erythrocyte membrane samples in neonate and in mothers, especially during lactation. Supplementation also increased the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase in erythrocyte cytosol.

Moreover, DHA supplementation enhanced OPN and OC values at delivery, as it decreases IL-6 levels, and it enhanced PTH levels during lactation in mothers. In newborns, supplementation increased OC levels and decreased PTH levels at 2,5 months of life, besides it increased ACTH levels and decreased RANKL levels in umbilical cord vein; OPG levels were higher in cord artery and leptin levels were also increased in umbilical cord vein and artery. Therefore, DHA supplementation during the last trimester of pregnancy and lactation could also be postulated as a nutritional strategy to restore the bone mass lost during pregnancy in mothers and increase bone formation in neonate.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Meguid, M.H. et al., 2013. Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage. *Rheumatology International*, 33(3), pp.697–703.
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), pp.121–126.
- Agarwal, A., Gupta, S. & Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 3, p.28.
- De Aguiar Pastore SJ, Emilia de Souza FM, W.D., 2015. Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. *Clinical Nutrition*, 34, pp.359–366.
- Ahima, R.S. et al., 2000. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3), pp.263–307.
- Ahima, R.S. et al., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382(6588), pp.250–252.
- Albera, E. & Kankofer, M., 2009. Antioxidants in colostrum and milk of sows and cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(4), pp.606–611.
- Almeida, M. et al., 2007. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting β -catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), pp.27298–27305.
- Almonte, R.A. et al., 1999. Gestational magnesium deficiency is deleterious to fetal outcome. *Biology of the Neonate*, 76(1), pp.26–32.
- Amminger, G.P. et al., 2010. Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of general psychiatry*, 67(2), pp.146–154
- Anandarajah, A.P. & Schwarz, E.M., 2006. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: Mechanisms and potential clinical applications. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(2), pp.226–232.
- Anderson, P.J. & Doyle, L.W., 2008. Cognitive and Educational Deficits in Children Born Extremely Preterm. *Seminars in Perinatology*, 32(1), pp.51–58.
- Arab, K. et al., 2006. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *The British journal of nutrition*, 96(5), pp.811–819.

- Auestad N., I.S.M., 2000. Dietary n-3 Fatty Acid Restriction During Gestation in Rats: Neuronal Cell Body and Growth-Cone Fatty Acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71.
- A Lo, Sienna J, M.E. et al., 2012. The effects of maternal supplementation of polyunsaturated fatty acids on visual, neurobehavioural, and developmental outcomes of the child: a systematic review of the randomized trials. *Obstet Gynecol Int*.
- A. M. Coates, C. M. Milte, J. D. Buckley, A.F. and P.R.C.H., 2011. Reduced production of inflammatory cytokines accompanies fish oil-induced increases of the omega-3 index, 3. *5th Annual Scientific Meeting of Nutrition Society of Australia and Nutrition Society of New Zealand, Queenstown, New Zealand*.
- Bai, X. et al., 2005. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *The Journal of biological chemistry*, 280(17), pp.17497–17506.
- Barba EJR, 2011. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. *Rev Mex Patol Clin*, 58, pp.113–137.
- Barbour, K.E. et al., 2012. Inflammatory markers and the risk of hip fracture: the Women's Health Initiative. *J Bone Miner Res*, 27(5), pp.1167–1176.
- Barbour, K.E. et al., 2012. The effects of adiponectin and leptin on changes in bone mineral density. *Osteoporosis International*, 23(6), pp.1699–1710.
- Barden, A.E. et al., 2004. *Fish oil supplementation in pregnancy lowers F2-isoprostanes in neonates at high risk of atopy.*
- Bazan, N.G., 2006. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, 29(5), pp.263–271.
- Bernardi, F. et al., 2008. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 34(6), pp.948–951.
- Bernardi, F.C.B. et al., 2012. Oxidative damage, inflammation, and toll-like receptor 4 pathway are increased in preeclamptic patients: A case-control study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Bhagavan, H.N. & Chopra, R.K., 2007. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion*, 7(SUPPL.).
- Birch, E.E. et al., 1992. Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33(11), pp.3242–3253.
- Biri, A. et al., 2006. Investigation of Free Radical Scavenging Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Human Placental Tissues With Miscarriage. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13(5), pp.384–388.

- Bonewald, L.F., 2011. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), pp.229–238.
- Bonnet, N. & Ferrari, S.L., 2011. Effects of long-term supplementation with omega-3 fatty acids on longitudinal changes in bone mass and microstructure in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(7), pp.665–672.
- Boulis TS, Rochelson B, Novick O, Xue X, Chatterjee PK, Gupta M, Solanki MH, Akerman M, M.C., 2014. production and oxidative stress in a mouse model of preterm labor. *J Perinat Med*, 42(6).
- Bouwstra, H. et al., 2005. *Long-chain polyunsaturated fatty acids and neurological developmental outcome at 18 months in healthy term infants.*,
- Bradbury, J., 2011. Docosahexaenoic acid (DHA): An ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients*, 3(5), pp.529–554.
- Brand, A. et al., 2008. Docosahexaenoic acid-dependent iron accumulation in oligodendroglia cells protects from hydrogen peroxide-induced damage. *Journal of Neurochemistry*, 105(4), pp.1325–1335.
- Brown, R.K. & Kelly, F.J., 1994. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res*, 36(4), pp.487–493.
- Buck, A.C., Davies, R.L. & Harrison, T., 1991. The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis. *The Journal of urology*, 146(1), pp.188–194.
- Burton, G.J. & Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25(3), pp.287–299.
- Cai, F. et al., 2013. Interaction of ω -3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, pp.3–9.
- Calder, P.C., 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical science (London, England : 1979)*, 107(1), pp.1–11.
- Calder, P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 83(6 Suppl), p.1505S–1519S.
- Calder, P.C., 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(3), pp.197–202.
- Cambonie, G. et al., 2007. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(3), pp.R1236–R1245.
- Campfield, L.A., Smith, F.J. & Burn, P., 1998. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*, 280(5368), pp.1383–1387.

- Capellán, 2000. Léptina y Hueso. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 9(5), p.172.
- Carlson, S.E., 2009. Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. *The American journal of clinical nutrition*, 89(2), p.678S–84S.
- Carrepeiro, M.M. et al., 2011. Effect of n-3 fatty acids and statins on oxidative stress in statin-treated hypercholesterolemic and normocholesterolemic women. *Atherosclerosis*, 217(1), pp.171–178.
- Casado-Díaz, A. et al., 2013. The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: Potential implication in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 24(5), pp.1647–1661.
- Cenci, S. et al., 2003. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), pp.10405–10410.
- Cervantes-Munguía, R. et al., 2006. Retinopathy of prematurity and oxidative stress. *Anales de pediatría (Barcelona, Spain : 2003)*, 64(2), pp.126–131.
- Cester, N. et al., 1994. Pregnancy induced hypertension: a role for peroxidation in microvillus plasma membranes. *Mol. Cell Biochem.*, 131(2), pp.151–155.
- Chamorro López, L. et al., 2013. Análisis de la composición de ácido araquidónico y ácidos grasos omega-3 en plasma, membrana eritrocitaria y células inmunitarias de pacientes con cirrosis. *Revista del Laboratorio Clínico*, 6(1), pp.10–17.
- Chang, I.C. et al., 2010. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporosis International*, 21(8), pp.1401–1409.
- Chen, H.-T. et al., 2012. Hepatocyte Growth Factor Increases Osteopontin Expression in Human Osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 7(6), p.e38378.
- Chow, C.K., 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 11(2), pp.215–232.
- Christmann, V. et al., 2013. Early Postnatal Calcium and Phosphorus Metabolism in Preterm Infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, pp.1–25.
- Clowes, J.A., Riggs, B.L. & Khosla, S., 2005. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunological Reviews*, 208, pp.207–227.
- Coetzee, M., Haag, M. & Kruger, M.C., 2007. Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid, prostaglandin E2 and parathyroid hormone on osteoprotegerin and RANKL secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), pp.54–63.
- Coetzer, H. et al., 1994. Calcium transport by isolated brush border and basolateral membrane vesicles: role of essential fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*,

- 50, pp.257–266. Confavreux, C.B., 2011. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney international. Supplement*, (121), pp.S14–S19.
- Cons Molina, 2003. Marcadores Bioquímicos del Remodelado Óseo. *Metabolismo óseo y mineral*, 1(1), pp.91–98.
- Cordero, M.D. et al., 2009. Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(3), pp.329–337.
- Costantine, M.M. & Weiner, S.J., 2009. Effects of antenatal exposure to magnesium sulfate on neuroprotection and mortality in preterm infants: a meta-analysis. *Obstetrics and gynecology*, 114(2 Pt 1), pp.354–364.
- Courville, A.B., Harel, O. & Lammi-Keefe, C.J., 2011. Consumption of a DHA-containing functional food during pregnancy is associated with lower infant ponderal index and cord plasma insulin concentration. *British Journal of Nutrition*, 106(02), pp.208–212.
- DeFilippis, A.P. & Sperling, L.S., 2006. Understanding omega-3's. *American Heart Journal*, 151(3), pp.564–570.
- Demirturk F, Ates O, Gunal O, Bozkurt N, Aysal T, N.M., 2014. IL-6 gene promoter polymorphisms: genetic susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Bratisl Lek Listy*, 115(8).
- Díaz-Castro, J. et al., 2014. The timing of cord clamping and oxidative stress in term newborns. *Pediatrics*, 134(2), pp.257–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022744>.
- Drevon C.A., Helland I., Smith L., Blomén B., Saarem K., S.O.D. et al., 2008. Effects of Supplementating Pregnant and Lactating Mothers with n-3 Very-Long-Chain Fatty Acids on Children's IQ and Body Mass Index at 7 Years of Age. *Pediatrics*, 122(2), pp.472–479.
- Ducy, P. et al., 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100(2), pp.197–207.
- Dunstan, J.A. et al., 2008. Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 93(1), pp.F45–F50.
- Elahe Abedi & Mohammad Ali Sahari., 2014. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science & Nutrition*, 2(5).
- Elejalde Guerra, J.I., 2001. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain : 1984)*, 18(6), pp.326–335.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I. et al., 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.*, 11(2).
- Ferrer Cañabate J., Tovar I., M.P., 2002. Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el Futuro del Metabolismo Óseo? *Anales de Medicina Interna*, 19(3), pp.385–388.

- Filaire, E. & Toumi, H., 2012. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy? *Joint Bone Spine*, 79(4), pp.341–346.
- Franco L., O.M., 2010. Marcadores Bioquímicos del Remodelado Óseo. *Rev. Estomatología*, 18(1), pp.30–34.
- Friel, J.K. et al., 2007. Impact of iron and vitamin C-containing supplements on preterm human milk: In vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), pp.1591–1598.
- Frost, H.M., 1997. On our age-related bone loss: insights from a new paradigm. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12(10), pp.1539–1546.
- Fuller, K. et al., 2002. TNF?? potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*, 143(3), pp.1108–1118.
- Fulzele, K. et al., 2010. Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell*, 142(2), pp.309–319.
- Furuhjelm, C. et al., 2009. Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 98(9), pp.1461–1467.
- Gambling, L., Kennedy, C. & McArdle, H.J., 2011. Iron and copper in fetal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(6), pp.637–644.
- Gandhi, A. et al., 2005. The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, 37(4), pp.482–490.
- 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, G.A., 2012. Does consumption of two portions of salmon per week enhance the antioxidant defense system in pregnant women? *Antioxid Redox Signal*. 2012, 15(16).
- Garrel, C. et al., 2012. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(1), pp.123–131.
- Georgeson, G.D. et al., 2001. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *European Journal of Pediatrics*, 160(8), pp.478–482.
- Gertner, J.M. et al., 1986. Pregnancy as state of physiologic absorptive hypercalciuria. *The American journal of medicine*, 81(3), pp.451–456.
- Gil, A., 2010. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. In *Tratado de Nutrición*. pp. 232–234.
- Gil-Campos M., D.J., 2010. Importancia del Ácido Docosahexaenoico (DHA): Funciones y Recomendaciones para su Ingesta en la Infancia. *Anales de Pediatría*, 73(3).

- Gilroy, D.W. et al., 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature medicine*, 5(6), pp.698–701.
- Gitto, E. et al., 2002. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biology of the Neonate*, 81(3), pp.146–157.
- Gitto, E. et al., 2009. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 46(2), pp.128–139.
- De Giuseppe, R., Roggi, C. & Cena, H., 2014. n-3 LC-PUFA supplementation: Effects on infant and maternal outcomes. *European Journal of Nutrition*, 53(5), pp.1147–1154.
- Glerean, 2000. Plantalech L. Osteoporosis en Embarazo y Lactancia. *Medicina (Buenos Aires)*, 60, pp.973–981.
- Le Goff, B. et al., 2010. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 77(3), pp.201–205.
- Goldenberg, R.L. et al., 1995. *The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome.*,
- González-Pérez, A. et al., 2006. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), pp.2537–2539.
- Gould JF. Smithers LG. Makrides M., 2013. The effect of maternal omega-3 (n-3) LCPUFA supplementation during pregnancy on early childhood cognitive and visual development: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 97(3), pp.531–44.
- Graham, S. et al., 2011. Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 301(2), pp.C304–C315.
- Gravallese, E.M. et al., 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, 43(2), pp.250–258. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693863>.
- Green, K.H., Wong, S.C.F. & Weiler, H.A., 2004. The effect of dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on femur mineral density and biomarkers of bone metabolism in healthy, diabetic and dietary-restricted growing rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 71(2), pp.121–130.
- Griel, A.E. et al., 2007. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutrition journal*, 6, p.2.

- Grundt, H. et al., 2003. Reduction in homocysteine by n-3 polyunsaturated fatty acids after 1 year in a randomised double-blind study following an acute myocardial infarction: no effect on endothelial adhesion properties. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 33(2), pp.88–95.
- Haag, M. et al., 2003. Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. In *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. pp. 423–429.
- Hajjaji, N., Besson, P. & Bougnoux, P., 2012. Tumor and non-tumor tissues differential oxidative stress response to supplemental DHA and chemotherapy in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(1), pp.17–23.
- Halliwell, B. et al., 1992. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS letters*, 313(1), pp.62–66.
- Hamrick, M.W. et al., 2005. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(6), pp.994–1001.
- Handschin, A.E. et al., 2007. Leptin increases extracellular matrix mineralization of human osteoblasts from heterotopic ossification and normal bone. *Annals of plastic surgery*, 59(3), pp.329–333.
- Harris, W.S., Dayspring, T.D. & Moran, T.J., 2013. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new developments and applications. *Postgrad Med*, 125(6), pp.100–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24200766>.
- Hasnain, B.I. & Mooradian, A.D., 2004. Recent trials of antioxidant therapy: What should we be telling our patients? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 71(4), pp.327–334.
- Helland, I.B. et al., 2008. Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age. *Pediatrics*, 122(2), pp.e472–e479.
- Hempstock, J. et al., 2003. The Contribution of Placental Oxidative Stress to Early Pregnancy Failure. *Human Pathology*, 34(12), pp.1265–1275.
- Hirrlinger, J. et al., 2000. Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Developmental Neuroscience*, 22(5-6), pp.384–392.
- Högström, M., Nordström, P. & Nordström, A., 2007. n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 Study. *The American journal of clinical nutrition*, 85(3), pp.803–807.
- Holloway, W.R. et al., 2002. Leptin inhibits osteoclast generation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(2), pp.200–209.
- Hosseini-Nezhad, A. et al., 2011. The influence of folic acid supplementation on maternal and fetal bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29(2), pp.186–192.

- Huffman, S.L. et al., 2011. Essential fats: How do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Maternal and Child Nutrition*, 7(SUPPL. 3), pp.44–65.
- Imdad, A. et al., 2011. Impact of vitamin A supplementation on infant and childhood mortality. *BMC public health*, 11 Suppl 3, p.S20.
- Imhoff-Kunsch, B. et al., 2011. Docosahexaenoic acid supplementation from mid-pregnancy to parturition influenced breast milk fatty acid concentrations at 1 month postpartum in Mexican women. *The Journal of nutrition*, 141(2), pp.321–326.
- Indumati, V., Patil, V.S. & Jaiikhani, R., 2007. Hospital based preliminary study on osteoporosis in postmenopausal women. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 22(2), pp.96–100.
- Innis, S.M. & Friesen, R.W., 2008. Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *The American journal of clinical nutrition*, 87(3), pp.548–557.
- Isales, C.M., Zaidi, M. & Blair, H.C., 2010. ACTH is a novel regulator of bone mass. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 110–116.
- Iwami, D. et al., 2011. Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *International Immunopharmacology*, 11(3), pp.384–389.
- Iwami, K. & Moriyama, T., 1993. Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem*, 25(11), pp.1631–1635.
- Iwami-Morimoto, Y., Yamaguchi, K. & Tanne, K., 1999. Influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid on experimental tooth movement in rats. *Angle Orthod*, 69(4), pp.365–371.
- Iwamoto, J. et al., 2012. Five-year follow-up of a woman with pregnancy and lactation-associated osteoporosis and vertebral fractures. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 8, pp.195–199.
- Izabela Korczowska, Jan Krzysztof Lacki, and P.H., 2013. Influence of Infliximab on Cytokines Network and Markers of Bone Remodeling in Rheumatoid Arthritis Patients. *Yonsei Med J*, 54(1), pp.183–188.
- Janghorbani, M. et al., 2006. Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study. *Diabetes Care*, 29(7), pp.1573–1578.
- Jauniaux, E., Poston, L. & Burton, G.J., 2006. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update*, 12(6), pp.747–755.
- Javier Díaz-Castro, Jesus Florido, Naroa Kajarabille, Sonia Prados & Catalina de Paco, Olga Ocon, Mario Pulido-Moran, and J.J.O., 2015. A New Approach to Oxidative Stress and Inflammatory Signaling during Labour in Healthy Mothers and Neonates. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.8.

- Jensen, C.L. et al., 2005. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), pp.125–132.
- Jose Antonio Hurtado, Carmen Iznola, Manuela Peña, Josefa Ruíz, Luis Peña-Quintana, Naroa Kajarabille, Yessica Rodriguez-Santana, Pablo Sanjurjo, Luis Aldámiz-Echevarría, Julio Ochoa, F.L.-V., 2015. Fatty acids distribution and visual evoked potentials in healthy term neonates after mother intake of a fish oil enriched dairy drink: a multicenter randomized trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.
- Judge, M.P., Harel, O. & Lammi-Keefe, C.J., 2007. Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: Benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), pp.1572–1577.
- Kacerovsky, M. et al., 2014. Bedside assessment of amniotic fluid interleukin-6 in preterm prelabor rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*.
- Kajarabille, N. et al., 2013. A new insight to bone turnover: Role of ω -3 polyunsaturated fatty acids. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kawai, V.K. et al., 2012. Effects of anti-tumor necrosis factor α agents on bone. *Current Opinion in Rheumatology*, 24(5), pp.576–585.
- Kelly, F.J. & Lubec, G., 1995. Hyperoxic injury of immature guinea pig lung is mediated via hydroxyl radicals. *Pediatric research*, 38(3), pp.286–291.
- Kelly, O. et al., 2003. The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *The British journal of nutrition*, 90(4), pp.743–750.
- Kemink, S.A.G. et al., 2000. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus: Prevalence and aspects of pathophysiology. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(5), pp.295–303.
- Klopocki, E. et al., 2010. Deletion and Point Mutations of PTHLH Cause Brachydactyly Type E. *American Journal of Human Genetics*, 86(3), pp.434–439.
- Kohlmeier, L. & Marcus, R., 1995. *Calcium disorders of pregnancy*.
- Koletzko, B. et al., 2008. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med*, 36(1), pp.5–14.
- Korotkova, M. et al., 2004. Dietary n-6:n-3 fatty acid ratio in the perinatal period affects bone parameters in adult female rats. *The British journal of nutrition*, 92(4), pp.643–648.

- Kossenjans, W. et al., 2000. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(4), pp.H1311–H1319.
- Kousteni, S., 2011. FoxOs: Unifying links between oxidative stress and skeletal homeostasis. *Current Osteoporosis Reports*, 9(2), pp.60–66.
- Kovacs, C.S., 2011a. Bone development in the fetus and neonate: Role of the calciotropic hormones. *Current Osteoporosis Reports*, 9(4), pp.274–283.
- Kovacs, C.S., 2013. Bone metabolism in the fetus and neonate. *Pediatric Nephrology*.
- Kovacs, C.S., 2011b. Calcium and bone metabolism disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(4), pp.795–826.
- Krauss, R.M. et al., 2000. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 31(11), pp.2751–2766.
- Kruger, M.C. et al., 2010. Long-chain polyunsaturated fatty acids: Selected mechanisms of action on bone. *Progress in Lipid Research*, 49(4), pp.438–449.
- Kruger, M.C. & Schollum, L.M., 2005. Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(5), pp.327–334.
- Lafita, 2003. Fisiología y Fisiopatología Ósea. *Anales Sistema Sanitario Navarra*, 26(3), pp.7–17.
- Larque, E. et al., 2012. Omega 3 fatty acids, gestation and pregnancy outcomes. *Br J Nutr*, 107 Suppl , pp.S77–84.
- Larqué, E. et al., 2011. Placental transfer of fatty acids and fetal implications. In *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Lecke, S.B., Morsch, D.M. & Spritzer, P.M., 2011. Leptin and adiponectin in the female life course. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(5), pp.381–387.
- Levy, B.D. et al., 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology*, 2(7), pp.612–619.
- Lewin G.A., Schachter H.M., Yuen D., Merchant P., Mamaladze V., T.A. et al., 2005. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Child and Maternal Health. *Agency for Healthcare Research and Quality*, 118.
- LF., B., 2005. Generation and function of osteocyte dendritic processes. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.*, 5(4), pp.321–4.

ANEXOS I

9. ANEXO I

9.1. ENCUESTA NUTRICIONAL

INSTRUCCIONES PARA RELLENAR ESTA ENCUESTA:

1. Esta encuesta consiste en recordar y/o anotar todos los alimentos consumidos durante 4 días, tres de los cuales pueden ser cualquier día entre el lunes y el viernes, y el cuarto debe de ser un día de fin de semana (sábado o domingo).
2. Para cada día debe de rellenar una tabla distinta, indicando en primer lugar la fecha y el día de la semana al que se refiere.
3. La tabla está dividida en 5 apartados: desayuno, media mañana, comida, merienda y cena.
4. La tabla consta de 4 columnas:

COLUMNA 1: ALIMENTOS

- En cada fila de esta columna deberá anotar el nombre de los alimentos y bebidas consumidos, sin olvidar los que se hayan tomado entre horas (refrescos, tapas, caramelos,...). Indicar sólo un alimento por fila.
- Debe de anotar también el tipo de alimento.

Ejemplos

- Si consume carne, indique si es cerdo, ternera, pollo (pechuga, muslo),...
- Si consume pescado, indique si son boquerones, merluza, sardinas,...
- Nombre de las verduras: tomates, zanahorias, coliflor,...
- Tipo de aceite: oliva, girasol,...
- Pan blanco, integral, de molde,...
- Indique también si le echa azúcar, aceite,...
- Si es un alimento elaborado con varios ingredientes, indique el nombre de todos los ingredientes que lo componen, cada uno de los ingredientes

debe ir en una fila diferente:

Ejemplo:

- Si usted come una ensalada con lechuga, tomate, cebolla, pepino,... deberá indicar en una fila la lechuga, en otra fila el tomate,... y anotar las cantidades de cada ingrediente por separado.

COLUMNA 2: **PREPARACIÓN**

- En esta columna deberá indicar la forma de preparación de los alimentos indicados en la columna anterior: Ejemplo: crudo, a la plancha, cocido, al horno, frito,...

COLUMNA 3: **MEDIDA CASERA**

- Indique la cantidad del alimento consumido utilizando una medida casera como puedan ser:
 - Cucharita de postre
 - Cuchara
 - Vaso pequeño
 - Vaso
 - Numero o porción de una pieza y su tamaño: (Ejemplo: un plátano, un filete pequeño, un cuarto de cebolla...)

COLUMNA 4: **CANTIDAD EN GRAMOS:**

- En esta columna debe de indicar, si la conoce, la cantidad en gramos del alimento ingerido. Para ello puede ayudarse de la cantidad indicada en el envase. Es importante que al menos rellene una de estas dos últimas columnas para cada alimento o ingrediente.

Ejemplo:

ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gramos)
Comida:			
Patatas	fritas	Medio plato	

Filete de pechuga de pollo	plancha	Dos filetes	250 gramos
Pan blanco		Un bollo	60 gramos
Yogur natural azucarado		Un yogur	125 gramos
Melocotón		Una pieza	

5. Al final de cada tabla encontrará un casillero de **Incidencias** donde debe anotar si a lo largo de ese día ha tomado alguna medicación fuera de la habitual o si sufre alguna dolencia leve como pueda ser un dolor de cabeza, dolor de estómago...
6. Una vez finalizada toda la encuesta, introducir en el sobre adjunto y enviar por correo.

Muchas gracias por su colaboración en este estudio.

DÍA 1	Fecha:		
	Día de la semana:		
ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gramos)
Desayuno:			
Media mañana:			
Comida:			
Merienda:			
Cena:			
Incidencias:			

DÍA 2	Fecha:		
	Día de la semana:		
ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gramos)
Desayuno:			
Media mañana:			
Comida:			
Merienda:			
Cena:			
Incidencias:			

DÍA 3	Fecha:		
	Día de la semana:		
ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gramos)
Desayuno:			
Media mañana:			
Comida:			
Merienda:			
Cena:			
Incidencias:			

DÍA 4	Fecha:		
	Día de la semana:		
ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gramos)
Desayuno:			
Media mañana:			
Comida:			
Merienda:			
Cena:			
Incidencias:			

9.2. EVALUACIÓN DE LA INGESTA NUTRICIONAL

DATOS PERSONALES:

Código:

Nombre:

Edad:

Sexo: (H-Hombre / M-Mujer):

Teléfono:

1. ¿Alguno de los días recogidos en la encuesta comió o cenó fuera de casa?

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
Si, una vez.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si, dos veces	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
No	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. ¿Considera que la dieta consumida en los días indicados fue la habitual?

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
Sí, fue un día habitual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La comida fue especial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La cena fue especial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Todas las comidas fueron especiales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. ¿Realiza en la actualidad alguna dieta o régimen?

┆ Si

┆ No

En caso afirmativo indique el motivo:

4. ¿Está tomando vitaminas o suplementos dietéticos?

┆ Si

┆ No

En caso afirmativo indique el nombre y la cantidad diaria:

5. Indique el tipo de aceite que consume para:

	Oliva virgen	Oliva	Girasol	Otros*
Crudo: ensaladas, aliños,...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Para Freír	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

* **Indique el tipo de aceite:**

9.3. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Durante el último año, ¿con qué frecuencia consumió los siguientes alimentos?

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DIA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
CARNES					
Pollo/ aves					
Ternera/toro					
Cerdo					
Cordero					
Conejo					
Jamón serrano					
Jamón York					
Embutidos (chorizo, salchichas, mortadela, chopped, etc.)					
Hígado, riñón, corazón, cesos					
PESCADO Y MARISCO					
Pescado blanco (merluza, lenguado, rape, etc.)					
Pescado azul (atún, sardina, boquerón, caballa, aguja, etc.)					
Pescado en conserva					
Calamares, chopitos, pulpo, sepia, choco, etc.					
Mariscos (gambas, langostinos, almejas, mejillones, etc.)					
Peces de río (trucha, salmón, etc.)					
HUEVOS					
Huevo frito, cocido, tortilla, etc.					
LEGUMBRES					
Lentejas					
Garbanzos					
Judías blancas/chícharos					
Guisantes					
CEREALES					
Pan blanco					
Pan integral					

Pan de molde					
Arroz (todas sus modalidades)					
Pasta (fideos, macarrones, pizza, etc.)					
Patatas (fritas, cocidas, asadas, en tortilla, etc.)					
LÁCTEOS					
Leche entera					
Leche semidesnatada					
Leche desnatada					
Leche condensada					
Yogurt entero					
Yogurt desnatado					
Natillas/flan					
Queso fresco					
Queso Manchego, bola					
Queso en porciones					
Queso fundido					
Helados					
GRASAS					
Mantequilla					
Margarina					
Tocino, manteca					
Mayonesa					
Aceite de oliva virgen					
Aceite de oliva refinado (no virgen)					
Aceite de orujo (oliva)					
Aceite mezcla virgen-refinado					
Aceite de semillas (girasol, maíz, otros)					
Aceitunas					
VERDURAS					
Lechuga					
Tomate (natural, en ensalada, frito, etc.)					
Pimiento (natural, en ensalada, frito, etc.)					
Zanahoria					
Judías verdes					
Cebolla					

Col/coliflor					
Acelgas/espinacas					
Espárragos					
Habas frescas					
Champiñón y setas					
FRUTAS					
Manzana					
Peras					
Naranjas/mandarinas					
Plátanos					
Melocotón					
Fresas					
Uvas					
Melón/sandía					
En conserva					
DULCES Y PASTELES					
Azúcar/miel					
Mermelada					
Chocolate/cacao					
Galletas/pastas/pasteles/bollería/dulces/caramelos					
BEBIDAS					
Zumos de frutas envasados					
Refrescos					
Cerveza/sidra					
Vino					
Ron/Ginebra/Coñac/Anís/Whisky/licores					
FRUTOS SECOS					
Almendras, avellanas, cacahuetes, nueces, etc.					

CONSUMO DE ACEITE

Tipo de aceite:

Compra semanal media (litros):

Nº miembros familia

CONSUMO DE PAN

Tipo:

Compra por día (g):

Sobrante medio por día (g):

Comprobar si la cantidad sobrante del día la aprovecha para el desayuno del día siguiente.

CONSUMO DE TABACO

1. ¿Usted fuma actualmente?

1.1. Sí fumo (al menos uno al día).....

(se incluirán las personas que hayan dejado de fumar dos meses antes de la entrevista)

1.2. No fumo actualmente, pero fumé tiempo atrás.....

1.3. No fumo actualmente, no he fumado nunca.....

2. ¿cuál es el tipo de tabaco que fuma habitualmente? (respuesta múltiple)

2.1. Rubio

2.2. Negro

2.3. Puros

2.4. En pipa

3. Si fuma cigarrillos, ¿cuántos fuma al día?.....

4. Si fuma puros, ¿cuántos a la semana?.....

5. Si fuma pipa, ¿cuánto tabaco (gramos/semana)?.....

ACTIVIDAD FÍSICA

1. EN EL TRABAJO

Quisiéramos saber el tipo y la cantidad física que implica su trabajo. Señale cuál de las 4 posibilidades siguientes se corresponde mejor con su trabajo actual: (si tiene más de un trabajo, indique al que más horas por semana dedica, Si está jubilado o no trabaja actualmente, deje la pregunta en blanco).

1.1. Ocupación sedentaria.....

Usted pasa la mayor parte de su tiempo sentado, por ejemplo trabajo de oficina, etc.

1.2. Ocupación que implica estar de pie.....

Usted pasa la mayor parte de su tiempo de pie o andando. Su trabajo no requiere un esfuerzo físico intenso (por ejemplo, dependiente de una tienda, peluquero, guarda de seguridad, etc.)

1.3. Trabajo manual.....

Implica cierto esfuerzo físico que puede incluir el manejo de objetos pesado y la utilización de herramientas (por ejemplo, fontanero, electricista, carpintero, etc.)

1.4 Trabajo manual pesado.....

Implica una actividad física muy vigorosa que incluya el manejo de objetos muy pesados (por ejemplo, estibador, albañil, minero, peón de construcción, etc.)

2. OTRAS ACTIVIDADES

En una semana habitual durante el año pasado, ¿cuántas horas dedicó a cada una de las actividades siguientes?

2.1. Caminar (incluye desplazamientos al trabajo y tiempo libre).

Horas/semana (Verano)..... Horas/semana (Invierno).....

2.2. Ir en bicicleta (incluye desplazamientos al trabajo y tiempo libre).

Horas/semana (Verano)..... Horas/semana (Invierno).....

2.3. Ejercicio físico (fútbol, aerobio, natación, tenis, gimnasia, correr, etc.)

Horas/semana (Verano)..... Horas/semana (Invierno).....

2.4. Trabajo de la casa (limpiar, lavar, cocinar, cuidar de los niños, etc.)

Horas/semana.....

2.5. ¿Cuántos pisos de escaleras sube cada día?.....pisos por día

2.6. Otras actividades (jardinería, bricolaje, etc.)

Horas/semana.....

9.4 HOJA INFORMATIVA PARA LA VOLUNTARIA

Título del proyecto: “INFLUENCIA DE LA GRASA ALIMENTARIA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA Y SOBRE EL DESARROLLO DEL RECIÉN NACIDO”

Objetivo: conocer el perfil lipídico más adecuado para la dieta de una mujer durante el embarazo y la lactancia, así como, evaluar los efectos beneficiosos, para la madre y para el niño, de un suplemento de DHA en dicha dieta.

Metodología: consumir desde el 6º mes de embarazo y hasta el final de la lactancia una dieta equilibrada que incluirá 500mL/día (2 vasos al día) de un producto lácteo desnatado enriquecido en DHA o del mismo producto lacteo desnatado sin DHA. Se tomarán 4 muestras de sangre (5 mililitros) de la madre (inicio, parto, 3 meses, 6 meses), 1 muestra de leche materna (10 mililitros) en cada mes de lactancia, 1 muestra de sangre de cordón umbilical, 1 muestra de placenta y 3 muestras de sangre del niño (5 mL a los 3, 6 y 12 meses de vida). Se hará una revisión en el segundo trimestre del embarazo y otra después de la semana 37. Se harán revisiones mensuales del niño hasta que cumpla el primer año de edad y que incluirán el seguimiento de su desarrollo motor y cognitivo. Las muestras serán procesadas y conservadas por los laboratorios participantes (Instituto de Nutrición de Granada, Hospital de Cruces de Baracaldo y Puleva Biotech S. A.) con la finalidad de obtener diversos parámetros de interés para el estudio. Una vez acabado el mismo, todos los laboratorios se comprometen a la destrucción de las mismas por los métodos adecuados. Por último se realizarán diferentes encuestas a lo largo del estudio para evaluar el seguimiento de la dieta por parte de cada voluntaria.

Beneficios esperados: los beneficios, para la madre y para el niño, del consumo de una dieta equilibrada durante el embarazo y la lactancia son ampliamente conocidos.

Incomodidades y riesgos derivados del estudio: al proceder a la extracción de las muestras de sangre la voluntaria podría notar síntomas como picor, rubor, escozor, dolor etc... en la zona del pinchazo. No se espera ningún otro riesgo o incomodidad.

Posibles acontecimientos adversos: no se esperan.

Carácter voluntario de su participación: la participación es voluntaria así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación participante-investigador.

Personas que tendrán acceso a los datos: los datos serán tratados según establece la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Los investigadores de este estudio garantizan la confidencialidad de los datos. Cada voluntario contará con una clave de identificación y sólo tendrán acceso a sus datos los responsables del mismo: Dr.José Mataix, Dr.José Antonio Hurtado, Dr.Pablo Sanjurjo, Dr.Luis Peña. Todos mantendrán una confidencialidad absoluta.

Modo de compensación económica: se hará un seguimiento exhaustivo de la embarazada y de su hijo, que incluirá tests de desarrollo motor y cognitivo que no se llevan a cabo de forma rutinaria. Además las analíticas de la madre y de su hijo le serán entregadas a la madre.

Cualquier aspecto que establezca dudas y preguntas para el participante, podrá consultarse antes, durante y después del estudio a los organizadores del mismo (teléfonos 958-240331 y 958-240398).

9.5. CONSENTIMIENTO INFORMADO (HOJA DE ADMISION EN EL ESTUDIO)

Título del proyecto: “INFLUENCIA DE LA GRASA ALIMENTARIA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA Y SOBRE EL DESARROLLO DEL RECIÉN NACIDO”

Yo,.....
..... (Nombre y apellidos de la voluntaria)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con los responsables sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que me puedo retirar del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

• Fecha:

Firmado: