

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

“Efectos a largo plazo de la suplementación con aceite de pescado y 5-metil-tetrahidrofolato durante la gestación sobre la atención en los hijos hasta los 9 años de edad”

“Long-term effects of fish oil and 5-methyl-tetrahydrofolate supplementation during pregnancy on their offspring’s attention up to 9 years”

TESIS DOCTORAL

Jeanette Angela Muñoz Machicao

Granada, 9 de Noviembre de 2020

PROGRAMA DE DOCTORADO
“MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA”

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Jeanette Angela Muñoz Machicao
ISBN: 978-84-1306-726-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/65388>

Tesis Doctoral

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del Proyecto Europeo NUTRIMENTHE: “Effect of diet on the mental performance of children” del 7º Programa Marco (FP7/2008-2013), Grant Agreement nº 212652. El Proyecto Europeo NUTRIMENTHE ha sido coordinado por la Profesora Cristina Campoy de la Universidad de Granada, directora de la presente Tesis Doctoral. También se han tomado datos y resultados previos obtenidos en el proyecto NUHEAL, que fueron financiados por los proyectos Europeos NUHEAL del 5º Programa Marco (Programe BIOMED QRLT-1999, Grant Agreement nº 00888) y EARNEST del 6º Programa Marco (FOOD-CT-2005 - Grant Agreement nº 007036). La Profesora Cristina Campoy en ambos casos ha sido investigadora principal de estos proyectos en la Universidad de Granada. Los datos que se presentan no reflejan necesariamente el punto de vista de la Comisión Europea y de ningún modo anticipan políticas futuras en esta área.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



Tesis Doctoral

Memoria presentada por el doctorando

Jeanette Angela Muñoz Machicao

para optar al grado de Doctor

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por:

Prof. Dra. Dña. Cristina Campoy Folgoso

Departamento de Pediatría

Universidad de Granada

Prof. Dr. D. Miguel Pérez-García

Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico

Universidad de Granada

Tesis Doctoral

DEDICATORIA

Para mi Abril.

Tesis Doctoral

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis tutores Cristina y Miguel, por la incansable supervisión y apoyo incondicional. Al profesor Andrés Catena por su esfuerzo y la transmisión de sus amplios conocimientos. Ellos han hecho posible el trabajo que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral.

A mi familia, mi roca y sustento diarios, Abril; Roberto, Miguel, Jenaette, Claudia, Miguelito, Nicolás, Esteban, Gabriel, Celeste, Bernardo y Rosario, Walter e Inés, papa Miguel y Teresa.

A los compañeros del Centro EURISTIKOS, a todas las personas que me acompañaron en este trayecto de mi vida y a las madres y niños participantes en el estudio NUHEAL....Muchas Gracias!

Tesis Doctoral

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	17
RESUMEN	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 Definición Atención.....	25
1.2 Sistema Atencional de Posner.....	26
1.3 Clasificación y subtipos de atención.....	27
1.4 Ácidos grasos poliinsaturados y Desarrollo Cognitivo.....	31
1.5 Papel de los ácidos grasos poliinsaturados durante el embarazo y la lactancia sobre el neurodesarrollo de los niños.....	32
1.6 Papel de los ácidos grasos poliinsaturados en la niñez sobre el neurodesarrollo y la conducta.....	39
1.7 Papel del ácido fólico durante la vida precoz en el desarrollo cognitivo y de la conducta.....	43
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1 Diseño del estudio.....	53
3.2 Participantes del presente estudio	54
3.3 Variables confusoras.....	55
3.4 Análisis Bioquímicos.....	57
3.5 Análisis Genético: Polimorfismo MTHFR C677T.....	58
3.6 Evaluación neurológica.....	58
3.7 Estudio neurofisiológico	62
3.8 Metodología Estadística	65
4. RESULTADOS	69
4.1 Estudio 1. Atención a los 7.5 y 9 años de edad, en niños cuyas madres fueron suplementadas durante la gestación con aceite de pescado y/o 5-MTHF.....	71
4.2 Estudio 2. Efectos beneficiosos a largo plazo de la suplementación materna durante la gestación con ácido fólico y ácidos grasos sobre el Sistema Atencional en los hijos a los 8.5 años de edad.....	84
5. DISCUSIÓN	97
5.1 Estudio 1	99
5.2 Estudio 2	101
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXO I	125

Tesis Doctoral

ABREVIATURAS

AA= Ácido Araquidónico
ALA: Ácido alfa-linolénico
CI= Cociente Intelectual
C= Color
CV= Coeficiente de variación
CCTT= Children's Color Trail Making Test
CPT: Continuous Performance Test
DHA= Ácido Docosahexaenoico
DT= Desviación Típica
EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético
EEG= Electroencefalograma
EPA= Ácido Eicosapentaenoico
ERP= Event Related Potentials
FO= Aceite de Pescado
g= gramos
GLA: Ácido gamma linoleico
Hz= Hercios
ID-LC-MS/MS= Cromatografía líquida-dilución isotópica + Espectrometría de masas
Kg= Kilogramos
LC-PUFAs= Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
mg= miligramos
mL= mililitros
mm= milímetros
mv= Milivoltios
n= Tamaño de muestra
nmol/L= Nanomoles por Litro
P= Palabra
P/C= Palabra / Color
PC= Fosfatidilcolina
PE = Fosfatidiletanolamina
PL= Plasma
TDAH= Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
tHcys= Homocisteína total
TLC= Capas de Cromatografía Fina
UV= Ultravioleta
Wt%= Porcentaje de peso
 $\mu\text{mol/L}$ = Micromoles por litro
5-MTHF=5-Metil-tetrahidrofolato

Tesis Doctoral

RESUMEN

Durante el periodo fetal y perinatal, nutrientes tales como los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) y el ácido fólico son esenciales para alcanzar un desarrollo cerebral adecuado. Numerosos estudios han comprobado los beneficios de la alimentación temprana sobre el desarrollo neurocognitivo de los niños. Sin embargo, el conocimiento acerca al sistema atencional es aún escaso.

Objetivos: El objetivo del presente estudio ha sido analizar los efectos a largo plazo de la suplementación materna durante la gestación con aceite de pescado (FO), 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF), placebo o ambos (FO+5-MTHF) sobre las redes atencionales de los hijos hasta los 9 años de edad. **Material y Métodos:** *Casística y Diseño del estudio:* Se han estudiado un total de 143 (7.5 años) y 130 (8.5 años) niños nacidos de madres que participaron en el estudio NUHEAL ("Nutraceuticals for a Healthy Life"), y que fueron asignadas aleatoriamente para recibir suplementos nutricionales con FO y/o 5-MTHF o placebo desde la semana 20 de gestación hasta el momento del parto. Tras el nacimiento, los niños que no fueron alimentados al pecho materno, recibieron fórmulas infantiles conteniendo LC-PUFAs o no según la agrupación realizada en sus madres. A los 7.5 y 9 años de edad se les evaluó la atención mediante pruebas neuropsicológicas (CCTT y STROOP). A los 8.5 años, mediante medidas comportamentales ("Attention Network Test"), potenciales cognitivos evocados (ERPs), y tomografía electromagnética estandarizada de baja resolución (sLORETA) se evaluaron las respuestas para la habilidad de resolución de conflicto (condiciones: *congruentes e incongruentes*), la alerta y la orientación espacial de la atención. **Resultados:** La evaluación neuropsicológica demostró que la suplementación materna con FO, el equilibrio entre las concentraciones de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico (índice AA/DHA) en los fosfolípidos del plasma {en sangre materna (semana 30 de gestación, en el momento del parto) y en cordón umbilical ($p < 0.05$)}, así como el nivel de educación materno ($p < 0.01$), se asociaron a efectos beneficiosos a largo plazo sobre el desarrollo de la atención en sus hijos hasta los 9 años de edad. Por el contrario, el consumo de tabaco durante la gestación se asoció a un efecto negativo sobre el desarrollo de la atención en los niños ($p < 0.01$). Los niños nacidos de madres suplementadas solo con 5-MTHF fueron más rápidos en resolver la respuesta al conflicto a los 8.5 años, respecto a los nacidos de madres pertenecientes a los grupos placebo y FO+5-MTHF ($p < 0.05$). Se observaron también diferencias en las amplitudes de ERP para las condiciones de conflicto, donde aquellos niños nacidos de madres suplementadas con 5-MTHF tuvieron una respuesta más rápida. El estudio mediante s-Loreta permitió la localización de diferencias significativas en la activación a nivel de la corteza del cíngulo medio. **Conclusiones:** La atención a los 7.5 y 9 años se ve beneficiada por la suplementación prenatal con FO y el nivel educativo de la madre. Contrariamente, el consumo de tabaco durante la gestación y el parto por cesárea tienen un efecto negativo a largo plazo sobre el desarrollo de la atención en los niños. La suplementación materna sobretodo solo con 5-MTHF, mejora la capacidad de resolver conflictos de atención en los niños a los 8.5 años. Ésta ventaja parece estar basada en una activación mayor de la corteza del cíngulo medio. Los resultados obtenidos demuestran el efecto a largo plazo de la alimentación temprana sobre el

Tesis Doctoral

desarrollo cerebral específicamente en las áreas involucradas en las funciones ejecutivas relacionadas con la atención.

Key words: Atención, programación precoz mediante la nutrición, aceite de pescado, DHA, embarazo, desarrollo neuropsicológico.

ABSTRACT

During fetal and perinatal periods, many nutrients are important for achieving a normal brain development, such as long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs, contained in fish oil [FO]) and folate. Several studies have shown the benefits of early nutrition on children's neurocognitive development. However, the evidence regarding the attention system is scarce. **Objectives:** The aim of this study is to analyze the long-term effects of FO and/or 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) prenatal supplementation on attention networks until 9 years old. **Material and Methods:** Participants were 143 (7.5 years) and 130 children (8.5 years) born to mothers from the NUHEAL Project (randomized to receive FO, and/or 5-MTHF or placebo prenatal supplementation). After birth, children that were not breastfeed, received infant formulas containing LC-PUFAs or not, depending on their mother's supplementation during pregnancy. At 7.5 and 9 years old their sustained attention was evaluated using neuropsychological tests (CCTT and STROOP). At 8.5 years the response conflict resolution ability, alerting, and the spatial orienting of attention (using congruent and incongruent conditions) were evaluated with behavioral measures (Attention Network Test), Electroencephalography/Event Related Potentials (EEG/ERP), and low resolution electromagnetic tomography (sLORETA). **Results:** The neuropsychological assessment showed that the maternal supplementation with FO, the balance between the araquidonic acid concentrations and docosahexaenoic acid (AA/DHA) index, on plasma phospholipids {maternal blood (30 Week gestation and delivery) and on the umbilical cord ($p < 0.05$)}, as well as the mother's educational attainment ($p < 0.01$), were associated to beneficial long term effects on their offspring's attention at 9 years old. On the other hand, tobacco consumption during pregnancy and delivery by caesarian section was negatively associated with the offspring's attention ($p < 0.01$). Children born to mothers supplemented with 5-MTHF alone solved faster the response conflict than the Placebo and the FO+5-MTHF groups (all $P < 0.05$). Differences between ERP amplitudes for the conflict conditions were also observed. sLORETA analysis showed higher activation of right mid-cingulate cortex for the incongruent condition. Additionally, a significant slowing down of response speed depending on the warning signal in the 5-MTHF and FO groups was observed. **Conclusions:** Attention at 7.5 and 9 years old is benefited by the prenatal supplementation with FO and the educational attainment of the mother. On the contrary the factors that derive in negative outcomes on children's attention are the caesarian section and the tobacco consumption during pregnancy. Moreover, Folate supplementation during pregnancy, rather than FO or FO+5-MTHF, improves children's ability to solve response conflicts. This advantage seems to be based on the higher activation of mid-cingulate cortex, indicating that early nutrition influences the functionality of specific brain areas involved in executive functions.

Key words: Attention, early nutrition programming, 5-MTHF, fish oil, DHA, gestation, neuropsychological development

Tesis Doctoral



1. Introducción

Tesis Doctoral

1.1 Definición Atención

La atención es el proceso comportamental de concentrarse selectivamente en cierto aspecto de la información, ya sea de manera objetiva o subjetiva, mientras el resto de la información perceptible es ignorada. Ésta también es conocida como la asignación de un proceso limitado de recurso (Anderson et al., 2004). La misma es un área extensa que queda aún por investigar por ciencias como la psicología, neurociencias y neuropsicología. A continuación se una breve reseña histórica, sobre la investigación y los paradigmas planteados por una serie de autores en relación al tema.

El concepto de atención como un elemento central de la conducta humana se remonta al inicio de la psicología experimental (James, 1890), a lo largo de la historia han sido varios autores que han desarrollado algunas teorías acerca de la misma.

Treisman (Treisman & Gelade, 1980) desarrollaron una variedad de paradigmas probando diferentes predicciones de la teoría acerca de la atención:

1) *Búsqueda visual*: El paradigma de la búsqueda visual nos permite orientarnos hacia un objetivo ya sea por sus propias características individualmente o por el conjunto de las mismas. Es decir, como si las características simples del objeto pudieran ser percibidas sin límites atencionales, para buscar objetivos definidos como características (ej. rojo, vertical, etc.) deben sufrir en teoría una pequeña variación de distractores en la visualización.

2) *Segregación de textura*: Parece ser que la segregación de textura y la figura base son procesos pre-atencionales paralelos. Por tanto, deben ser determinados sólo por discontinuidades espaciales entre los grupos de estímulos que difieren en estímulos separables, y no así por el conjunto de características en sí mismas.

3) *Conjuntos ilusorios*: Si la atención focal a un objeto en particular es desviada, ya sea porque el tiempo de observación es muy corto o la atención es dirigida a otros objetos, las características de dicho objeto se encuentran en "flotación libre" respecto uno con el otro. Esto da lugar a la posibilidad de combinaciones erróneas cuando más de un objeto desatendido es presentado. Éste fenómeno es conocido como "Conjunciones ilusorias".

4) *Identificación y ubicación*: De nuevo si la atención es desviada las características de los objetos pueden "quedar flotando en el espacio", así como no conectados uno con el otro. Además podemos detectar la presencia de características esenciales sin saber exactamente donde se ubican, aunque podemos rápidamente localizarlas. Ubicarlas o localizarlas en ésta hipótesis, es un proceso diferente a identificarlas. Sin embargo la teoría predice que esto no ocurre con conjuntos o características. Si se ha identificado correctamente un conjunto en particular debemos primero ubicarlo para poder centrar la atención en el mismo o integrar sus características.

5) *Interferencia como estímulo desatendido*: Los estímulos desatendidos deben ser registrados solamente en un nivel de funciones. La cantidad de interferencia o facilitación en una tarea de atención que es generada por dicho estímulo debe solamente depender de las características de las características que la componen y no ser afectada por los conjuntos particulares en las cuales ocurren. Existe evidencia que durante un discurso el significado de palabras desatendidas pueden ser a veces grabadas en el cerebro sin llegar a tener una conciencia plena de las mismas (Corteen & Wood, 1972; Lewis, 1970; Mackay, 1973; Treisman et al., 1974).

La teoría más conocida es la de Posner, un pionero en la investigación de las imágenes del cerebro (brain imaging) además de sus trabajos de atención selectiva. A continuación se conceptualiza el mismo como un sistema complejo, el cual, en la actualidad es considerado una de las mejores maneras, y más actualizadas, de entender el sistema atencional humano (Fan et al., , 2002; Fan et al., 2005; Posner & Dehaene, 1994; Raz & Buhle, 2006).

1.2 Sistema Atencional Posner

El sistema atencional es una compleja interacción de sistemas neuronales. Posner y colaboradores (Fan et al., 2002; Fan et al., 2005; Petersen & Posner, 2012; Posner & Rothbart, 2007; Raz & Buhle, 2006) resumieron la teoría de la "redes atencionales" en tres redes funcionales, bioquímicas y anatómicas: Conflicto (*conflict /executive control*), Alerta (*alerting*) y Orientación (*orienting*).

Alerta o Alerting: implica el "arousal" y la vigilancia; está relacionado con el alcance y mantenimiento de un estado muy sensible a los estímulos exteriores, combinados con una disposición

a la acción. Las áreas cerebrales implicadas en las tareas de "alerting" son el locus coeruleus, el parietal y corteza frontal derecho (Ambrosini, Vastano, Montefinese, & Ciavarrò, 2013). Existe evidencia consistente que relaciona la norepinefrina (NE) con los sistemas de alerta, siendo su vía incluyen nodos del área frontal así como de la parietal (Fan et al., 2002; Fan et al., 2005; Petersen & Posner, 2012).

Orientación o Attentional orienting: se refiere al proceso de selección de información de un *input* sensorial y cambiar de foco atencional entre estímulo y estímulo. El campo visual frontal, el colículo superior, la intersección tempo-parietal, el parietal superior y el tálamo se consideran sus nodos principales (Chica et al., 2011), siendo su neurotransmisor la acetilcolina (Petersen & Posner, 2012).

Finalmente la red de *Conflicto o Conflict network:* implica mecanismos de monitorización conductual y la resolución de conflictos entre estímulos, pensamientos, sentimientos y respuestas. Ésta red incluye en ganglio basal, la corteza cingulado, la corteza dorsolateral y prefrontal (MacDonald & Joordens, 2000; Cohen et al., 2001). Algunos polimorfismos en los genes de la dopamina y la serotonina han sido relacionados con la puntuaciones de función ejecutiva (Groppe et al., 2008; Posner & Rothbart, 2007). La modulación genética determinada por factores ambientales es probablemente la más claramente relacionada con el gen de la dopamina DRD4, la cual ha sido relacionada la función ejecutiva en estudios realizados con neuroimagen (Fan et al., 2003; Posner & Rothbart, 2007).

1.3 Clasificación y subtipos de atención

Según los mecanismos utilizados por el individuo se divide en:

Atención selectiva o focalizada: Es la capacidad para seleccionar, de entre varias posibles, la información relevante a procesar o el esquema de acción apropiado, inhibiendo la atención a unos estímulos mientras se atiende a otros. Los pacientes con alteraciones en este nivel sufren numerosas distracciones, ya sea por estímulos externos o internos.

Atención sostenida: Capacidad de un observador para mantener la atención alerta a los estímulos en un periodo prolongado de tiempo; la misma se suscita cuando el individuo necesita necesitar fijar el foco atencional en determinada actividad con el fin de desempeñarla durante un período extendido de tiempo. Dentro de sus funciones encontramos que proporciona programas apropiados de trabajo y

descanso además de una variación durante la tarea, incrementa también la posibilidad de detección de la señal y reduce la incertidumbre de cuando y donde aparecerá la señal. Finalmente proporciona entrenamiento adecuado al observador para clarificar la naturaleza de las señales y mejora la motivación enfatizando la importancia de la tarea que se lleva a cabo.

Atención dividida: Ésta viene determinada por el interés del sujeto. En la atención dividida son varios los estímulos o situaciones que entran en el campo atencional, en la atención selectiva el esfuerzo se dirige hacia un campo concreto en el que pueden incidir otros procesos psicológicos. Este tipo de atención se utiliza mucho como método de investigación de la eficacia del procesamiento simultáneo (Cooley & Morris, 2009).

Según al nivel del control de voluntad que exista se divide en:

Atención involuntaria: ésta está vinculada con el surgimiento de algún estímulo que resulte nuevo, significativo y fuerte que, tras la monotonía o repetición, desaparece. Esta atención se caracteriza por ser emocional y pasiva ya que la persona no se dirige hacia el objeto o situación intencionalmente ni tampoco ejerce ningún tipo de esfuerzo. Además, esta atención no está vinculada con los motivos, necesidades o intereses inmediatos del individuo.

Atención voluntaria: es la desarrollada a lo largo de la niñez, por medio del aprendizaje escolar y el lenguaje. La atención voluntaria se alcanza luego de que el niño tiene la capacidad de señalar objetos así como también nombrarlos independientemente de sus padres. Esto indica entonces que la voluntaria es el resultado del desarrollo de la involuntaria y, una vez adquirida, el individuo pasa de una a otra constantemente (Petersen & Posner, 2012).

Tabla 1. Principales tipos clínicos de atención

Atención	Especificación
Alerta o "arousal"	Nivel de consciencia del estadio IV del sueño o hipervigilia.
"Span" o amplitud de atención	El "span" acústico suele explorarse con reproducciones de ritmos; el auditivo-verbal, con el subtest Dígitos WAIS/WISC; y el visuoespacial con el test de Cubos de Corsi.
Atención selectiva o focal ('Selective attention')	Proceso por el que se responde a un estímulo o tarea y se ignoran otras. Suele equivaler a la atención posterior explorada con tareas de cancelación, tareas de emparejamiento visual, etc.
Atención de desplazamiento entre hemisferios ('Shifting attention')	Proceso para seleccionar preferencialmente información prioritaria en uno y otro hemisferio visual. Suele explorarse con el paradigma de Posner.
Atención serial ('Serial attention')	El prototipo son las 'pruebas de cancelación'
Atención dividida o dual o compartida ('Simultaneous/divided/ sharing attention')	Proceso por el que se responde simultáneamente a un doble estímulo, poniendo en marcha una doble 'activación'. Suele explorarse con paradigmas de tareas con interferencia.
Atención de preparación ('Preparing attention')	Proceso de preparación de respuestas apropiadas. Suele explorarse registrando eléctricamente las neuronas que se 'disparan' (activan) previas a las respuestas.
Atención sostenida o capacidad atencional o concentración o vigilancia ('Sustaining/concentrating attention')	Proceso de mantenimiento persistente del estado de alerta a pesar de la frustración y el aburrimiento. Suele explorarse con tareas tipo CPT
Inhibición ('Suppressing attention')	Atención para inhibir una respuesta natural. Suele explorarse con los paradigmas de Stroop y Go/NoGo

Nota: Basado en (Petersen & Posner, 2012), (Cooley & Morris, 2009), (Posner & Dehaene, 1994)

Tabla 2. Tipos de atención anterior

Tipos de atención anterior	Paradigmas de exploración clínica	Localización específica.
Atención dividida o dual o compartida	<i>Tapping</i> con HD interferencia	Cingulado anterior prefrontal dorsolateral.
Atención de preparación	Registros neuroeléctricos	HD Frontal dorsolateral.
Inhibición	Paradigma Stroop	HD Cingulado anterior, prefrontal dorsolateral.
Atención sostenida	Continuous Performance Test (CPT)	HD Orbitofrontal lateral Frontal dorsolateral (áreas 9 y 46) Ganglios basales (Tálamo) (Corteza parietal).
Atención selectiva a propiedades del objeto		HD Circuito orbitofrontal lateral Caudado derecho pálido izquierdo premotor inferior izquierdo (cortezainsular derecho) (colículo inferior) (tálamo posterior).

Basado en los estudios de (Posner & Petersen, 1990), (Posner et al., 1988), (Corbetta et al., 2002) y (Stuss et al., 1981). *HD= hemisferio derecho.

Tabla 3. Pruebas, tests y paradigmas de exploración de la atención.

Pruebas generales y escala para la evaluación de la atención en la vida diaria	Ponsford & Kinsella's Attentional Rating Scale Weber's Attention Capacity Test
"Span" , acústico, audioverbal, visoespecial	<ul style="list-style-type: none"> • Reproducción de golpes rítmicos • Subtest dígitos WAIS • Cubos de Corsi
Atención selectiva	Atención selectiva, Embedded Figures Test
Atención serial	Pruebas de cancelación. "Letter Cancellation Task" "Albert's Visual Neglect Test"
Atención de desplazamiento	Posner's covert orienting paradigm
Atención dividida	"Tapping" interferido; Trail Making Test
Inhibición	"Stroop's paradigm"; "Go/No Go paradigm"
Atención sostenida	Continuous Performance Test (CPT), Trail Making Test, Go/no-Go paradigm.

1.4. Ácidos grasos poliinsaturados y Desarrollo Cognitivo

El término “*early nutrition programming*” se refiere a los efectos de la nutrición durante periodos críticos de la vida en la programación del desarrollo de la estructura y función de órganos y sistemas (Dorner, 1983; Lucas, 2005; Koletzko et al., 2011). Actualmente, se reconoce este efecto de programación en relación directa con el riesgo de obesidad, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, y un funcionamiento cognitivo deficiente (Lucas, 1998; Hoet et al., 1999; Demmelmair et al., 2006; Cetin, 2008; Koletzko, 2014). Como señaló Georgieff, 2007, durante la vida fetal y los primeros meses de vida, todos los nutrientes son cruciales para conseguir un neurodesarrollo adecuado (Lucas, 1998; Georgieff, 2007; Innis et al., 2002; Innis et al., 2003); de forma particular, se ha demostrado evidencia científica respecto a la relación entre las vitaminas del grupo B (Elmadfa et al., 2012), los ácidos grasos, y micronutrientes como el hierro, iodo y zinc con el desarrollo cerebral (Anjos et al., 2013; Bradbury, 2011; Julvez et al., 2009; Novak et al., 2008).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs), especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA) han demostrado tener un papel importante en el desarrollo cerebral y cognitivo (Anjos et al., 2013; Bradbury, 2011; Escolano-Margarit et al., 2013; Innis, 2007a), ya que parecen afectar directamente a la estructura y flexibilidad de la membrana celular, y por lo tanto, a la velocidad de transmisión de la señal (Stillwell et al., 2005); el DHA también está implicado en la expresión génica, el canal de regulación de iones (Kitajka et al., 2002) y la neurogénesis (Bertrand et al., 2006).

El DHA se acumula tanto en el hipocampo así como en los lóbulos frontales, especialmente durante el tercer trimestre de gestación. Estas áreas cerebrales están directamente relacionadas con el desarrollo ulterior de la atención, la memoria de trabajo y el control inhibitorio (Anderson et al., 1998; Agostoni et al., 1995).

1.4.1 Papel de los ácidos grasos poliinsaturados durante el embarazo y la lactancia sobre el neurodesarrollo de los niños.

Los LC-PUFAs, como el DHA y el AA, son importantes durante la gestación tanto para la salud materna como para un óptimo desarrollo fetal. Es ampliamente conocido que la demanda metabólica del DHA aumenta durante el embarazo, especialmente durante el último trimestre cuando la acreción de DHA en el sistema nervioso alcanza su máxima velocidad (Martínez et al., 1992). Hay suficiente evidencia científica de la importancia del estado nutricional durante la gestación en la salud y el riesgo de enfermedad en la vida posterior del nuevo ser. Estudios post-mortem indican que el feto acumula durante el último trimestre de gestación un promedio de 67 mg de ácidos grasos (Martínez et al., 1992; Bos et al., 2016). Sin embargo, la ingesta de DHA en mujeres que viven en países industrializados en general es insuficiente, y además, sus hábitos alimenticios deben cambiar con el fin de aumentar su consumo diario durante el embarazo; la ingesta promedio de DHA en los países occidentales es de 70–200 mg/day (Denomme et al., 2005; Innis et al., 2007b; Stark et al., 2005), pero en algunos casos no alcanza los 50 mg/day (Meyer et al., 2003), resaltando la disparidad de la ingesta y la potencial deficiencia de DHA tanto en la madre como en su hijo.

Los beneficios de la suplementación con n-3 LC-PUFAs de la serie n-3, incluyendo el DHA, en la prevención de complicaciones perinatales como la preeclampsia, prematuridad y bajo peso son aún inciertos. No obstante, Szajewska et al. (2006) mediante una revisión sistemática comprobaron que la suplementación con n-3 LC-PUFA durante la gestación puede incrementar la duración de la misma, así como el tamaño de la circunferencia craneal, aunque la media del efecto sea poco significativa.

Por su parte estudios a doble ciego aleatorizados como los de Escamilla-Nuñez et al. (2014) indican que la suplementación con DHA durante la gestación pueden disminuir la incidencia de síntomas respiratorios en niños con antecedentes de atopía materna. A su vez, Makrides et al. (2010) indican que el consumo de cápsulas de aceite de pescado enriquecidas con DHA comparadas con el consumo de aceite vegetal durante la gestación no disminuyeron los niveles de depresión post-parto ni tampoco beneficiaron la mejora del desarrollo del lenguaje ni cognitivo en sus hijos durante la etapa de infancia temprana.

Existe una disparidad de consenso en cuanto a los efectos relacionados con la suplementación pre- y post-natal. Dichos resultados varían de positivos, nulos a negativos.

Heaton et al., 2013a señalan que la mayoría de los estudios observacionales respecto la consumo del DHA durante la gestación, llevados a cabo tanto en humanos como en animales arrojan resultados poco concluyentes, habiéndose comprobado que tanto a largo, como a corto plazo, varían de acuerdo al perfil genético del individuo. Otros estudios señalan que la suplementación temprana con DHA no tiene una influencia directa sobre la cognición, lenguaje ni las funciones ejecutivas (Makrides et. al., 2014), ni determinan una mejora en el desarrollo visual o la atención en niños en edad preescolar (Collins et al., 2015a; Gould et al., 2016b; Meldrum et al., 2012). Van Goor et al., 2011 observaron que la suplementación de DHA o DHA+AA durante la gestación y lactancia no influye en la condición neurológica de los hijos a los 18 meses. En relación a los resultados obtenidos de agudeza visual y la suplementación de DHA y n-3 LC-PUFAs, no se ha establecido una correlación positiva (Chmielewska et al., 2016; Gould et al., 2013; Kotani et al., 2006; Smithers et al., 2011; Stein et al., 2012) o el grado de evidencia es bajo (Gould et al., 2013; Malcolm et al., 2003); tampoco se encontraron efectos positivos en el desarrollo (Gould et al., 2013; Tofail et al., 2006)

Por su parte, Campoy et.al. 2012, llevaron a cabo una revisión sistemática de estudios clínicos destinados a medir en los efectos de la suplementación de los omega-3 ácidos grasos polinsaturados (n-3 LCPUFA) durante la gestación, en el período de lactancia y durante los primeros meses de vida, concluyendo que los estudios llevados a cabo en el tema no arrojan conclusiones claras y consistentes del beneficio de la suplementación de n-3 LCPUFA durante la gestación y/o período de lactancia en el crecimiento de niños a término, neurodesarrollo o agudeza visual.

Contrariamente, Westerberg et al., 2011a entre otros investigadores, han comprobado resultados positivos de la suplementación durante la gestación con DHA sobre las funciones relacionadas con la atención de sus hijos, el coeficiente intelectual, (CI) (Agostoni et al., 1995; Meldrum et al., 2012; Caspi et al., 2007; Helland et al., 2008) la agudeza visual, (Agostoni et al., 1995; Meldrum et al., 2012) desarrollo psicomotor (Escolano-Margarit et al., 2011), y las funciones cognitivas (Campoy et al., 2011; Helland et al., 2008; Mc Cann et al., 2017a; Mc Cann et al, 2017b; Steer, 2013) y el desarrollo cerebral

ulterior (Morse, 2012). Asimismo, Widenhorn-Müller et al., en 2014 han demostrado un desempeño significativo de las tareas de memoria de trabajo notablemente superior en los niños en función del consumo de DHA por parte de sus madres durante la gestación; así como un incremento en el cortex dorsal prefrontal, en el desempeño de ciertas tareas cognitivas (CPT), sin embargo, no se registraron diferencias comportamentales respecto al grupo control (Helland et al., 2008; Macnamara et al., 2010). Colombo et al., 2004 y Helland et al., 2008 observaron que tanto el comportamiento como los niveles de distractibilidad de los niños están relacionados con el nivel de DHA materno alcanzado en el momento del parto.

Numerosos estudios han reportado una relación positiva entre niveles más altos de DHA y mejores resultados neurológicos a los 9 meses, 6 y 18 meses, 4 y 5.5 y años, respectivamente (Escolano-Margarit et al., 2013; Hibbeln et al., 2007; Judge et al., 2007; Kotani et al., 2006). La agudeza visual, la atención y la capacidad de resolución de conflicto (Morse, 2012), así como la coordinación ojo y mano (Dunstan et al., 2008), se asocian de forma positiva al consumo de DHA durante la gestación.

Como se ha mencionado previamente, algunos estudios han investigado los efectos de la suplementación materna con DHA durante la gestación sobre el desarrollo de la atención en sus hijos. Las características de dichos estudios se muestran en la Tablas 4, 5 y 6. Todas las intervenciones se llevaron a cabo a partir de la semana 20 de gestación hasta el momento del parto, con cantidades de DHA (135-800 mg/d) así como de EPA (100-150 mg/d) variables. Los niños fueron evaluados desde los 4 meses hasta los 8.5 años de edad. La evaluación de los niños más pequeños consistió en actividades de juego con el fin de mantener sobre el juguete o actividad que se lleva a cabo (Colombo et al., 2004; Colombo et al., 2016a; Gould et al., 2014a). Colombo et al. encontraron una influencia positiva de la suplementación a los 12 y 18 meses (135 mg/d DHA) (2004) y 4,6 y 9 meses de edad (600 mg/d) (2016). Gould et al. en 2014, no encontraron una mejora en la atención de los niños a los 18 meses tras la suplementación materna con 800 mg/d de DHA y 100 mg/d de EPA 100mg/d). Gould et al., 2016a han llevado a cabo un estudio que es parte del DOMInO trial [(DHA to Optimize Mother Infant Outcome) trial], con niños de 7 años, los resultados todavía no han sido develados.

En conclusión, existe evidencia limitada e inconsistente de que la suplementación materna con n-3 LC-PUFAs y DHA durante el embarazo, puede mejorar la atención o el desarrollo cognitivo en general de los niños.

Durante años, muchos estudios han reportado los beneficios de la lactancia materna sobre el desarrollo neurocognitivo frente a los niños alimentados con fórmula infantil (Anderson et al., 1999; Agostoni et al., 2001; Oddy et al., 2003, 2011; Kramer et al., 2008). La justificación de estos resultados se ha basado en la comprobación de mayores concentraciones de DHA y mejor biodisponibilidad en la leche humana respecto a las presentes en las leches de fórmula (Heaton et al., 2013b; Jensen et al., 2005). Aún no hay resultados concluyentes respecto a los efectos de la suplementación de las madres lactantes con DHA, e incluso algunos autores han sugerido una influencia perjudicial sobre el desarrollo cognitivo en sus hijos (Cheatham et al., 2011a). (Huffman et al., 2011) en un artículo de revisión indican que la suplementación durante la lactancia de ácido α -linolénico o DHA en países en desarrollo puede beneficiar el crecimiento como el desarrollo de niños de 6-24 meses. Estos efectos parecen ser más notorios en niños que presentan cuadros de desnutrición, sin embargo, no existe evidencia de que este beneficio tenga lugar en niños mayores de 2 años.

Distintos estudios llevados a cabo en niños prematuros y a término alimentados con formulas suplementadas con diferentes cantidades de DHA o aceite de pescado han publicado resultados positivos sobre el neurodesarrollo (Agostini et al., 1995; Fang et al., 2005; Fewtrell et al., 2004), en concreto sobre las funciones cognitiva y ejecutiva (Collins et al., 2015b; Drover et al., 2009; Helland et al., 2008; Willatts et al., 2013), el desarrollo psicomotor (Alshweki et al., 2015; Jensen & Lapillonne, 2009), el reconocimiento en la memoria, y el desempeño en resolución de problemas superiores (Birch et al., 2000; Drover et al., 2009; Henriksen et al., 2008), la velocidad de procesamiento (Willatts et al., 2013), agudeza visual (Birch et al., 2000; Birch et al., 2005; Carlson et al., 1996), CI, lectura, comportamiento (Birch et al., 2010; Richardson et al., 2012) y resultados académicos (Brew et al., 2015). Asimismo, se han publicado resultados contrarios a los mencionados, los cuales no mostraron diferencias en el desarrollo y funciones cognitivas (Almaas et al., 2015; Kennedy et al., 2010; Qawasmi et al., 2012; van der Merwe et al., 2013), ni en la función neurológica (de Kikkert et al., 2010), en el desarrollo del

lenguaje (Drover et al., 2012), en resultados neuro-comportamentales (Makrides et al., 2011), ni en el desempeño académico (Brew et al., 2015).

La mayoría de los estudios que han intentado investigar el efecto de la suplementación con DHA/EPA durante la lactancia sobre el desarrollo posterior de la atención en niños, han administrado fórmulas enriquecidas y/o suplementadas con DHA, EPA, GLA, AA. El rango de edad de la evaluación va desde los 4 meses hasta los 5 años. La cantidad de DHA, EPA, GLA, AA se describen en la Tabla 5. Una vez más, la mayoría de las herramientas de evaluación consistieron en sesiones de juego diseñadas especialmente para evaluar las diferencias entre niños alimentados con leche materna fortificada o con fórmulas enriquecidas; se utilizó el Test de Fagan (Carlson et al., 1996; Westerberg et al., 2010), así como un subtest del *Leiter International Performance Scale-Revised* subtest destinado a medir la atención. De forma unánime, todos los estudios han reportado beneficios de la suplementación con DHA/EPA sobre la atención de los niños (Carlson et al., 1996; Colombo et al., 2011a; Harbild et al., 2013; Jensen et al., 2005; Werkman & Carlson, 1996; Westerberg et al., 2010); los estudios, llevados a cabo tanto en prematuros como en niños sanos a término, concluyeron que la mejor etapa durante la infancia para obtener un beneficio de la suplementación con DHA sobre la atención es el primer año de vida, especialmente los primeros meses.

Tabla 4. Estudios de intervención nutricional con ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFAs) durante la gestación y efecto en el desarrollo de la atención en los hijos

Autor/ Año publicación	Intervención	Control	Duración	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Resultados
Colombo et al., 2016	600 mg/d DHA/d (n=123)	Soy bean and sunflower oil (placebo) (n=107)	14,5 semanas de gestación hasta el parto	<i>Protocolo de habituación visual con medidas simultáneas de ritmo cardíaco</i>	4,6,9 meses	Efecto positivo sobre la atención de los niños y su estado de ánimo.
Gould et al., 2014	800 mg DHA/d + 100 mg EPA/d (n=313)	Mezcla de aceites vegetales sin DHA (n=318)	18-21 semanas de gestación hasta el parto	<i>Prueba de un objeto Prueba de múltiples objetos Prueba de distracción</i>	18 meses	No se observa mejora de la atención en niños preescolares.
Colombo et al., 2004	135 mg DHA/d	35 mg DHA/d	3er trimestre de la gestación	<i>Atención con juego libre Distractibility paradigmas de distracción</i>	12,18 meses	Elevados niveles de DHA en el parto se asocian a un período de la atención acelerado durante el primer año, y a una menor capacidad de examen durante la exploración de objetos y menor distracción en el 2º año.

Tabla 5. Estudios de intervención nutricional con ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFAs) durante la gestación y lactancia sobre el desarrollo de la atención en los hijos

Autor/ Año publicación	Intervención	Control	Duración	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Resultados
Harbild et al., 2013	5 ml aceite de pescado (<i>n</i> =27)	No suplementos (<i>n</i> =34)	3 meses	<i>Single object free play task</i>	9-12 meses	Los resultados indican que los ácidos <i>n</i> -3 en la lactancia pueden influenciar el desarrollo de la atención, además de tener efectos beneficiosos cardiovasculares.
Colombo et al., 2011b	Tres grupos: 1) 0.32% DHA+0.64% ARA (<i>n</i> =32) 2) 0.64% DHA, 0.64% ARA (<i>n</i> =26) 3) 0.96% DHA, 0.64% ARA (<i>n</i> =33)	0.00% DHA, 0.00% ARA (<i>n</i> =31)	0-12 meses	<i>Visual habituation protocol</i> <i>DIAMOND</i> <i>EKG</i>	4,6,9 meses	El análisis de los datos psicofisiológicos sugiere que la atención a los estímulos visuales tiene un efecto positivo de los ácidos LCPUFA en la atención en los niños a los 4 y 9 meses.
Westerberg et al., 2011	0.5 mL aceite (con 32 mg DHA + 31 mg AA or placebo) por 100 mL leche humana (<i>n</i> =44)	0.5 mL aceite sin DHA, ni AA por 100 mL de leche humana (<i>N</i> =48)	63 días	Sesiones de juego libre <i>Bayley MDI</i> <i>ASQ</i>	20 meses	Se observan efectos positivos de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados en el grupo de intervención experimental y en el grupo de control MDI o la ASQ.
Jensen et al., 2010	200 mg/d de DHA (<i>N</i> =60)	Aceite de Pescado (sin DHA) (<i>N</i> =59)	0-4 meses	<i>Bayley PDI</i> <i>K-ABC</i> <i>Developmental Test of Visual-Motor Integration III</i> ; <i>WPPSI-R</i>	5 años	Los niños de 5 años con una suplementación con DHA muestran un grupo placebo de lactancia materna con un mejor desempeño en la atención.
Carlson et al., 1996	1) Fórmula Control (<i>n</i> = 20) 2) Fórmula experimental con: DHA (0.1%) and AA (0.43%) (<i>n</i> =19)	Lactancia Materna (<i>n</i> = 19)	2 meses	<i>Teller Acuity Cards</i>	2,4,6,9,12 meses	Los niños alimentados con ácido linoléico y linolénico muestran un mejor desempeño en la agudeza visual, linolénico únicamente.
Werkman et al., 1996	Fórmula adicionada con 0.2% (DHA, 22:6n-3) y las fórmulas a término con >3% GLA (18:3n-3) (<i>n</i> =33)	Fórmulas disponibles en el mercado (<i>n</i> =34)	0-25 días-9 meses	<i>The Fagan Test</i>	6.5,9,13 meses	Los niños prematuros alimentados con una fórmula enriquecida sólo con DHA tienen un proceso de desarrollo más lento que aquellos que recibieron una fórmula con DHA y GLA.

1.4.2 Papel de los ácidos grasos poliinsaturados en la niñez sobre el neurodesarrollo y la conducta.

Estudios en niños sanos de 4 a 14 años de edad no han demostrado de forma consistente efectos beneficiosos de DHA o EPA sobre el desarrollo cognitivo. Parletta et al., 2013 llevaron a cabo un estudio en niños de 3 a 13 años, concluyendo que la suplementación dietética con aceite de pescado no determina una mejora en el lenguaje (lectura y deletreo). Otros estudios (Kirby et al., 2010; Kennedy et al., 2009; Muthayya et al., 2009; Ryan et al., 2008a; Osendarp et al., 2007; de Jong et al., 2010) mostraron resultados similares en otros dominios del desarrollo.

Gispert-Llaurado et al., 2016, en un estudio realizado en niños de 7 a 9 años, comprobaron una asociación entre el consumo de 2 porciones de pescado a la semana y un menor riesgo de mostrar problemas de tipo emocional y comportamental respecto a aquellos que no lo hacían esa ingesta de pescado semanal.

Respecto al papel de los LC-PUFAs sobre los trastornos del sistema atencional la mayoría de los estudios han sido realizados en niños con trastornos del déficit de atención e hiperactividad (TDAH). Existe evidencia de que los niños que sufren de TDAH presentan bajas concentraciones plasmáticas de LC-PUFAs respecto a un grupo control (Colter et al., 2008; Mitchell et al., 1987). Los potenciales mecanismos que llevan a unos niveles anormales de ácidos grasos esenciales (EFA) en los pacientes con TDAH, pueden incluir una reducción en el consumo de EFA que a la vez desencadena una conversión reducida de LC-PUFAs (Burgess et al., 2000). En los últimos años se ha estimulado la suplementación con PUFAs en el tratamiento de niños que padecen de TDAH y otros problemas de aprendizaje (Millichap & Yee, 2012). Los estudios realizados en niños sanos no muestran evidencia científica del beneficio de la suplementación con DHA.

En la Tabla 6, se muestran los estudios llevados a cabo en niños de 5 a 13 años de edad. Asimismo, la duración de la suplementación tiene un efecto crucial en los resultados posteriores; la mayoría de los estudios con mayor tiempo de intervención obtuvieron mejores resultados en dominios cognitivos y atencionales (Hirayama et al., 2004; Huss et al., 2010a; McNamara et al., 2010; Milte et al., 2011; Milte et al., 2015; Sinn et al., 2008; Widenhorn-Müller et al., 2014). No obstante, Voigt et al., 2001 y Hirayama et al., 2004 no observaron mejoría en los síntomas de inatención en los niños con TDAH tras periodos

de intervención largos, si bien la dosis de DHA administrada fue más baja respecto a los estudios anteriores. De la misma manera, la mejora en los resultados obtenidos pueden ser selectiva en algunos subgrupos de niños con TDAH. Diferentes estudios han demostrado hallazgos que sugieren que la suplementación con ácidos grasos omega 3 en niños con TDAH puede ser una terapia de apoyo al tratamiento con metilfenidato, incrementando sus efectos de manera segura (Belángier et al., 2009; Milte et al., 2011; Vaisman et al., 2008; Checa-Ros, et.al, 2017).

McNamara et al., 2010 estudió el aspecto anatómico de la suplementación durante el desempeño de tareas de atención; concluyen que la intervención durante 8 semanas con dosis altas de DHA aumentan significativamente la activación funcional de la corteza prefrontal dorso lateral durante el desempeño de una tarea de atención en comparación a un grupo placebo. A su vez, Almeida et al., 2017 demostraron que un bio-estado reducido de DHA se asocia a una reducción de la conectividad funcional relacionada con el evento en las redes corticales de atención de los niños con desarrollo normal.

En resumen, los LC-PUFAs y particularmente el DHA son fundamentales para el desarrollo del cerebro humano. Sin embargo, la evidencia del efecto positivo de una dieta rica de LC-PUFAs sobre el desarrollo y la atención de los niños es aún incierta y presenta hallazgos inconsistentes. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios de intervención sufren de limitaciones metodológicas importantes. El fracaso al momento de encontrar efectos positivos de los LC-PUFAs sobre el desarrollo del niños puede deberse a una dosis bajo o inapropiada durante la intervención, así como la duración de la misma. Otro aspecto puede estar relacionado con el uso apropiado de los tests psicológicos además de muestras poblacionales muy reducidas.

En general, el periodo de evaluación que arrojó resultados positivos consistentes tras la intervención, es el periodo de lactancia, donde existe un mayor consenso de los beneficios sobre la atención en niños. Aunque, la mayoría de los estudios muestran cierta mejora tras la suplementación en niños que padecen de TDAH, no existe una evidencia clara de que estos beneficios se puedan extrapolar a otro tipo de poblaciones.

Tabla 6. Estudios de intervención nutricional con ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFAs) en niños y efectos sobre

Autor/ Año publicación	Intervención (n-3 LC-PUFA dosis/diaria)	Control	Período	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Res
Checa-Ros et.al, 2019	MPH (1 mg/kg/día) + EPA (70 mg/ día) + DHA (250 mg/ día) (n=40)	Placebo	1 meses	<i>Magallanes Scale of Visual Attention (MSVA)</i>	7-15 años	MPH + EPA + DHA (todas) un efecto clínico positivo en niños con TDAH, además del MPH.
Almeida et al., 2017	High DHA (n=18)	DHA Bajo (n=18)		CPT-IP <i>Functional magnetic resonance imaging</i>	8-10 años	Un bio-status reducido de reducida conectividad funcional en eventos en redes corticales un desarrollo normal.
Milte et al., 2015	4 x 500 mg cápsulas/ día; EPA-enriquecidas con aceite de pescado:1,109 mg EPA + 108 mg DHA; DHA-enriquecidas con aceite de pescado: 264 mg EPA + 1,032 mg DHA (n=90)	4x500 mg cápsulas/día: Aceite de cártamo - 1,467 mg LA (n=6)	12 meses	<i>Abbreviated test battery from the TEA-ch</i> <i>Sky Search Score</i> <i>Creature Counting</i> <i>Go/No-Go task</i> <i>Sky Search DT</i> <i>Wechsler Individual Achievement Test-III</i> <i>Wechsler Scale of Children's Intelligence-III</i> <i>CPRS-Long Version</i>	6-13 años	El aumento de DHA y EPA suplementos dietéticos pu comportamiento, la atención niños con TDAH.
Widenhorn-Müller et al., 2014	2 cápsulas al día: EPA (600 mg) + DHA (120 mg) + Vitamina E (15 mg) (n=44)	Aceite de oliva (n=49)	16 semanas	Cognición (HAWIK-IV) Memoria de trabajo (HAWIK-IV) Velocidad de procesamiento de la información (HAWIK IV), Atención (KITAP/TAP)	6-12 años	La mejora en la memoria correlación significativa con DHA y reducidos de AA.
Milte et al., 2012	4 x 500-mg cápsulas/día 1) EPA aceite enriquecido: EPA 1109 mg and DHA 108 mg (n=31) 2) DHA aceite enriquecido: EPA 264 mg y DHA 1032 mg (n=29)	Aceite de cártamo (control): 1467 mg/d LA (n=25)	4 meses	<i>Battery from the Test of Everyday Attention for Children.</i> <i>Wechsler Individual Achievement Test III</i>	7-12 años	El aumento de los ácidos en los eritrocitos, específicamente mejorar la alfabetización y niños con TDAH. Un mayor en niños que tienen como del aprendizaje.
Huss et al., 2010	400 mg EPA + 40 mg DHA + 60 mg GLA + 80 mg magnesio + 5 mg zinc (n=810).		12 semanas	<i>SNAP IV, assessment of attention deficit, hyperactivity/impulsivity</i> <i>SDQ - Strengths and Difficulties Questionnaire</i>	5-12 años	Reducción sustancial en la atención e hiperactividad/ problemas emocionales y
McNamara et al., 2010	1) Baja dosis DHA (400 mg/d) (n=10) 2) Dosis Alta DHA (1200 mg/d) (n=13)	Placebo (n=10)	8 semanas	CPT-IP <i>Magnetic Resonance Imaging</i>	8-10 años	La ingesta dietética de DHA en la composición de DHA con alteraciones en la actividad de atención cortical durante

Tesis Doctoral

Autor/ Año publicación	Intervención (n-3 LC-PUFA dosis/diaria)	Control	Período	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Res
Ryan & Nelson, 2008	400-mg/d DHA /d (n=85)	Placebo (n=90)	4 meses	Leiter-R Test of Sustained Attention. PPVT Day-Night Stroop Test. kCPT	4 años	Mejora en las puntuaciones
Sinn et al., 2008	400 mg aceite de pescado y 100 mg aceite de onagra con EPA (93 mg), DHA (29 mg), GLA (10 mg), y vitamina E (1.8 mg) (n=72)	Aceite de Palma (n=27)	Desde sem.16 hasta 30	TEA-ch WISC III NEPSY Stroop colour-word test	7-12 años	Mejoras significativas en los resultados de las pruebas de cambio y control de la atención en comparación con el placebo.
Vaisman et al., 2008	1) 250 mg/d EPA +DHA PL-n3 (300 mg/d) (n=29) 2) Aceite de Pescado (n=28)	Placebo (n=26)	3 meses	TOVA	8-13 años	Diferentes efectos sobre los resultados de las pruebas en fracciones sanguíneas y atención visual en niños.
Hirayama et al., 2004	3.6 g DHA+700 mg EPA/sem. (n=20)	Aceite de Oliva (n=20)	2 meses	Test of Visual Perception Frostig Visual and auditory short-term. Developmental test of visual-motor integration Continuous performance test Impatience test	6-12 años	No hubo mejoras en los resultados de las pruebas de TDAH.
Voigt et al., 2001	345 mg/d DHA/ día (n=27)	Placebo (n=27)	4 meses	TOVA Children's Color Trails test CBCL and Conners' Rating Scale	6-12 años	No hubo una reducción en los resultados de las pruebas de TDAH.

SNAP IV, assessment of attention deficit, hyperactivity/impulsivity: Mide el déficit de atención y los síntomas de hiperactividad.

SDQ - Strengths and Difficulties Questionnaire: Evaluación general de problemas emocionales y de comportamiento.

CBCL: Child Behavior Check list

1.5 Papel del ácido fólico durante la vida precoz sobre el desarrollo cognitivo y la conducta

El ácido fólico desempeña un papel fundamental en la prevención de los defectos del tubo neural (Crider et. al, 2014), neurogénesis, apoptosis y en el desarrollo normal del sistema nervioso (Pérez-Dueñas et al., 2014., 2008; Mattson et al., 2003). El bajo consumo de ácido fólico y determinados polimorfismos del gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Trabetti, 2008), pueden determinar niveles elevados del homocisteína en plasma, los cuales se asocian a resultados poco favorables en el embarazo (Sram et al., 2005). Se ha demostrado que bajas concentraciones de ácido fólico durante el embarazo están asociadas a problemas de conducta durante la infancia (Roza et al., 2010), a un incremento del riesgo de déficit de atención además de una disminución de la habilidad de resolución de problemas (Schlotz et.al., 2010), así como dificultades en el razonamiento o la fluidez verbal (Nguyen et.al, 2013, Veena et.al 2010). Skórka et.al., 2017 concluyeron que el consumo durante la gestación de un multivitamínico que contiene ácido fólico no resultó beneficioso al desmepeño mental general en niños. Con respecto a la atención, Schultz et al., 2010 observaron que bajas concentraciones de ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo se asocian a un aumento de riesgo de déficits atencionales y a la disminución de la capacidad de habilidades de resolución de problemas.

También se ha comprobado una asociación directa entre la homocisteína y la velocidad de procesamiento, así como entre el ácido fólico y la memoria episódica y el lenguaje (Feng et al., 2006). Sin embargo, es importante señalar, que la gran mayoría de las investigaciones llevadas a cabo incluyen pruebas de atención que no engloban la totalidad del estado del sistema atencional, y no evalúan los efectos a largo plazo de la suplementación temprana con ácido fólico. En general, en la actualidad los estudios realizados no investigan directamente el efecto de la suplementación temprana con ácido fólico sobre el sistema atencional del cerebro.

En la Tabla 7 se recogen algunos estudios de suplementación con ácido fólico llevados a cabo en embarazadas. Riahi et al., demuestran tras 8 semanas de intervención con 5 mg/d de ácido fólico una mejora de la falta de apetito causado por el metilfenidato en niños con TDAH; Ghanizadeh et al. tras 2 meses de intervención comprueban que el ácido no demuestra ser un tratamiento adjunto efectivo contra los síntomas agresivos del TDAH, ni mejora de la calidad de vida de los niños. Virk et al, (2018) no encuentran una relación directa entre el síndrome hiperquinético y el consumo de la medicación para el TDAH, con el consumo de folato.

Estudios futuros deberían abordar el tema de la dosis, el tiempo de intervención, el tamaño de muestra y las herramientas apropiadas de evaluación de los efectos del ácido fólico sobre el neurodesarrollo. Asimismo, los estudios que vendrán deben ser diseñados con una potencia estadística suficiente para detectar, pequeños pero relevantes efectos sobre la atención y las funciones cognitivas, usando metodologías sensitivas y estandarizadas. Nuevas técnicas para investigar las influencias nutricionales sobre el desarrollo de las estructuras cerebrales y sus efectos sobre las redes atencionales, tales como técnicas de neuroimagen, a buen seguro darán luz a estos procesos.

Tabla 7. Estudios llevados a cabo sobre la influencia de la suplementación con ácido fólico durante la gestación sobre la función cognitiva de los niños

Autor/ Año publicación	Intervención	Control	Período	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Resultados
Veena et al., 2010	Niveles normales de folato Materno (>7 nmol/L) (n=514)	Niveles bajos de folato Materno (<7 nmol/L) (n=22)	Semana 30 Gestación	<i>Kaufman Assessment Battery for children</i> : Mide aprendizaje, memoria a largo y corto plazo y habilidad de recuperación., habilidad de razonamiento, habilidad visoespacial, coordinación atención y concentración. <i>Scale for Children-III (WISC-III)</i> .: Inteligencia Global	9-10 años	Niveles más altos de folato durante la gestación predicen mejores resultados cognitivos en sus hijos.
Virk et al., 2018	Ácido fólico: >400 µg (N= 7126)	Multivitamínico (n=17,505)	8 semanas de gestación en adelante	<i>The Strength and Difficulties Questionnaire (SDQ)</i> : síntomas emocionales, problemas de conducta, hiperactividad y problemas de relacionamiento con sus pares.	7 años	No se encontró relación entre la suplementación con ácido fólico y el consumo de medicamentos para el TDAH y la suplementación con ácido fólico.

Nota: pM, Pico Molar; nmol/L, nano molar; µg, microgramo; TDAH, trastorno por déficit de atención e hiperactividad.

Tabla 8. Estudios llevados a cabo sobre la suplementación con ácido fólico de la atención y función cognitiva en niños

Autor/ Año publicación	Intervención (ácido fólico)	Control	Período	Pruebas Cognitivas y de Atención	Edad	Resultados
Riahi et al., 2018	Una dosis promedio de metilfenidato (1 mg/kg) más ácido fólico (5 mg/d) (n=35)	Una dosis promedio de metilfenidato (1 mg/kg) más una dosis placebo (5 mg de sacarosa) (n=35)	8 semanas	<i>The Conners Parent Questionnaire</i> : Evaluar la respuesta al tratamiento en pacientes con TDAH:	6-12 años	El ácido fólico mejora la falta de atención y la hiperactividad en niños con TDAH.
Ghanizadeh et al., 2013	Metilfenidato (10 a 20mg/diarios) + ácido fólico (5mg/diarios) (n=23)	Metilfenidato (10 a 20mg/diarios) + Placebo (n=26)	1-2 meses	<i>ADHD rating questionnaire</i> : impulsividad. <i>Overt Aggression Scale</i> : Agresión física y verbal a terceros y a uno mismo.	9 años	El ácido fólico no demuestra ser efectivo contra los síntomas agresivos y la calidad de vida de los niños que tienen TDAH.

Nota. mg, miligramos; kg, kilogramos; µg, microgramo; TDAH, trastorno por déficit de atención e hiperactividad; pmol/L, nanomol por litro.



2. Hipótesis y Objetivos

Es ampliamente conocido que la nutrición juega un papel fundamental en el desarrollo cognitivo. Los ácidos polinsaturados de cadena larga Omega 3 (n-3 LC-PUFAs) y el ácido fólico son nutrientes esenciales para la maduración y el correcto funcionamiento de sistema nervioso central. Un déficit en estos micronutrientes puede influir de manera negativa en el neurodesarrollo posterior del niño; asimismo, se ha demostrado un que el consumo de DHA y ácido fólico puede mejorar el desarrollo de las redes atencionales.

A pesar de los numerosos estudios que aparecen en la literatura, no hay evidencia científica de los efectos a largo plazo de la suplementación prenatal con DHA o ácido fólico sobre el sistema atencional.

Hipótesis

La suplementación materna con aceite de pescado (500 mg de DHA + 150 mg de EPA) y/o 5-MTHF durante el embarazo influye a largo plazo en el desarrollo de la atención en los hijos hasta los 9 años de edad.

Objetivos

1. Determinar el efecto a largo plazo de los suplementos con aceite de pescado [Fish oil (FO): 500 mg de DHA+150 mg de EPA] y/o 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) durante la gestación, sobre el desarrollo de la *atención* en los hijos a los 7.5, 8.5 y 9 años.
2. Analizar los efectos de diferentes factores confusores prenatales y postnatales sobre el desarrollo de la *atención* en los niños a los 7.5, 8.5 y 9 años de edad, nacidos de madres suplementadas con FO y/o 5-MTHF
3. Estudiar los efectos de la suplementación materna durante la gestación sobre la *red atencional* en sus componentes de función ejecutiva, alerta y orientación mediante registro electrofisiológico (EEG/ERP) a los 8.5 años de edad.



3. Material y Métodos

3.1. Diseño del estudio

El presente estudio forma parte del estudio de intervención multicéntrico, aleatorizado y a doble ciego NUHEAL ("Nutraceuticals for a Healthy Life"; Programme *BIOMED QRLT-1999-00888*); el objetivo y diseño del estudio han sido ampliamente descritos en la publicación de Krauss-Estchmann, et al., 2007. En resumen, el objetivo del estudio consistió en estudiar los efectos de la suplementación prenatal en embarazadas sanas con (n-3) LC-PUFAs y/o 5-methyltetrahydrofolato (5-MTHF), sobre el neurodesarrollo en sus hijos a largo plazo. Para ello, 315 gestantes sanas fueron reclutadas antes de la semana 20 de embarazo en 3 centros europeos (Departamentos de Pediatría de la Universidad de Múnich, Alemania; la Universidad de Pécs, Hungría; y, la Universidad de Granada, España). Los criterios de inclusión consistieron en madres gestantes aparentemente sanas, de edad comprendida entre 18-40 años, con embarazos simples, sin riesgo ni complicación alguna y un peso corporal de entre 50 y 92 Kg al inicio del estudio. Las mujeres no habían recibido suplementos de aceite de pescado (FO) antes de iniciar su participación en el estudio, y cuando recibieron suplementos de ácido fólico y/o vitamina B-12 desde el inicio del embarazo, no siguieron más allá de la semana 16 de gestación.

Las mujeres fueron asignadas aleatoriamente a 4 grupos distintos recibiendo a partir de la semana 20 de embarazo y hasta el momento del parto 1 sobre diario que contenía 15 g de leche en polvo (Blemil Plus Matter; Laboratorios Ordesa), y suplementado con aceite de pescado modificado (FO) {500 mg DHA + 150 mg de ácido eicosapentaenoico (EPA)} (Pronova Biocare), o bien 400 µg 5-methyltetrahydrofolato (5-MTHF) (BASF, Ludwigshafen, Alemania), ambos o un placebo, conjuntamente con vitaminas y minerales en cantidades recomendadas para el embarazo. De las 315 gestantes incluidas en el estudio, 4 fueron excluidas por no cumplir con los criterios de inclusión y 41 no completaron el estudio (FO: n=8, 10.4%; FO+5-MTHF: n=13, 16.9%; 5-MTHF: n=12, 15.6%; y placebo: n=8, 10%; P=0.47); así pues, el número final de participantes hasta el momento del parto y que fueron incluidas en el estudio fue de 270.

Tras el parto, se animó a las madres a que dieran el pecho a sus hijos. Cuando la lactancia materna no fue posible, los bebés recibieron una de las 2 fórmulas infantiles preparadas para el estudio (Blemil Plus NF, Laboratorios Ordesa, S.L.), ambas idénticas excepto por la composición de ácidos grasos. Los niños nacidos de madres del grupo FO and FO+5-MTHF recibieron una fórmula que contenía

0.5% de DHA del total de ácidos grasos y 0.4% de ácido araquidónico (AA), mientras que los hijos de madres que tomaron placebo o 5-MTHF, recibieron una fórmula libre de DHA and AA.

Se obtuvieron 2 mL de sangre materna en las semanas 20 y 30 de gestación, así como en el momento del parto (madre y de cordón umbilical), para la cuantificación de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma (PL), así como en los fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos, {fosfatidicolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE)}.

3.2. Participantes del presente estudio

Cuando los niños nacidos de las madres participantes en el estudio NUHEAL contaban con 7.5, 8.5 y 9 años de edad, se contactó de nuevo con sus madres y se les pidió que volvieran a participar en una nueva exploración (NUHEAL Follow-Up). En el presente trabajo, se presentan los resultados de atención de los niños, obtenidos mediante tests neuropsicológicos (primer estudio: 143 examinados a los 7.5 y 9 años) y EEG/ERP (2º estudio: 130 evaluados a los 8.5 años) (23.5% de la Ludwig-Maximilians University of Munich, Alemania; 5.9% de la University of Pécs, Hungría; y, 70.6% de la Universidad de Granada, España). Después del nacimiento varios niños fueron excluidos del estudio; de estos, 4 niños nacieron prematuros con edad gestacional <35 semanas, un niño nació con un anoftalmos congénito del lado izquierdo, otro desarrolló craneosinostosis y otro fue diagnosticado de sordera del oído derecho. No se observaron diferencias en las tasas de abandono entre los grupos de intervención ($p=0.82$). A los 7.5 años, la razón principal del abandono del estudio fueron cambio de domicilio ($n=16$), pérdida de contacto ($n=74$) o incapacidad de continuar el estudio ($n=30$). A los 8.5 años de edad las principales causas de abandono del estudio fueron el cambio de domicilio ($n=7$); pérdida de contacto ($n=75$); y otros participantes que se negaron a continuar el estudio por otras razones ($n=45$).

El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités de Ética de cada uno de los centros participantes en el estudio (Alemania, Hungría y España). Los consentimientos informados de los padres de todos los participantes del estudio fueron obtenidos antes del inicio del mismo.

3.3. Variables confusoras

Para los nuevos análisis de datos se tuvieron en cuenta las variables confusoras obtenidas en las semanas 20 y 30 de gestación y al nacimiento (datos obstétricos y antropométricos madre-hijo), y una actualización de los datos sociodemográficos. Igualmente, se recogió información sobre el nivel socioeconómico de los padres, tipo de trabajo, posición en el trabajo, nivel cultural y académico,.. Así mismo, los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos fueron administrados en las semanas 20 y 30 de embarazo, así como en el momento del parto.

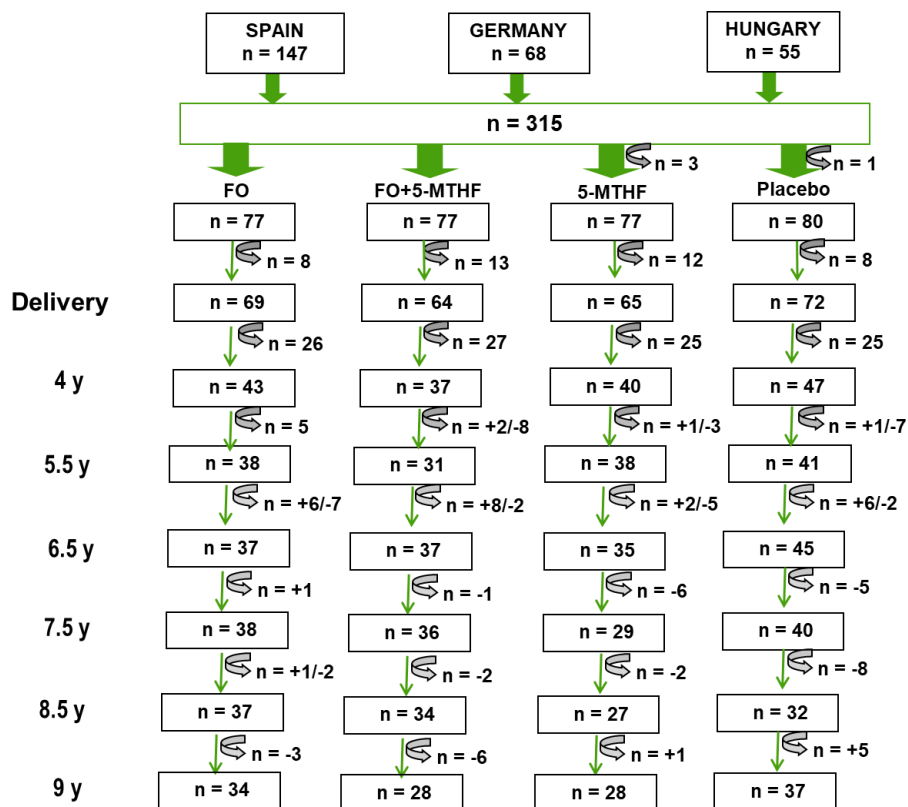


Figura 1. Esquema de la casuística de los grupos de madres e hijos participantes en el Proyecto NUHEAL desde el embarazo hasta los 9 años de edad. Se incluyen las pérdidas de casos durante el seguimiento y los casos finales en cada punto de evaluación.

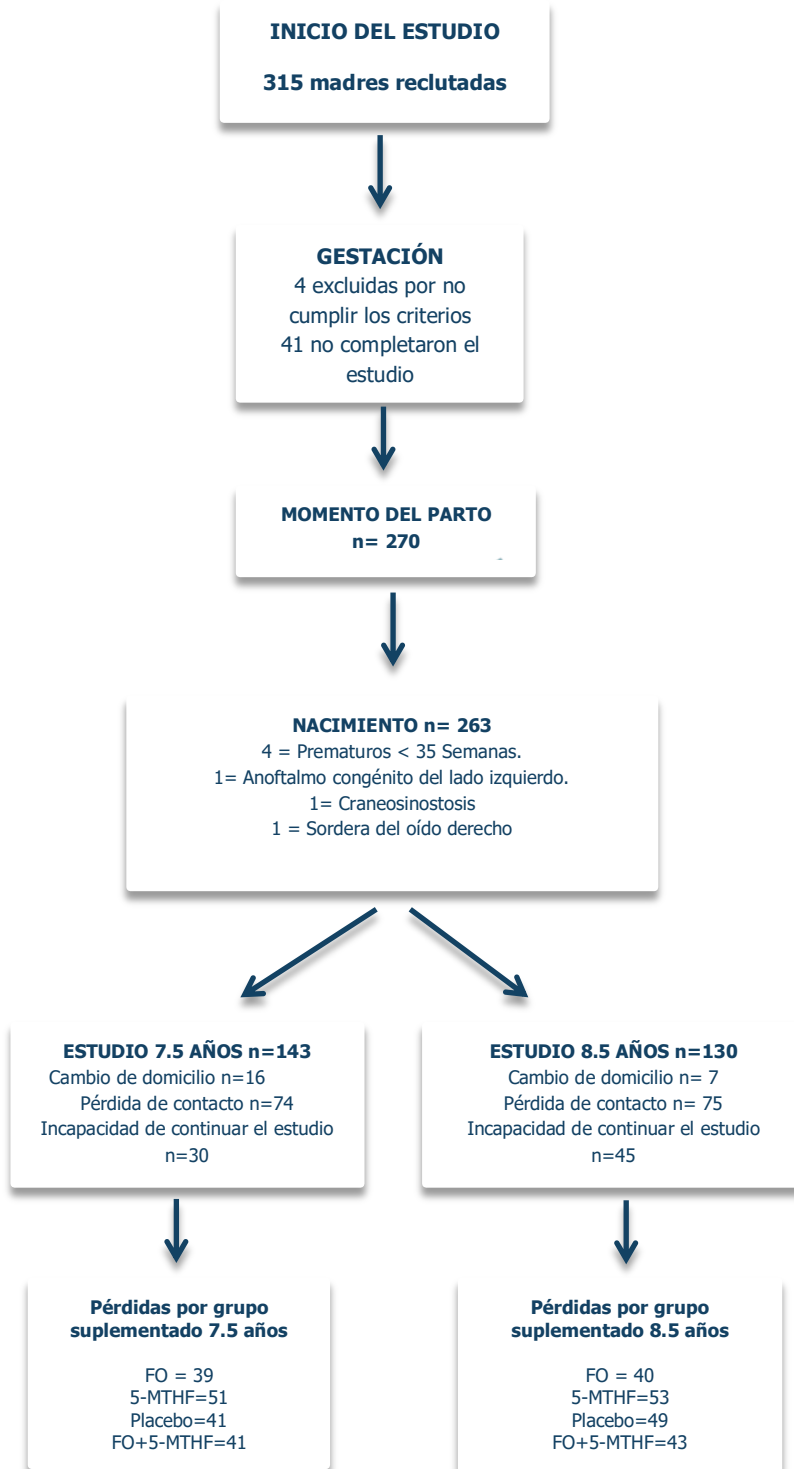


Figura 2. Descripción de la casuística desde el inicio del estudio NUHEAL (madres embarazadas) hasta los 9.5 años de edad de sus hijos.

3.4 Análisis bioquímicos

Para la evaluación de los ácidos grasos en fosfolípidos del plasma (PL) (C20:4n6, C20:5n3, C22:6n3, AA/DHA ratio, n6-PUFA, n3-PUFA, n6/n3 ratio, PUFA>n3, PUFA>n6), status de ácido fólico (plasma y folato total en sangre) y homocisteína, se obtuvieron 10 mL de sangre venosa materna en las semanas 20 y 30 de gestación y en el momento del parto. Igualmente, se recogió sangre de vena umbilical. Las muestras de sangre fueron depositadas en tubos EDTA y procesadas en un intervalo inferior a 2 horas; después del centrifugado de la sangre (3500 x g, durante 10'), se extrajo el plasma y los eritrocitos restantes se lavaron en solución isotónica de cloruro sódico y hemolizada en agua destilada. Tanto el plasma como los eritrocitos fueron almacenados a -80° C para un análisis posterior.

3.4.1. Determinación de lípidos en los fosfolípidos del plasma y en los eritrocitos

La extracción de lípidos se realizó mediante el método de Kolarovic and Fournier. La cromatografía líquida con columnas de aminopropil (Sep Pak Cartridges; Water, Milford, MA) se usaron para el aislamiento de los fosfolípidos del plasma; los fosfolípidos aislados fueron transesterificados por tratamiento con ácido clorhídrico metanólico (Lepage et al., 1989). Los resultados fueron expresados en porcentajes (wt%) del total de ácidos grasos. Las condiciones de análisis fueron descritas previamente (Krauss-Etschmann et al., 2008).

Los lípidos de la membrana de los eritrocitos fueron extraídos mediante cloroformo/methanol y los PL fueron aislados mediante cromatografía de capa fina (TLC) (Folch, et al. 1957). Las Bandas fueron teñidas con diclorofluoresceína, se visualizaron bajo luz UV, y se rasparon para transmetilación. La cuantificación de eritrocitos se realizó mediante cromatografía de gas líquido de alta resolución (GLC) (cromatografía de gases modelo 9001; Finnigan/Tremetrics) con inyección split, muestreado automático (A200SE, CTC Analítico) y un detector de ionización de llama con una columna cianopropilo DB-23 de longitud 60m (J&W Scientific). Las condiciones durante el análisis y estándares utilizados fueron descritos en detalle en otra parte (Jakobik, Burus, & Decsi, 2009). Para la identificación de los picos de la muestra, se utilizaron 2 mezclas de calibración FAME disponibles comercialmente (Supelco 37 de

mezcla de FAME y NU-llegada GLC de referencia 463) que contienen los ácidos grasos medidos en el presente estudio.

3.4.2. Cuantificación de ácido fólico en plasma y concentraciones totales.

Se realizó un ensayo microbiológico usando una cepa resistente a cloranfenicol de *Lactobacillus casei* para la determinación del de ácido fólico.. El coeficiente de variaciónV intra e inter-ensayo fue <11%. Los resultados se expresaron en nmol/L. El análisis de las concentraciones totales de ácido fólico en sangre se realizó mediante la metodología adaptada del método CDC ID-LC-MS/MS (Fazili, Pfeiffer, Zhang, & Jain, 2005; Pfeiffer, Fazili, McCoy, Zhang, & Gunter, 2004). Los resultados fueron expresados en nmol/L.

3.4.3. Cuantificación de Homocisteína en plasma

La determinación del total de homocisteína (tHcys) en plasma, se utilizó un método de dilución isotópica, y los resultados fueron corroborados mediante GC-MS y expresads en $\mu\text{mol/L}$ (Windelberg, Arseth, Kvalheim, & Ueland, 2005).

3.5. Análisis Genético: Polimorfismo MTHFR C677T

El polimorfismo genético MTHFR C677T fue analizado en muestras sanguíneas de las madres y sus hijos (cordón umbilical) obtenidas en el momento del parto. El polimorfismo C677T del gen MTHFR se obtuvo mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa, la digestión con enzimas de restricción, y la separación de fragmento de ADN por electroforesis. Las frecuencias alélicas y distribuciones genotípicas se establecieron en las madres y en los recién nacidos (Miller, Dykes, & Polesky, 1988).

3.6 Evaluación neuropsicológica

Los resultados de las pruebas de atención se obtuvieron a los 7.5 y 9 años mediante la aplicación de una neurobateria descrita a continuación, diseñada para medir varios dominios

neurpsicológicos en niños de 7 a 10 años de 8 países europeos, participantes en el proyecto NUTRIMENTHE. En el presente estudio se han tenido en cuenta los resultados de los tests neuropsicológicos de la batería NUTRIMENTHE destinados a medir la atención en los niños participantes. En concreto, se utilizaron las pruebas Children's Color Trails Test (CCTT) y The Stroop Test.

A los 7.5 y 9 años se administró la neurobatería NUTRIMENTHE, con el fin de evaluar distintos dominios: *percepción, motricidad, atención, memoria, lenguaje, funciones ejecutivas y velocidad de procesamiento* (Tabla 9). En el presente estudio se mostrarán el análisis de los resultados obtenidos en relación a la atención mediante las pruebas Color Trail Making Test y Stroop.

Tabla 9. Neurobatería NUTRIMENTHE administrada en los niños participantes en el estudio NUHEAL a los 7.5 y 9 años.

Domain	Function	Tests
Percepción	Integración visoperceptual	Hooper Visual Organizational Test (HVOT)
Motricidad	Coordinación visomotora	Grooved Pegboard Test (GPT)
Atención	Espacial	Cancellation test
	Sostenida y focalizada	Continuous Performance Task (CPT)
Memoria	Visual episódica	Recall of Objects test (British Ability Scale)
	Auditiva	Auditory Memory of Rey
Lenguaje	Fluidez semántica	Verbal Fluency Test (FAS) Animal Version
	Comprensión verbal	NEPSY's Token test
Funciones ejecutivas	Atención dividida, sostenida, razonamiento no-verbal	Reversal digits (W-M)
		Matrix Analogies (K-ABC II)
		Color Trail Making Test (CTT) **
	Impulsividad / Inhibición	Go no-go
		Stroop **
Toma de decisiones	(Five Digit test) (1-3rd condition) Hungry Donkey Test (HDT)	
Velocidad de procesamiento		Symbol Digit Modality Test

Nota. ** *Tareas usadas en el presente estudio*

3.6.1. Children's Color Trails Test (CCTT) (Llorente et al., 2009)

El Children's Color Trails Test (CCTT) fue desarrollado para hacer frente a la creciente necesidad de un instrumento infantil con el fin de evaluar la atención (Voigt et al., 2001), secuenciación, y las funciones ejecutivas reduciendo así el efecto del lenguaje y otros componentes culturales. El CCTT es bastante similar a la versión original del Trail Making Test (TMT) (Reitan & Wolfson, 1992), pero

substituye el uso de colores por el uso de letras del alfabeto anglosajón, incrementando la idoneidad de la prueba para un uso transcultural y en poblaciones con necesidades especiales.

El CCTT está firmemente asentado en el desarrollo infantil, la teoría evolutiva, neuropsicología evolutiva y neurología infantil. Las características más destacadas, color y número, se eligieron ya que son más fáciles de procesar y reconocer por los niños. Una amplia investigación confirma que el reconocimiento del color y número es consistente con la maduración cognitiva de los niños pequeños. La prueba cumple con las consideraciones psicométricas planteadas por otros teóricos dedicados a la investigación de pruebas infantiles destinadas a medir la atención, incluyendo la mejora de la evaluación de los niños que son analfabetos, que se encuentran en contextos interculturales o cuya lengua materna no es el Inglés, y aquellos que sufren de déficit neurológico incluyendo lenguaje y dificultades de aprendizaje.

3.6.1.1 Propiedades psicométricas

Aunque existen datos relacionados con las propiedades psicométricas del CCTT en poblaciones no-clínicas o sanas (Llorente et al., 2009), hay una escasez de información acerca de las propiedades del CCTT en situaciones clínicas. Williams et al. (1995) examinaron su validez discriminativa en niños con TDAH, TDAH/PA, y patologías neurológicas más severas, además de su validez concurrente con otra prueba grafomotora (Reitan, 1979; Reitan & Herring, 1985). Sin embargo, no examinaron la fiabilidad del test-retest del CCTT. Así pues, los efectos de la aplicación repetida del CCTT aún son desconocidos. Aunque el CCTT tiene como propósito medir una variedad de dominios neuropsicológicos, incluyendo la atención y la flexibilidad cognitiva, se conoce poco de su validez factorial cuando es empleado para la detección de diversas patologías. Llorente et al. en 2012 realizaron un estudio en niños con TDAH utilizando como herramienta el CCTT, y usando intervalos largos de aplicación del test (8 y 16 semanas). El Test-retest en las puntuaciones de interferencia mostraron una mayor fiabilidad de la prueba (moderada–alta), lo que satisface los niveles recomendados para el propósito clínico de toma de decisiones.

3.6.2 The Stroop Test (Golden & Freshwater, 1978)

La prueba del Stroop es comúnmente usada para medir la atención de las personas (Ryan & Nelson, 2008), respecto a la lectura de palabras y el nombramiento con o sin interferencia de colores. Consta de tres partes; las tres son siempre presentadas en el mismo orden de secuencia: Color (Parte C), Palabras (P) y Palabra/Color (PC). Se instruye al sujeto a leer o nombrar el nombre del color lo más rápido posible. Los errores en el nombramiento de colores de cada parte son corregidos por el mismo sujeto, y posteriormente se le indica que prosiga lo más rápido posible con la lectura. El experimentador anota el número de errores y el tiempo requerido para cada sección.

3.6.2.1 Propiedades psicométricas

El constructo que evalúa el Test de Stroop es el control inhibitorio de la interferencia, el cual está supeditado a dos funciones cognitivas, funciones ejecutivas y atención, presentando ambas un carácter evolutivo, es decir, tienden a mejorar paralelamente a la maduración del Sistema Nervioso (Sell - Salazar, 2003). Es por esto, que diversas investigaciones que han utilizado el Test de Stroop observan que el rendimiento en éste aumenta progresivamente con la edad, por lo tanto, teóricamente la comparación entre dos grupos diferentes según la edad debería otorgar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados (Armengol, 2002; Golden, 2001; Gómez – Pérez, et al., 2006; MacLeod, 1991 ; Wright y Wanley, 2003).

En la traducción, adaptación y validación española del Stroop realizada por el Departamento I+D de TEA Ediciones en 1994 (en adelante TEA) para población general, se encontraron puntuaciones medias de P=118 (DT=18), C= 77 (DT=14), PC=49 (DT=10) e Interacción (INT)=2.70 (DT=8.53); los resultados para esta validación fueron superiores a muestras americanas, el estudio encontró diferencias significativas para INT en varones con 3.63 y mujeres 1.88, pero no hubo diferencias significativas para P, C y PC en la variable sexo. TEA (1994) señaló que en relación a niños y ancianos se hace necesario contar con muestras más representativas para llegar a datos más concluyente.

3.7. Estudio neurofisiológico

A los 8.5 años, se evaluó la *atención comportamental* (eficiencia atencional y errores) mediante la versión infantil del *Attention Network Test (ANT)* y durante el desempeño de esta prueba, se recogieron datos de *ERP* (Event Related Potentials). También se realizó el análisis de la localización de la fuente y neuroimagen.

La adquisición y análisis de los EEG a los 8.5 años se registró usando un sistema activo de grabación de 64 canales de EEG *Active Two BioSemi EEG recording system* (BioSemi, V.O.F., Amsterdam, Netherlands) utilizando una frecuencia de muestreo de 1024 Hz y un filtro de paso bajo 100 Hz. Los detalles online relacionados con el método de referencia pueden ser encontrados en <http://www.biosemi.com/faq/cms&drl.htm>. Los datos en bruto del EEG fueron filtrados en paso de banda 0.5-25, bajo muestreo a 256 Hz, y re-referenciados a la media. Los *spherical splines* fueron usados para corregir los canales fallidos (4.7% en promedio), detectados tras la inspección ocular. Se obtuvieron segmentos desde -200 to +800 ms post-objetivo. Se utilizaron *Epochs* para corregir los ensayos con amplitudes (rangos máximos entre -100 a +100 mv); así como para calcular SOBI ICA (Tang, Liu, & Sutherland, 2005) y luego se sometieron a un procedimiento de AJUSTE (Mognon, Jovicich, Bruzzone, & Buiatti, 2011) para la eliminación automática de artefactos oculares. Los ERP fueron obtenidos sacando una media de *epochs* para las tres condiciones de flanco: *Congruente, Incongruente y Neutral*, además de las cuatro señales de condiciones de aviso: *sin señal, espacial, doble y señal central*. La eficiencia en la formas de onda de la red de conflicto, fueron calculadas restando los ERP's congruentes de los incongruentes. La puntuaciones de la red de Orientación fueron obtenidas restando las condición espacial de la condición de doble señal de aviso. Las puntuaciones de la red de Alerta fueron obtenidas restando la señal central y la condición sin señal.

El análisis de ERP fue realizado en un procedimiento de tres pasos. Primero, utilizamos un enfoque univariado de masas (5000 muestras aleatorias), un procedimiento que protege contra la comparación múltiple de problemas (Groppe, Urbach, & Kutas, 2011) combinado un análisis clásico de la varianza para desvelar los potenciales efectos de la suplementación temprana sobre los índices electrofisiológicos del cerebro y para determinar las ventanas en las cuales dichos efectos aparecen. Se utilizó la tomografía electromagnética de baja resolución (sLORETA), (Pascual-Marqui, 2002) para estimar las áreas cerebrales potencialmente responsable de los efectos observados del cuero cabelludo.

El software reporta las coordenadas del Montreal Neurological Institute (MNI). Las imágenes del sLORETA representan la actividad eléctrica en cada voxel como la magnitud normalizada al cuadrado de la densidad de corriente estimada. Concentramos nuestro interés en los intervalos post objetivo de 200-550 como diferencias en las amplitudes de ésta ventana entre las condiciones congruentes e incongruentes que fueron asociadas a las funciones cerebrales atencionales (Braver, et al. 2001; Falkenstein, et al. 2000; Folstein & Van, 2008; Jones, et al. 2002; Lo et al., 2013; Patel & Azzam, 2005). La estimación de la actividad cerebral sLORETA, en el tiempo de intervalo de interés, fueron también sometidos a un t-test de masa univariado (5000 muestras aleatorias) para cerciorarse qué áreas del cerebro pueden dar cuenta de las diferencias observadas entre los grupos de ERP. Teniendo en cuenta un análisis de control univariado para los múltiples problemas comparativos usando una distribución empírica de la estadística t (Groppe et al., 2011).

3.7.1 The attention network test (ANT)

Los EEG, los tiempos de reacción y la precisión de las respuestas fueron recogidas mientras los participantes ejecutaban la versión infantil de (Rueda et al., 2004) ANT (Fan et al., 2002). La prueba fue diseñada para evaluar las tres redes de la atención: *ejecutiva, alerta y orientación*. Brevemente, un objetivo de un conjunto horizontal de peces (un objetivo central rodeado a cada lado por dos distractores) o un pez único fueron presentados encima o debajo de una cruz central fija (Figura 3). El objetivo era precedido por una de cuatro señales de advertencia: un asterisco central único, un doble asterisco encima y debajo la fijación, sin asterisco, o un asterisco espacial único localizado en la misma posición del objetivo entrante. Los participantes debían presionar el botón del ratón indicando si pez objetivo central apuntaba a la derecha o a la izquierda. Después de la visualización del objetivo se presentaba un *feedback* auditivo y visual. Después de una práctica de 24 ensayos, cada participante ejecutó tres bloques de 48 ensayos cada uno. Cada bloque consistía en 16 ensayos para cada condición flanco objetivo: *incongruente* (el objetivo del pez central apunta al lado opuesto al del pez flanco) *congruente* (todos los peces apuntan al mismo lado), y *neutral* (pez único). En cada bloque habían 12 ensayos para cada condición de señal de aviso. La señal de aviso y la condición de se cruzaron en una formación factorial, de manera de que para cada bloque hubiesen 4 ensayos para cada condición

experimental de la señal de flanco. La matriz de destino subtendía aproximadamente a 8.84° (1.6° cada pez, con un espacio de 0.2°), y fue presentado 1° por encima o debajo de la cruz fija, hasta que el participante emitía una respuesta o hasta un máximo de 1700 ms. La señal de aviso (0.3°) fue presentada durante 80 ms y comenzó 400 ms antes de la de aparición del objetivo.

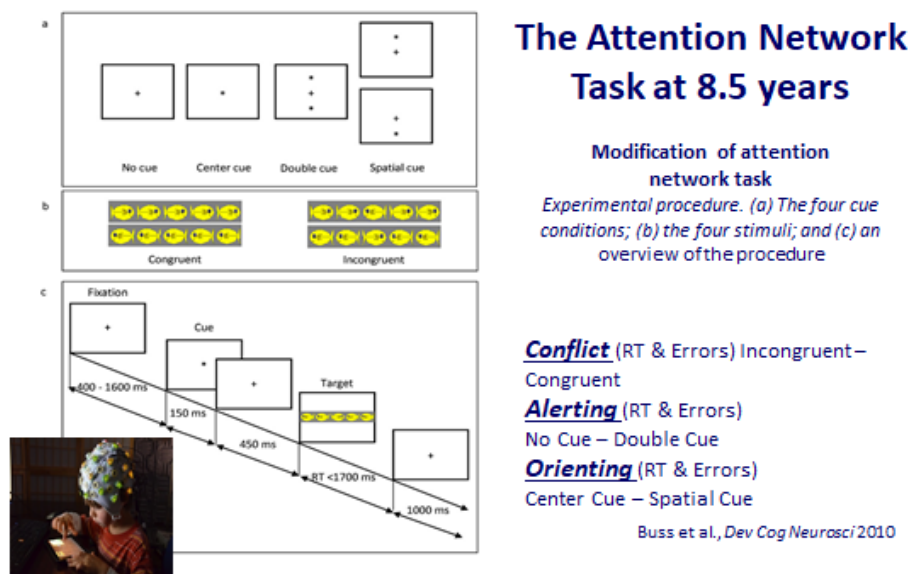


Figura 3. Prueba EEG/ERP para la evaluación de la red atencional en niños de 8.5 años de edad.

La tarea completa dura alrededor de 25 minutos. Se pidió a los participantes que mantuvieran fija la atención en la cruz central de la pantalla a lo largo de la tarea, para prestar atención al pez central, y responder lo más rápido y certero posible. Las puntuaciones de eficiencia fueron ambas calculadas para tiempos de reacción y el porcentaje de errores para cada participante restando las puntuaciones *Congruentes e Incongruentes* (de aquí en adelante, puntuación de Conflictos), restando la señal central de las puntuaciones de señales espaciales (de aquí en adelante, puntuación de Orientación), y sin restar ninguna señal de las puntuaciones con doble señal (de aquí en adelante, puntuación de Conflictos).

3.8. Metodología Estadística

3.8.1. Cálculo de la potencia estadística

Mediante un procedimiento estándar, el cálculo de la potencia estadística para el presente estudio se calculó, considerando un valor α de 0.05 y un valor β de 0.2. Los 4 grupos de intervención (FO, 5-MTFH, FO+5-MTHF) fueron agrupados y comparados frente al grupo placebo para las diferentes tareas realizadas en los tests neuropsicológicos aplicados (CCTT, SCWT) en niños de 7.5 años de edad. Se obtuvo una potencia estadística del 80% para estas tareas en la población de estudio.

La potencia estadística para el presente estudio de intervención se calculó según la siguiente fórmula¹:

$$1 - \beta = \Phi(z - z_{1-\alpha/2}) + \Phi(-z - z_{1-\alpha/2}), \quad z = \frac{\mu_A - \mu_B}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}}$$

Φ es la función de distribución Normal estándar; Φ^{-1} es la función cuantile Normal estándar; α es el error Tipo I y β es el error Tipo II, significando que $1-\beta$ es la potencia. La table 10 muestra los resultados obtenidos, donde z indica el cálculo de potencia estadística, considerando $\alpha= 0.05$ y $\beta= 0.2$ (80%).

Tabla 10. Cálculo de la potencia estadística obtenida para la evaluación de los tests neuropsicológicos realizados en los niños participantes en el proyecto NUHEAL a los 7.5 años de edad.

Tests neuropsicológicos 7.5 years	Pooled Intervention group (FO+5MTHF+MIX) Mean \pm SD	Placebo group Mean \pm SD	z
CCTT-1 (sc)	86.12 \pm 41.12	99.88 \pm 50.77	0.80
STROOP Test – hits -1 (Word-Reading)	60.13 \pm 14.85	59.34 \pm 16.41	0.80
STROOP Test – hits -2 (Color-Naming)	41.30 \pm 8.12	41.95 \pm 8.41	0.80
STROOP Test – hits -3 (Color-Word)	21.19 \pm 6.09	24.20 \pm 6.34	0.80

Valores expresados como media \pm desviación estándar; FO: Fish-oil; 5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; CCTT: Children's Color Trails test; z = potencia estadística calculada.

¹Chow S, Shao J, Wang H (2008) Sample size calculations in clinical research. 2nd Ed. Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series, page 8

3.8.2. Análisis estadístico

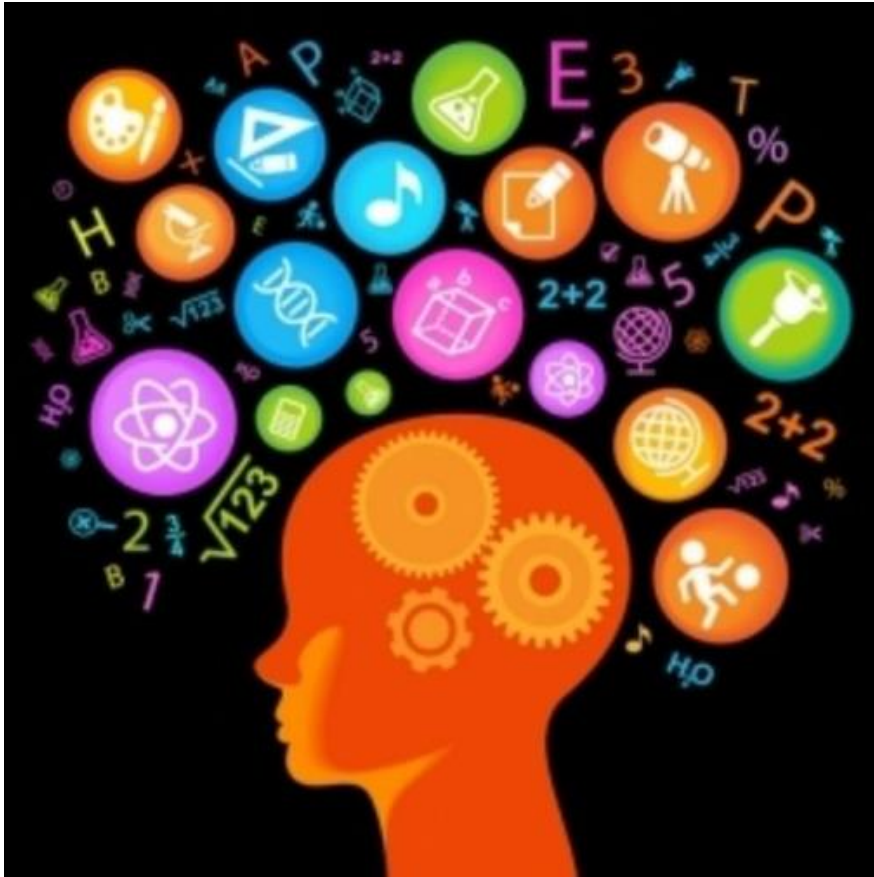
Para las variables continuas y discretas se empleó el procedimiento de estadística descriptiva para hallar los parámetros muestrales fundamentales: *media, desviación estándar, error estándar de la media, valores mínimo y máximo, centiles, mediana, y rangos intercuartiles o de amplitud*. Se empleó el test de normalidad de Kolmogorv-Smirnov para asegurar que las variables estudiadas seguían una distribución normal; en caso contrario se transformaron los datos (*logaritmo, seno, arcoseno...*) o se aplicaron procedimientos no paramétricos. En el caso de variables cualitativas se calculó la frecuencia de distribución.

La comparación entre los diferentes grupos de tratamiento (FO, 5-MTHF, FO+5-MTH o placebo) se realizó un ANOVA de una vía para las variables continuas o el test de Chi² para el análisis de variables categóricas. Para verificar la hipótesis de la varianza correspondiente (homogeneidad de la varianza y normalidad), se realizó la transformación de Box-Cox cuando fue necesario. Cuando el ANOVA resultó significativo, se aplicó la corrección post-hoc del test de Bonferroni.

Se realizó un modelo multivariante de regresión lineal múltiple para analizar los efectos independientes de las diferentes co-variables y factores confusores, incluyendo la edad materna, nivel de educación materno, tabaco, IMC de la madre, tipo de parto, edad gestacional, y sexo del niño. Estos factores confusores con un nivel de significancia de $p < 0.05$ se incluyeron en el modelo final para los análisis multivariantes. Las variables de velocidad de procesamiento obtenidas a partir de los tests SDMT, CCTT-1 y SCWT fueron considerados como variables dependientes.

Considerando la estructura jerárquica de los datos (medida de la velocidad o aciertos en la respuesta en los niños de 7.5 y 9 años), se utilizó el modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel), donde los niños fueron considerados como nivel 1 y cada uno de los dos momentos en los que se hicieron las medidas se fijaron como segundo nivel. El tiempo (7.5 y 9 años) se usó como factor de efectos fijos. El modelo de regresión logística se usó cuando las variables dependientes se dicotomizaron (por debajo o por encima de la media o del 3er cuartil), y en tal caso la medida de los efectos resultó la correspondiente odds ratio con su intervalo de confianza correspondiente. Las interacciones entre grupos de suplementación prenatal y las variables confusoras se analizaron en cada análisis multivariante realizado.

Para el estudio de la dependencia de las distintas variables se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson. En todos los casos, se consideró un resultado significativo cuando el valor P (nivel de significación) era inferior o igual a 0.05. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el paquete estadístico STATA 12.1 (Stata Corp, College Station, TX) y el software estadístico R version 3.2.2.



4. Resultados

4.1 **Estudio 1. Atención a los 7.5 y 9 años de edad, en niños cuyas madres fueron suplementadas durante la gestación con aceite de pescado y/o 5-MTHF**

La Tabla 11 recopila las características de la población de estudio a los 7.5 (*tests neuropsicológicos*), en los 4 grupos establecidos según la suplementación nutricional que recibieron las madres. El estudio de EEG/ERP se llevó a cabo a los 8.5 años, y a los 9 años se repitió la evaluación neuropsicológica. No se observaron diferencias significativas en las características basales de los niños entre los 4 grupos de estudio, excepto en las concentraciones plasmáticas de ácido fólico en sangre materna en el momento del parto, que resultaron significativamente más altas en los 2 grupos de madres suplementadas con 5-MTHF durante la gestación.

En la Tabla 12 se muestran las diferencias entre los diferentes grupos de suplementación materna en las tareas de atención medidas en sus hijos a los 7.5 y 9 años de edad, mediante los tests: Children Color Trail Test prueba 1 (CCTT-1) y prueba 2 (CCTT2), Stroop Palabra (P), Stroop Color (C) y Stroop Palabra/Color (P/C). A los 9 años, los niños nacidos de madres que recibieron el suplemento de FO, muestran un mejor rendimiento en la prueba CCTT-1 al resultar significativamente más rápidos en su respuesta respecto al grupo FO+5-MTHF ($p=0.04$). No se observaron otras diferencias significativas entre los grupos de estudio en el resto de las pruebas realizadas.

En la Tabla 13 se observan los resultados obtenidos tras realizar un modelo de análisis de regresión lineal multivariante de efectos fijos (multinivel), de la atención mediante los tests *Children Color Trail Test prueba 1* (CCTT-1) y prueba 2 (CCTT-2) considerando en el nivel 1 el grupo de suplementación, y en el nivel 2 el momento de la evaluación (7.5 y 9 años). Los resultados de la prueba CCTT-1 y CCTT-2 muestran un mejor rendimiento en el tiempo de respuesta en los niños evaluados a los 9 años respecto a los 7.5 años ($P\text{-value} < 0.000$). A mayor edad materna los hijos resultaron más rápidos en la resolución del test de atención CCTT-2 ($P\text{-value}=0.008$). La condición de madre fumadora fue muy determinante en el desarrollo de las pruebas de atención de sus hijos a los 7.5 y 9 años de edad; los niños nacidos de madres fumadoras mostraron un peor rendimiento en los tests de atención CCTT-1 ($P\text{-value}=0.001$) y CCTT-2 ($P\text{-value}=0.022$) realizados a los 7.5 y 9 años. Los niños nacidos por cesárea o mediante parto instrumental con fórceps presentaron un mejor rendimiento en las pruebas de atención medidas por el CCTT-2. Finalmente, se comprueba un efecto significativo del índice AA/DHA

en la fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana de los eritrocitos maternos en el momento del parto, sobre el rendimiento en las pruebas de atención de los niños a los 7.5 y 9 años, tanto en CCTT-1 (P -value=0.019) como en CCTT-2 (P -value=0.008). Los niños cuyas madres presentaron niveles más altos del índice AA/DHA-PE en el momento del parto son más rápidos en resolver las pruebas de atención realizadas.

La comparación entre grupos siguiendo este modelo de regresión lineal multivariante de efectos fijos, demostró que la suplementación materna con FO determinó en sus hijos un mejor rendimiento en el test CCTT-1 a los 9 años, respecto a los niños cuyas madres fueron suplementadas exclusivamente con 5-MTHF {Coeficiente regresión: 19.24 (IC 95%: 1.31; 37.18), P -value=0.035} o aquellas que recibieron FO+5-MTHF {Coeficiente regresión: 20.33 (IC 95%: 1.93; 38.73), P -value=0.030}. Respecto a los resultados del test CCTT-2, a los 7.5 años, los niños cuyas madres recibieron placebo, mostraron un mejor rendimiento en esta prueba de atención frente a los nacidos de madres suplementadas con FO {Coeficiente regresión: -34.99 (IC 95%: -63.69; -6.28), P -value=0.017} o con 5-MTHF {Coeficiente regresión: -31.65 (IC 95%: -61.62; -1.68), P -value=0.038}.

Tabla 11. Características generales, antecedentes perinatales y socioculturales de los 143 niños participantes en el proyecto N evaluados a los 7.5 años de edad. Diferencias entre los grupos de estudio establecidos según del tipo de suplementación que recibieron durante la gestación.

	FO (n=38)	5-MTHF (n=29)	Placebo (n=40)	FO+5-MTHF (n=36)
Centro [n (%)]				
España	25 (68.42)	21 (72.41)	26 (65.00)	26 (72.22)
Alemania	9 (23.68)	7 (24.14)	11 (27.50)	7 (19.44)
Hungría	3 (7.89)	1 (3.45)	3 (7.50)	3 (8.33)
Madre				
Edad materna (años)¹	28.81±5.25	30.70±5.68	30.71±3.90	29.56±4.32
IMC Materno (20 sem) (kg/m²)¹	26.03±3.62	24.92±2.45	24.74±2.28	25.28±2.77
IMC Materno (30 sem) (kg/m²)¹	28.52±3.91	26.87±2.43	26.91±2.29	27.23±2.86
Hematocrito (30 sem)¹	33.85±3.73	32.61±5.14	33.13±2.75	33.37±2.58
Paridad, n (%)				
0	23 (60.5)	23 (79.3)	28 (70.0)	28 (93.3)
≥1	3 (7.9)	3 (12.5)	4 (10.0)	2 (5.5)
Tabaco (20 sem), (Sí) n (%)	7 (18.4)	5 (17.2)	4 (10.0)	7 (19.4)
Factores de riesgo embarazo (20 sem), n (%)				
No factores de riesgo	6 (15.8)	6 (20.7)	11 (27.5)	8 (22.2)
≥1 factor de riesgo	18 (47.4)	18 (62.1)	21 (52.5)	22 (61.1)
Morbilidad Perinatal, n (%)				
Ninguna	26 (81.25)	23 (88.46)	26 (83.87)	25 (83.33)
Prematuridad (>35 & <37 sem)	4 (12.50)	3 (11.54)	4 (12.90)	1 (3.33)
Otros	2 (6.25)	0 (0)	1 (3.23)	4 (13.33)
Área de residencia, n (%)				
Urbana	15 (40.54)	13 (48.15)	14 (41.18)	10 (31.25)
Rural	22 (59.46)	14 (51.85)	20 (58.82)	22 (68.75)
Nivel educativo materno alto, n (%)	8 (21.15)	8 (27.6)	10 (25.0)	14 (38.9)
Nivel educativo paterno alto, n (%)	20 (54.1)	10 (37.0)	10 (30.3)	11 (34.4)
Estado familiar, n (%)				
Monoparental	8 (21.1)	8 (27.4)	10 (25.0)	1 (2.7)
En pareja	23 (60.5%)	23 (44.8%)	29 (72.5%)	29 (80.6%)

Índice AA/DHA-PE^{1,2}	0.90±0.38	1.13±0.54	1.14±0.63	0.97±0.42
Ácido fólico plasmático (µg/L)^{1,2}	6.17±4.33	12.10±5.55	6.06±0.82	13.46±5.78
tHcy (µmol/L)^{1,2}	7.08±2.83	6.29±2.81	6.78±2.39	6.93±3.09
Recién nacido				
Edad Gestacional¹	38.90±1.51	38.75±1.62	39.43±1.43	38.73±2.06
Sexo (niña), n (%)	15 (40.54)	14 (51.85)	20 (58.82)	14 (43.75)
Apgar 1' min ¹	8,57±1,26	9,08±0,63	8,33±1,96	8,72±0,92
Apgar 5' min ¹	9,68±0,67	9,77±0,65	9,55±1,09	9,77±0,43
Peso (g) ¹	3228,11±560,48	3358,08±411,65	3157,58±437,09	3370,09±410,00
Longitud (cm) ¹	50,57±3,45	51,46±2,08	50,97±2,90	51,23±2,06
Circunferencia craneal (cm) ¹	34,39±2,01	34,76±1,52	34,59±1,60	34,77±1,39
Tipo de alimentación, n (%)				
Materna	14 (46.67)	10 (38.46)	16 (59.26)	13 (52.00)
Mixta	9 (30.00)	7 (26.92)	5 (18.52)	5 (20.00)
Fórmula	7 (23.33)	9 (34.62)	6 (22.22)	7 (28.00)

IMC: Índice de masa corporal; Hto: Hematocrito; FO: Aceite de Pescado; 5-MTHF: 5-metil-tetrahidrofolato. AA: ácido araquidónico ligado a la membrana del hematíe; DHA: ácido docosahexaenoico ligado a la fosfatidiletanolamina en la membrana del hematíe; tHcy: Homocisteína en la membrana del hematíe; P= diferencias entre grupos; P<0.05: mínimo nivel de significancia estadística. Análisis de variables categóricas cualitativas mediante test ANOVA de una vía.

¹: Valores expresados en media ± desviación estándar; ²: Valores obtenidos en sangre materna en el momento del parto.

Tabla 12. Diferencias observadas en el tiempo de respuesta o número de aciertos en las tareas de atención realizadas por los niños a los 7.5 y 9 años de edad, medidas mediante diferentes pruebas neuropsicológicas, entre los diferentes grupos de suplementación.

		FO (n=38)	5-MTHF (n=29)	Placebo (n=40)	FO+5-MTHF (n=36)	F	P
CCTT-1 (segundos)	7.5 años	107.0±58.0	86.5±30.0	100.0±51.0	98.0±37.0	1.21	0.30
	9 años	57.3±17.0	66.8±24.0	66.6±26.0	73.2±24.3	2.58	0.04*
CCTT-2 (segundos)	7.5 años	227.6±87.0	196.0±80.0	203.2±83.7	202.3±63.3	1.11	0.34
	9 años	143.8±40.2	141.2±49.8	145.5±61.8	150.1±52.3	0.15	0.92
Stroop P (aciertos)	7.5 años	59.5±17.4	61.5±11.5	59.3±16.4	57.5±16.0	0.35	0.79
	9 años	70.8±12.6	71.4±10.1	73.7±9.7	72.0±8.7	0.49	0.69
Stroop C (aciertos)	7.5 años	39.5±7.98	42.0±7.1	42.0±8.4	42.1±9.1	0.86	0.46
	9 años	48.6±7.8	49.1±9.3	51.4±8.0	50.4±8.4	0.80	0.49
Stroop P/C (aciertos)	7.5 años	20.4±7.30	21.8±6.7	24.1±6.3	21.7±5.7	2.35	0.07
	9 años	27.5±6.1	29.0±5.3	28.5±6.4	29.0±6.1	0.45	0.71

Datos expresados en media ± desviación estándar; FO: Aceite de pescado; 5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; CCTT-1 – Children Color Trail Test Parte A; CCTT-2 – Children Color Trail Test Parte B; Stroop Palabra (P), Stroop Color (C), Stroop Palabra/Color (P/C); F: F de Snedecor; P: Nivel de significancia; P<0.05= estadísticamente significativo.

Tabla 13. Modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel) para el análisis de la **Atención** mediante los tests *Childre* *Test prueba 1* (CCTT-1) y prueba 2 (CCTT-2) considerando en el nivel 1 el grupo de suplementación, y en el nivel 2 el momento de la prueba (7.5 y 9 años). Análisis del efecto de las diferentes variables confusoras.

Variables	Categorías	CCTT-1				CCTT-2			
		b	IC 95%		P-value	b	IC 95%		
			LI	LS			LI	LS	
Grupo de estudio	Placebo	0	-	-	-	0	-	-	
	FO	-12.60	-31.22	5.84	0.180	6.27	-27.33	39.87	
	5-MTHF	-8.44	-27.01	10.14	0.373	25.12	-8.58	58.82	
	FO+5-MTHF	-15.25	-36.34	5.84	0.156	-7.67	-45.88	30.53	
Edad niño	7.5 años	0	-	-	-	0	-	-	
	9 años	-34.01	-46.93	-21.10	0.000	-52.85	-76.62	-29.08	
Grupo estudio * edad niño	Placebo	0	-	-	-	0	-	-	
	FO	-13.57	-33.43	6.29	0.180	-21.58	-58.11	14.95	
	5-MTHF	16.41	-3.56	36.38	0.107	-16.14	-52.90	20.62	
	FO+5-MTHF	15.28	-5.05	35.61	0.141	-3.00	-40.41	34.40	
Edad Materna (años)		-0.796	-1.97	0.38	0.183	-3.19	-5.30	-1.08	
Fumadora	No	0	-	-	-	0	-	-	
	Sí	23.44	9.43	37.45	0.001	29.56	4.29	54.84	
Maternal Education	None + Primary	0	-	-	-	0	-	-	
	Secondary or >	-7.92	-19.22	3.38	0.170	-28.49	-48.88	-8.09	
dIMC		-0.62	-3.41	2.18	0.666	-1.64	-6.69	3.40	
Tipo de parto	Espontáneo	0	-	-	-	0	-	-	
	Fórceps	-5.92	-25.08	13.24	0.545	-44.72	-79.26	-10.19	
	Vacuum	16.41	-3.56	36.38	0.107	9.89	-23.98	43.74	
	Cesárea	15.28	-5.05	35.61	0.141	-28.95	-50.28	-7.62	
Sexo	Niña	0	-	-	-	0	-	-	
	Niño	6.06	-3.98	16.10	0.237	7.11	-11.01	25.23	

Edad Gestacional (sem)		3.22	-0.054	6.49	0.054	-2.95	-8.86	2.95
AA/DHA-PE^{1,2}		-27.87	-51.13	-4.61	0.019	-56.41	-98.35	-14.46
Polimorfismo FADS1 rs174556		-7.15	-15.15	0.86	0.080	7.06	-7.37	21.50
Ácido fólico plasmático (µg/L)¹		-0.026	-1.48	0.95	0.674	-1.17	-3.37	1.01
Polimorfismo MTHFR 677 C/T		0.37	-7.04	7.78	0.922	1.47	-11.91	14.84
tHcys (µmol/L)¹		-1.06	-3.39	1.27	0.371	0.04	-4.16	4.25

CCTT-1 – Children Color Trail Test Parte 1; CCTT-2 – Children Color Trail Test Parte 2; FO: Fish Oil (Aceite de pescado); 5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; diferencia en el índice de masa corporal entre las semanas 20 y 30 de gestación; índice AA/DHA-PE: AA: Ácido araquidónico ligado a fosfatidiletanolamina en la membrana del hematíe; DHA: Ácido docosahexaenoico ligado a fosfatidiletanolamina en la membrana del hematíe; FADS: Desaturasas de los ácidos grasos; 5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato reductasa; tHcys: Homocisteína total; b: coeficiente de regresión; IC: Intervalo de confianza; LI: límite inferior; LS: límite superior; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns: no significativa; ¹: valores obtenidos de las madres en el momento del parto; ²: ácidos grasos medidos como % del total de ácidos grasos.

En la Tabla 14 queda reflejado el Modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel) para el análisis de la Atención mediante las pruebas *Stroop 1 – Palabra*, *Stroop 2 - Color*, *Stroop 3 – Palabra/Color*, considerando en el nivel 1 el grupo de suplementación, y en el nivel 2 el momento de la evaluación (7.5 y 9 años). También se muestra el análisis del efecto de las diferentes variables confusoras. La suplementación materna con FO o con 5-MTHF de forma individual determinó en los hijos una peor puntuación en la prueba de atención Stroop Palabra/Color ($P\text{-value}=0.020$ y $P\text{-value}=0.018$, respectivamente) respecto al grupo placebo. Los niños nacidos de madres suplementadas con FO+5-MTHF no mostraron diferencias significativas respecto a ninguno de los otros 3 grupos de estudio.

Por otra parte, los resultados de las pruebas Stroop Palabra, Stroop Color y Stroop Palabra/Color mostraron un mejor rendimiento (medido en aciertos) en los niños a los 9 años de edad respecto a cuando tenían 7.5 años ($P\text{-value}=0.000$).

Los niños puntuaron peor que las niñas en el Stroop Palabra {Coeficiente: -4.94 [95% IC: -9.06; -0.81] ($p<0.019$)}.

Se pudo comprobar el efecto del tabaco durante la gestación sobre el nivel de desarrollo de la atención de los hijos medida a los 7.5 y 9 años de edad. Los hijos de madres fumadoras obtuvieron más aciertos en el test de atención Stroop-Palabra/Color {Coeficiente: 3.074 [95% IC: 0.43; 5.72] ($p<0.023$)}.

El índice AA/DHA en la fosfatidiletanolamina (PE) materno en el momento del parto, se asoció de forma positiva a una mejor atención en los niños al obtener mayor número de aciertos en el test Stroop Color {Coeficiente: 6.55 [95% IC: 0.50; 12.60] ($p<0.034$)}. Las concentraciones de tHcys de la madre en el momento del parto se asociaron a una peor puntuación en el test Stroop Palabra {Coeficiente: 3.074 [95% IC: 0.43; 5.72] ($p<0.025$)} (Tabla 14).

Las comparaciones por parejas para las puntuaciones en los tests CCTT y Stroop entre el tipo de suplementación y a los diferentes momentos se muestran en la Tabla 15. En el caso del CCTT 1 se encontró que tanto el grupo suplementado con FO {Coeficiente: -34.68 [95% IC: -63.69; -6.28] ($p<0.017$)} como grupo suplementado con 5-MTFH {Coeficiente: -31.65 [95% IC: -61.62; -1.68] ($p<0.038$)} rendían mejor que el placebo a los 9 años, no encontrándose otras comparaciones estadísticamente significativas.

Por otra parte, los resultados para la prueba Stroop Color mostraron que tanto el grupo suplementado con FO {Coeficiente: 4.44 [95% IC: 0.06; 8.83] ($p < 0.04$)}, como el grupo suplementado con 5-MTFH {Coeficiente: 4.07 [95% IC: -0.47; 8.62] ($p < 0.07$)} mostraban mejor rendimiento que el grupo suplementado con FO+5-MTFH a los 7.5 años, no encontrándose otras comparaciones estadísticamente significativas.

Por último, las comparaciones por parejas para el percentil 50 y el percentil 75 en los tests CCTT y Stroop entre el tipo de suplementación y a los diferentes momentos se muestran en la Tabla 16. En el caso del CCTT1, se encuentra que el grupo suplementado con FO tiene menos probabilidad de puntuar por encima del percentil 75 que el grupo suplementado con FO+5-MTFH {Coeficiente: 0.21 [95% IC: -0.002; 0.42] ($p < 0.05$)} y que el grupo placebo {Coeficiente: 0.23 [95% IC: 0.03, 0.42] ($p < 0.018$)} a los 7.5 años. Sin embargo, se encuentra un mejor rendimiento del grupo FO vs FO+5-MTFH {Coeficiente: -0.25 [95% IC: -0.49, -0.007] ($p < 0.043$)} a los 9 años de edad.

En el caso del CCTT2, se encuentra que el grupo suplementado con FO tiene más probabilidad de puntuar por encima del percentil 75 que el grupo placebo tanto a los 7.5 años de edad {Coeficiente: -0.21 [95% IC: -0.721; -0.11] ($p < 0.041$)} como a los 9 años {Coeficiente: -0.11 [95% IC: -0.47, -0.05] ($p < 0.049$)}, no encontrándose otras comparaciones estadísticamente significativas.

En el caso del Stroop Color, se encuentra que el grupo suplementado con FO tiene más probabilidad de puntuar por encima del percentil 75 que el grupo suplementado con FO+5-MTFH {Coeficiente: 0.46 [95% IC: 0.06; 0.85] ($p < 0.023$)} y que el grupo suplementado con 5-MTFH también tiene más probabilidad que el grupo FO+5-MTFH {Coeficiente: 0.36 [95% IC: (-0.03, 0.0] ($p < 0.07$)} a los 7.5 años. Por último, en el caso del Stroop Color-Palabra, se encuentra que grupo suplementado con FO tiene más probabilidad de puntuar por encima del percentil 75 que el grupo placebo {Coeficiente: 0.26 [95% IC: 0.03; 0.49:] ($p < 0.022$)}. Sin embargo, el grupo suplementado con FO+5-MTHF mostraba menos probabilidad de estar en ese percentil que el grupo placebo {Coeficiente: -0.29 [95% IC: -0.051, -0.08] ($p < 0.006$)}. No se encontraron comparaciones significativas en el Stroop para la edad de 9 años.

Tabla 14. Modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel) para el análisis de la **Atención** mediante las pruebas **Stroop 2 - Color, Stroop 3 – Palabra/Color**, considerando en el nivel 1 el grupo de suplementación, y en el nivel 2 el momento de la evaluación. Se analiza el efecto de las diferentes variables confusoras.

Variables	Categorías	Stroop Palabra (aciertos)				Stroop Color (aciertos)				Stroop P
		b	Interv. Conf. 95%		P value	b	Interv. Conf. 95%		P value	
			LI	LS			LI	LS		
Grupo de estudio	Placebo	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	FO	4.02	-3.25	11.30	0.278	0.85	-3.91	5.62	0.726	-4.01
	5-MTHF	1.09	-6.16	8.35	0.768	-1.97	-6.74	2.81	0.419	-4.05
	FO+5-MTHF	-1.34	-9.70	7.02	0.754	2.47	-2.97	7.90	0.374	-2.28
Edad niño	7.5 años	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	9 años	15.38	-11.20	19.55	0.000	10.01	6.80	13.21	0.000	4.13
Grupo estudio * edad niño	Placebo	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	FO	-3.09	-9.56	3.37	0.348	-1.02	-5.95	3.92	0.686	3.74
	5-MTHF	-6.35	-12.80	0.11	0.054	-1.90	-6.86	3.06	0.453	2.94
	FO+5-MTHF	-2.21	-8.82	4.39	0.511	-2.52	-7.58	2.53	0.328	2.74
Edad Materna (años)		-0.30	-0.79	0.18	0.219	0.045	-0.26	0.35	0.769	0.21
Fumadora	No	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	Sí	5.58	-0.20	11.35	0.058	1.47	-2.17	5.11	0.430	3.07
Maternal Education	None + Primary	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	Secondary or >	2.32	-2.33	6.98	0.328	-0.44	-3.38	2.50	0.768	-0.23
dIMC		-0.41	-1.54	0.73	0.485	-0.57	-1.29	0.16	0.126	-0.033
Tipo de parto	Espontáneo	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	Fórceps	2.01	-5.96	9.98	0.621	3.12	-1.87	8.11	0.221	1.75
	Vacuum	1.85	-5.86	9.56	0.639	-0.77	-5.65	4.10	0.756	-1.14
	Cesárea	-0.19	-5.04	4.66	0.219	1.91	-1.16	4.98	0.222	1.10
Sexo	Niña	0	-	-	-	0	-	-	-	0
	Niño	-4.94	-9.06	-0.81	0.019	-1.87	-4.48	0.74	0.161	-1.44
Edad Gestacional (sem)		-0.28	-1.62	1.06	0.683	0.32	-0.53	1.17	0.466	-0.06
AA/DHA-PE^{1,2}		8.15	-1.47	17.78	0.097	6.55	0.50	12.60	0.034	1.72
Polimorfismo FADS1 rs174556 materno		-1.47	-4.78	1.83	0.382	-1.07	-3.15	1.01	0.315	-0.50
Ácido fólico plasmático (µg/L)¹		0.24	-0.26	0.74	0.343	0.28	-0.03	0.60	0.079	0.16

Polimorfismo MTHFR 677 C/T materno		2.61	-0.43	5.66	0.093	-0.039	2.32	1.53	0.688	-0.74
tHcys ($\mu\text{mol/L}$)¹		-1.09	-2.04	-0.14	0.025	-0.47	-1.07	0.14	0.129	-0.06

FO: Aceite de pescado; 5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; Mix: FO+5-MTHF; ΔBMI : diferencia en el índice de masa corporal entre las semanas 20 y 36; ALA: ácido araquidónico ligado a fosfatidiletanolamina en la membrana del hematíe; DHA: Ácido docosahexaenoico ligado a fosfatidiletanolamina en la membrana del hematíe; SFA: suma de los ácidos grasos; tHcys: Homocisteína total; MTHFR: Metil-tetrahidrofolato reductasa; b: coeficiente de regresión; IC: Intervalo de confianza; LI: límite inferior; P= nivel de significancia; ¹: valores obtenidos de las madres en el momento del parto; ²: ácidos grasos medidos como % del total de ácidos grasos.

Tabla 15: Comparación por pares de los márgenes predictivos del modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel), para las puntuaciones obtenidas en los tests CCTT y STROOP en los niños NUHEAL.

7.5 años						
	FO vs 5-MTHF	FO vs FO+5-MTHF	FO vs Placebo	5-MTHF vs FO+5-MTHF	5-MTHF vs Placebo	FO+5-MTHF vs Placebo
CCTT-1 (s)						
Contraste	-10.077	-5.546	-1.68	4.53	8.39	-3.86
95% CI	(-27.434, 7.29)	(-22.66, 11.57)	(-17.48, 14.12)	(13.23, 23.30)	(-8.10, 24.89)	(-20.11, 12.38)
P-valor	0.255	0.526	0.835	0.617	0.319	0.641
CCTT-2 (s)						
Contraste	-8.552	-3.214	-0.652	3.236	5.332	-2.325
95% CI	(-15.43, 2.19)	(-10.01, 9.77)	(-8.25, 11.10)	(9.13, 13.50)	(-5.62, 9.19)	(-2.551, 9.48)
P-valor	0.214	0.112	0.901	0.221	0.665	0.214
STROOP Test - hits1 (Word-reading)						
Contraste	1.05	-0.77	-2.32	-1.82	-3.38	1.55
95% CI	(-5.61, 7.72)	(-7.35, 5.80)	(-8.40, 3.75)	(-8.66, 5.009)	(-9.74, 2.97)	(-4.70, 7.81)
P-valor	0.756	0.818	0.453	0.600	0.291	0.627
STROOP Test - hits2 (Color-naming)						
Contraste	0.37	4.44	1.09	4.07	0.72	3.35
95% CI	(-4.07, 4.81)	(0.06, 8.83)	(-2.95, 5.14)	(-0.47, 8.62)	(-3.50, 4.95)	(-0.81, 7.51)
P-valor	0.870	0.04	0.595	0.07	0.737	0.115
STROOP Test - hits3 (Color-word)						
Contraste	1.16	2.70	4.39	1.54	3.23	-1.68
95% CI	(-1.94, 4.26)	(-0.35, 5.76)	(1.56, 7.22)	(-1.63, 4.72)	(0.27, 6.18)	(-4.59, 1.22)
P-valor	0.463	0.08	0.02	0.341	0.03	0.256
9 años						
CCTT-1 (s)						
Contraste	-3.33	-28.99	-34.68	-25.65	-31.65	5.99
95% CI	(-34.89, 28.19)	(-60.09, 2.11)	(-63.69, -6.28)	(-57.93, 6.62)	(-61.62, -1.68)	(-23.51, 35.51)
P-valor	0.756	0.06	0.017	0.119	0.038	0.69
CCTT-2 (s)						
Contraste	-1.32	-2.55	-1.254	2.125	4.251	-1.52
95% CI	(-15.43, 2.19)	(-10.01, 3.77)	(-10.25, -5.10)	(5.40, 12.50)	(-4.62, 7.22)	(-4.441, 10.54)
P-valor	0.514	0.987	0.087	0.098	0.152	0.441
STROOP Test - hits1 (Word-reading)						
Contraste	-1.36	-0.13	1.03	1.49	2.39	-0.90
95% CI	(-8.22, 5.49)	(-6.86, 7.22)	(-5.37, 7.44)	(-5.56, 8.55)	(-4.07, 8.87)	(-7.52, 5.71)
P-valor	0.696	0.971	0.752	0.678	0.478	0.789
STROOP Test - hits2 (Color-naming)						
Contraste	-0.95	2.56	1.68	3.52	2.63	0.88
95% CI	(-5.54, 3.66)	(-2.13, 7.26)	(-2.61, 5.97)	(-1.20, 8.24)	(-1.68, 6.95)	(-3.55, 5.32)
P-valor	0.683	0.285	0.443	0.144	0.231	0.696
STROOP Test - hits3 (Color-word)						
Contraste	-0.10	1.43	0.07	1.53	0.17	1.35
95% CI	(-3.29, 3.08)	(-1.83, 4.69)	(-2.91, 3.05)	(-1.75, 4.82)	(-2.83, 3.19)	(-1.72, 4.44)
P-valor	0.949	0.390	0.962	0.360	0.908	0.388

5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; FO: Fish-oil; s: segundos; CCTT-1: Children's Color Trails Test; CI: confidence interval.

Tabla 16: Comparación por pares de los márgenes predictivos del Modelo de análisis lineal multivariante de efectos fijos (multinivel) para los percentiles 50 y 75 de las puntuaciones obtenidas en los tests CCTT y STROOP en los niños NUHEAL.

7.5 years						
	FO vs 5-MTHF	FO vs FO+5-MTFH	FO vs Placebo	5-MTFH vs FO+5-MTFH	5-MTFH vs Placebo	FO+5-MTFH vs Placebo
CCTT-1 (sc) p75						
Contrast	0.06	0.21	0.23	0.14	0.16	-0.02
95% CI	(-0.12, 0.26)	(-0.002, 0.42)	(0.03, 0.42)	(-0.09, 0.37)	(-0.05, 0.38)	(-0.25, 0.25)
P-value	0.491	0.05	0.018	0.239	0.141	0.857
CCTT-2 (sc) p75						
Contrast	0.12	0.14	-0.21	0.19	0.21	0.22
95% CI	(-1.30, 0.98)	(-0.11, 0.72)	(-0.721, -0.11)	(0.24, 0.77)	(-0.51, 0.98)	(-0.97, 0.55)
P-value	0.114	0.415	0.041	0.098	0.658	0.741
STROOP Test - hits1 (Word-reading) p50						
Contrast	0.21	0.06	0.15	-0.14	-0.06	-0.08
95% CI	(-0.09, 0.52)	(-0.24, 0.37)	(-0.13, 0.44)	(-0.30, 0.33)	(-0.36, 0.24)	(-0.39, 0.22)
P-value	0.182	0.680	0.309	0.380	0.703	0.585
STROOP Test - hits2 (Color-naming) p75						
Contrast	0.09	0.46	0.33	0.36	0.23	0.13
95% CI	(-0.38, 0.58)	(0.06, 0.85)	(-0.11, 0.78)	(-0.03,)	(-0.21, 0.67)	(-0.19, 0.67)
P-value	0.694	0.023	0.150	0.07	0.304	0.4390
STROOP Test - hits3 (Color-word) p75						
Contrast	0.07	-0.03	0.26	-0.11	0.18	-0.29
95% CI	(-0.14, 0.29)	(-0.21, 0.14)	(0.03, 0.49)	(-0.32, 0.09)	(-0.06, 0.43)	(-0.051, -0.08)
P-value	0.489	0.704	0.022	0.291	0.146	0.006
9 years						
CCTT-1 (s) p50						
Contrast	-0.15	-0.25	0.03	-0.09	0.18	-0.28
95% CI	(-0.42, 0.10)	(-0.49, -0.007)	(-0.27, 0.29)	(-0.31, 0.12)	(-0.05, 0.43)	(-0.50, -0.06)
P-value	0.246	0.043	0.815	0.399	0.127	0.011
CCTT-2 (sc) p75						
Contrast	-0.05	0.10	-0.11	-0.20	0.29	-0.19
95% CI	(-0.21, 0.51)	(-0.31, 0.51)	(-0.47, -0.05)	(-0.71, 0.51)	(-0.55, 0.73)	(-0.62, 1.09)
P-value	0.514	0.221	0.049	0.091	0.188	0.321
STROOP Test - hits1 (Word-reading) p75						
Contrast	0.11	0.18	0.13	0.07	0.02	0.04
95% CI	(-0.20, 0.42)	(-0.12, 0.48)	(-0.16, 0.43)	(-0.26, 0.40)	(-0.29, 0.35)	(-0.26, 0.35)
P-value	0.495	0.246	0.367	0.676	0.875	0.780
STROOP Test - hits2 (Color-naming) p50						
Contrast	-0.08	0.14	0.19	0.22	0.27	-0.04
95% CI	(-0.57, 0.40)	(-0.33, 0.61)	(-0.27, 0.65)	(-0.22, 0.67)	(-0.15, 0.71)	(-0.46, 0.36)
P-value	0.735	0.554	0.421	0.320	0.214	0.821
STROOP Test - hits3 (Color-word) p50						
Contrast	0.05	0.12	0.12	0.07	0.07	-0.005
95% CI	(-0.15, 0.25)	(-0.11, 0.35)	(-0.11, 0.35)	(-0.17, 0.33)	(-0.14, 0.30)	(-0.25, 0.24)
P-value	0.624	0.307	0.234	0.578	0.508	0.964

5-MTHF: 5-Metil-tetrahidrofolato; FO: Fish-oil; s: segundos; CCTT-1: Children's Color Trails Test; hits: Aciertos CI: confidence interval.

4.2 Estudio 2. Efectos beneficiosos a largo plazo de la suplementación materna durante la gestación con ácido fólico y ácidos grasos sobre el *Sistema Atencional* en los hijos a los 8.5 años de edad.

En el presente estudio para las comparaciones múltiples se utilizó la estadística t-max (para el ERP y los datos del sLORETA) con un nivel de confianza de 0.05. El t-max está basado en la distribución empírica de las puntuaciones-t obtenidas en una serie de comparaciones después de un número de permutaciones aleatorias que se llevan a cabo (5000).

En la Tabla 17 se muestran las características generales de los 130 niños y sus madres incluidos en el presente estudio y que fueron evaluados a los 8.5 años, dependiendo del tipo de suplementación prenatal recibida {Aceite de pescado (fish oil-FO), 5-MTHF, FO+5-MTHF o Placebo}.

4.2.1 Resultados comportamentales

Para cada respuesta correcta se obtuvo la mediana de los tiempos de reacción (en ms) y para cada flanco y señal de aviso se obtuvieron porcentajes de error. Los puntajes de eficiencia para cada red atencional fueron posteriormente computados restando los tiempos de reacción "congruente de los ensayos incongruentes" (Puntuación de Conflicto); Doble señal de la Condición Sin señal (puntuación de Alerta); y, la señal espacial de la señal central (Puntuación de orientación). Seis niños que obtuvieron menos del 50% de respuestas correctas en la condición incongruente fueron excluidos del análisis. Completaron el estudio un total de 130 niños, {FO, n=37; 5-MTHF, n=27; Placebo, n=32; y FO+5-MTHF, n=34}. Se utilizó una transformación logarítmica para mejorar el ajuste de normalidad.

4.2.2 Red de Conflicto

La transformación logarítmica de las medias de los tiempos de reacción para las respuestas correctas (Tabla 18 y Figura 4) fueron sometidas a medidas repetidas de ANCOVA 2 (FO, entre sujetos) x 2 (5-MTHF, sujetos) x 4 (entre sujetos condición flanco: Congruente, Incongruente, Neutral) (controlando por la edad en meses, sexo, status familiar y lateralidad). La corrección Greenhouse-Geisser se utilizó para respetar el supuesto de esfericidad. Se observa una diferencia significativa en la

interacción del flanco, FO y 5-MTHF [$F(2,244) = 5.04, p < 0.01$]. El análisis de efectos simples de ésta interacción mostraron que las puntuaciones de Conflicto resultaron significativamente más bajas en los niños del grupo 5-MTHF respecto a los grupos Placebo y FO+5-MTHF (todos $p < 0.05$), pero similares a los del grupo FO ($p = 0.24$).

En relación al porcentaje de error en las respuestas (Tabla 18), los análisis mostraron sólo los efectos principales del flanco [$F(2,244) = 32.53, p < 0.01$]. Ningún otro efecto fue significativo (todos $F < 1$). Después de la corrección de Bonferroni, los porcentajes de errores fueron más altos para los flancos Incongruentes que para los flancos Congruente o Neutral ($p < 0.01$), y para el Neutral más alto que para el flanco Congruente ($p < 0.01$).

Tabla 17. Características generales, antecedentes perinatales y socioculturales de los 130 niños participantes en el proyecto NUHEAL Follow-up, que fueron evaluados a los 8.5 años de edad. Se muestran también las diferencias entre los grupos de estudio establecidos según del tipo de suplementación que recibieron sus madres durante la gestación.

	FO (n=37)	5-MTHF (n=27)	Placebo (n=32)	FO+5-MTHF (n=34)	P- value
Centro [n (%)]					0.81
España	25 (67.57)	20 (70.07)	24 (75)	22 (64.71)	
Alemania	9 (24.32)	7 (29.93)	6 (18.75)	10 (29.41)	
Hungria	3 (8.11)	0 (0)	2 (6.25)	2 (5.88)	
Edad de los EEG (años) ¹	8.49±0.18	8.51±0.18	8.55±0.17	8.56±0.20	0.38
IMC a los 8.5 y (kg/m ²) ¹	17.43±3.05	16.65±2.17	18.16±2.61	17.59±2.85	0.22
Madre					
Edad materna (años) ¹	31.09±4.86	32.65±5.50	32.34±4.23	31.25±4.53	0.47
IMC Materno (20 sem) (kg/m ²) ¹	24.62±3.27	25.32±3.19	24.60±3.02	25.06±2.52	0.74
IMC Materno (30 sem)(kg/m ²) ¹	26.17±5.85	27.34±3.31	26.01±5.66	26.37±5.30	0.77
Hematocrito (30 sem) ¹	34.71±3.88	33.01±5.10	33.73±2.55	34.29±3.03	0.31
Paridad [n (%)]					0.64
0	21 (56.76)	12 (44.44)	14 (43.75)	15 (44.12)	
≥1	16 (43.24)	15(55.56)	18 (56.25)	19 (55.88)	
Consumo Tabaco (20 sem) [n (%)]	6 (16.22)	3 (11.11)	2 (6.25)	5 (14.71)	0.62
Riesgo gestación (20 sem) [n (%)]					0.85
Sin factores de riesgo	1 (2.70)	0 (0)	1 (3.13)	0 (0)	
≥1 Factores de Riesgo	36 (97.30)	27 (100)	31 (93.87)	34(100)	
Riesgo en el parto [n (%)]					0.25
Sin riesgo en el parto	12 (37.5)	13 (50)	19 (63.33)	16 (51.61)	
≥1 riesgo en el parto	20 (62.5)	13 (50)	11 (33.33)	15(48.39)	
Morbilidad Perinatal [n (%)]					0.61
Ninguna	26 (81.25)	23 (88.46)	25 (83.33)	26 (83.87)	
Pretérmino (>35 sem)	4 (12.50)	3 (11.54)	1 (3.33)	4 (12.90)	
Otros	2 (6.25)	0 (0)	4 (13.33)	1 (3.23)	
Area de Residencia [n (%)]					0.62
Area Urbana	15 (40.54)	13 (48.15)	10 (31.25)	14 (41.18)	
Area Rural	22 (59.46)	14 (51.85)	22 (68.75)	20 (58.82)	
Educación Materna [n (%)] ³	17 (45.95)	11 (40.74)	12 (37.5)	16 (48.48)	0.66
Educación Paterna [n (%)] ³	20 (54.05)	10 (37.04)	11 (34.38)	10 (30.30)	0.40
Recién Nacido					
Edad Gestacional ¹	39.08±2.24	39.90±4.26	39.64±1.71	38.82±2.24	0.37
Sexo [n (%)]					0.36
Femenino	15 (40.54)	14 (51.85)	14 (43.75)	20 (58.82)	
Masculino	22 (59.46)	13 (48.15)	18 (56.25)	14 (41.18)	
Apgar 1 ¹	8.57±1,26	9.08±0,63	8.72±0,92	8.33±1.96	0.90
Apgar 5 ¹	9.68±0,67	9.77±0.65	9.77±0.43	9.55±1.09	0.80
Peso (g) ¹	3228±560.5	3358±411.7	3370±410.2	3157±437.1	0.20
Longitud (cm) ¹	50.57±3.45	51.46±2.08	51.23±2.06	50.97±2.90	0.60
Perímetro craneal (cm) ¹	34.39±2.01	34.76±1.52	34.77±1.39	34.59±1.60	0.76
Tipo de lactancia [n (%)]					0.78
Lactancia	14 (46.67)	10 (38.46)	13 (52)	16 (59.26)	
Mixta	9 (30)	7 (26.92)	5 (20)	5 (18.52)	
Formula	7 (23.33)	9 (34.62)	7 (28)	6 (22.22)	

5-MTHF: 5-metilteetrahidrofolato, FO: Aceite de Pescado. Nivel de cualificación general alcanzado para el ingreso a la universidad o título universitario. Para las variables cualitativas se usó la prueba Chi-cuadrado; para las variables cuantitativas se utilizó ANOVA de una vía. Valor de p indica las diferencias entre grupos. ¹Media ± Desviación estándar. Los valores de p se refieren a la interacción o a la comparación entre grupos.

Tabla 18. Valores medios del tiempo de reacción (ms), condiciones distractoras y la señal de aviso observados en los niños de 8.5 años según el grupo de estudio. La interferencia es la diferencia entre los ensayos congruentes e incongruentes; la orientación es la diferencia entre la señal espacial y la central; la Alerta es la diferencia entre No aviso y Doble Aviso.

	FO (n=37)	5-MTHF (n=27)	Placebo (n=32)	FO+5-MTHF (n=34)	P
Velocidad Global	854 ± 135	872 ± 98	818 ± 132	825 ± 111	0.07
Interferencia	83 ± 67	60 ± 75	101 ± 63	96 ± 66	0.01
<i>Congruente</i>	830 ± 142	862 ± 125	793 ± 136	801 ± 111	
<i>Incongruente</i>	913 ± 130	923 ± 93	894 ± 139	897 ± 120	
<i>Neutral</i>	819 ± 145	831 ± 101	767 ± 132	778 ± 118	
Orientación	47 ± 48	36 ± 69	41 ± 54	38 ± 70	0.95
<i>Espacial</i>	819 ± 135	847 ± 104	785 ± 130	795 ± 137	
<i>Central</i>	866 ± 147	883 ± 103	825 ± 121	832 ± 102	
Alerta	43 ± 56	48 ± 77	74 ± 65	71 ± 55	0.03
<i>Doble</i>	845 ± 140	861 ± 119	784 ± 134	792 ± 106	
<i>No</i>	888 ± 133	909 ± 109	857 ± 131	863 ± 111	

FO: Fish oil; 5-MTHF: 5-metil-tetrahidrofolato. Se realizó análisis de Covarianza entre factores con el FO y el 5-MTHF, y los flancos o señales de aviso entre sujetos. Las co-variables fueron la edad, género, estatus socioeconómico y la lateralidad. Los valores de p indican las diferencias entre grupos en las puntuaciones ejecutivas (interferencia), alerta y las de orientación. El valor de p global para la velocidad general se refiere a la diferencia entre grupos. Los restantes valores de p se refieren a la interacción del análisis.

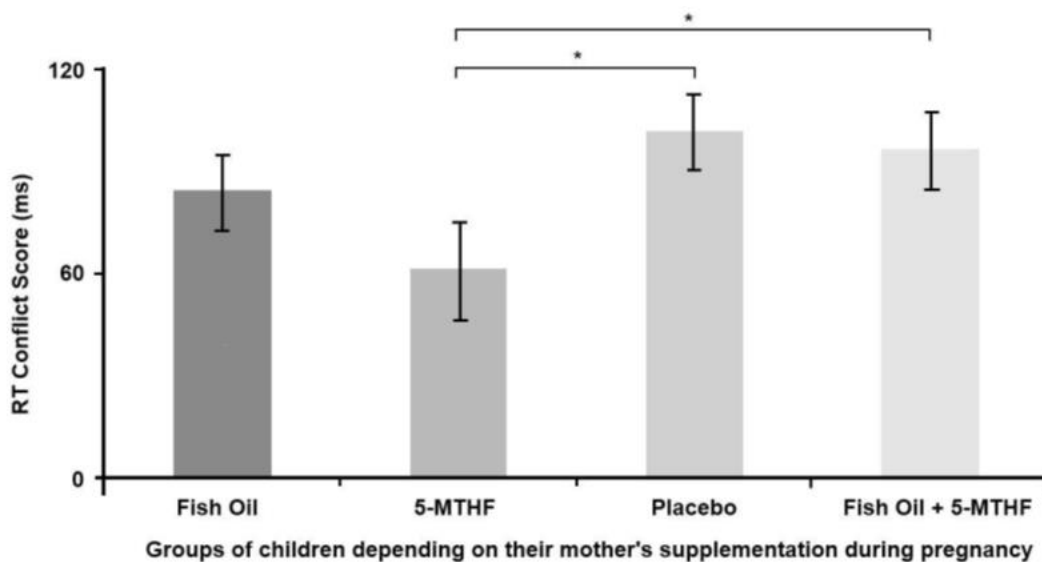


Figura 4. Comparación de las puntuaciones de conflicto en los niños a los 8.5 años. Las puntuaciones están representadas en función de la suplementación que recibieron sus madres durante la gestación {Fish oil (FO) (Aceite de Pescado), n=37; 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), n=27; Placebo, n=32; FO+5-MTHF, n=34). Los valores están expresados como medias ± error estándar de la media. *P<0.05 tras la comparación entre grupos mediante ANOVA y corrección post-hoc por el test de Bonferroni. RT: tiempo de reacción.

4.2.3 Redes de Alerta y Conflicto

La transformación logarítmica de las medias de las medianas de los tiempos de reacción para las respuestas corregidas de redes Alerta y Orientación (Tabla 19 y Figura 5) se sometieron a un análisis 2 (FO, entre sujetos) x 2 (5-MTHF, entre sujetos) x 4 (condición de la señal intersujetos: *espacial, centrada, doble señal, sin señal*) de medidas repetidas mediante ANCOVA (controlando por la edad, sexo, status familiar y lateralidad).

Se observaron efectos principales significativos de la Señal de aviso [$F(3,378)=77.12, p<0.001$]. La interacción de la condición FO, 5-MTHF [$F(1,122)=49.1, p=0.03$], así como la interacción entre de FO, 5-MTHF y la condición de señal de aviso fueron significativas [$F(3,366)=2.99, p<0.04$]. Además, las puntuaciones de Alerta y Orientación se sometieron a un análisis 2 (FO) x 2 (5-MTHF) mediante ANCOVA (*controlando por la edad, sexo, familia y lateralidad*). No se observaron efectos ni principales ni de interacción para las puntuaciones de Orientación [todos $F(1,122)<1$]. Sin embargo, la interacción de FO y 5-MTHF fue significativa para las puntuaciones de los tiempos de reacción de Alerta [$F(1,122)=5.28, p<0.03$]. El análisis de efectos simples de ésta interacción mostró que las puntuaciones de Alerta en los niños de los grupos de FO y 5-MTHF fueron menores respecto a los niños del grupo de FO+5-MTHF (ambos $p<0.04$). El mismo análisis para los errores de respuesta (Tabla 18) no arrojaron efectos significativos [todos $F(3,366)<1$].

Tabla 19. Porcentajes de error según el grupo de suplementación, distractores y las condiciones de la señal de aviso¹.

	FO (n=37)	5-MTHF (n=27)	Placebo (n=32)	FO+5-MTHF (n=34)	P-value
Total Errores	8.1 ± 5.8	8.0 ± 7.3	7.2 ± 6.2	6.9 ± 6.1	0.42
Interferencia	4.0 ± 5.3	4.8 ± 6.4	6.3 ± 10.8	5.8 ± 8.0	0.52
<i>Congruente</i>	6.5±6.5	5.6 ± 6.2	4.5 ± 5.2	4.3 ± 5.1	
<i>Incongruente</i>	10.5±8.2	10.4 ± 9.5	10.8 ± 12.3	10.1 ± 9.2	
<i>Neutral</i>	7.2 ± 4.8	8.2 ± 8.0	6.2 ± 5.6	6.3 ± 6.8	
Orientación	0.3 ± 6.0	-0.3 ± 7.3	-0.3 ± 5.7	-0.2 ± 5.0	0.81
<i>Espacial</i>	8.1 ± 6.6	8.7 ± 9.0	7.8 ± 5.7	6.8 ± 6.4	
<i>Central</i>	8.4 ±6.7	8.4 ± 8.4	7.5 ± 8.4	6.6 ± 6.3	
Alerta	1.2 ± 6.9	1.2 ± 4.1	-0.1 ± 5.5	0.5 ± 6.1	0.32
<i>Doble</i>	7.8 ± 7.7	7.4 ± 8.3	7.0 ± 6.7	7.3 ± 7.2	
<i>No</i>	9.0 ± 6.6	8.6 ± 6.4	6.9 ± 6.8	7.8 ± 7.6	

¹Los valores son los promedios de las medianas de los tiempos de reacción ± desviación estándar (SDs). El análisis estadístico se realizó mediante ANCOVA en el grupo de recibió FO (Fish oil - Aceite de Pescado) y en el grupo de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) como factores inter-sujetos y flancos o señales como factores intra-sujetos. Las co-variables fueron la edad, sexo, estatus socioeconómico y la lateridad. Los valores de p indican las diferencias entre grupos para las puntuaciones ejecutivas (interferencia), alertar (alerta) y las puntuaciones de orientación. Los valores de p para la velocidad general se refieren a las diferencias entre grupo; los restantes valores de p se refieren a la al análisis de interacción. La "interferencia" indica la diferencia entre los ensayos congruentes e incongruentes. La "Orientación" indica las diferencias entre las señales centradas y espaciales. La "Alerta" indica la diferencia entre no señal y doble señal.

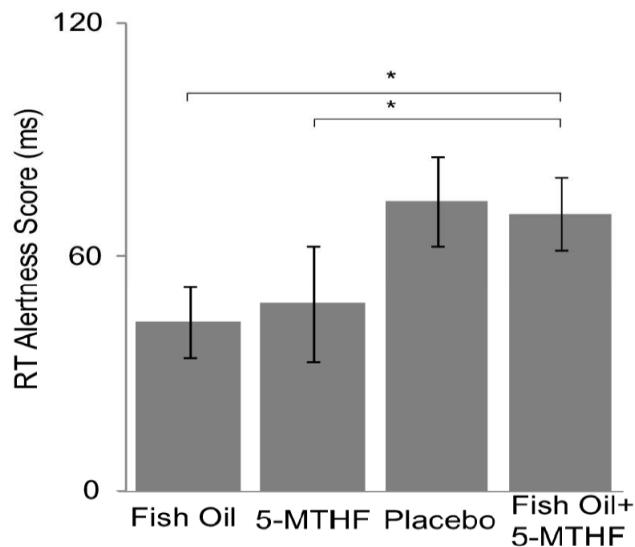


Figura 5. Tiempo de reacción de las puntuaciones de Alerta en los niños participantes en el Proyecto NUHEAL. Las puntuaciones se presentan como una función de los 4 grupos suplementados: FO (Fish oil - Aceite de Pescado, n=37); 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF, n=27); Placebo, n=32; FO+5-MTHF, n=34). Los valores representan medias de las medianas ± SEM. *Comparación significancia según ANOVA y después de la corrección mediante el test de Bonferroni, P = 0.04. RT: Tiempo de reacción.

4.2.4 Resultados de la Electroencefalografía

Sólo 117 (FO, n=30; 5-MTHF, n=23; Placebo, n=30; FO+5-MTHF, n=34), de los 136 participantes, con al menos 25 *artifact free epochs* por condición de flanco fueron incluidos en el análisis restante. La prueba-t de masa univariada mostró diferencias significativas para la comparación entre el grupo 5-MTHF y el grupo Placebo solo para las puntuaciones de eficiencia de las redes de conflicto ERP entre los 270-290 ms post-objetivo en los 3 canales del hemisferio izquierdo: F5, F3, y FC5. Estas puntuaciones de eficiencia en éste intervalo y para éstos electrodos fueron analizadas mediante un test ANCOVA de medidas repetidas 2 (FO, entre sujetos) x 2 (5-MTHF, entre sujetos) x 3 (canales: F5, F3, FC5), (controlando para la edad, sexo, status familiar y lateralidad). Se observaron efectos principales significativos de Canal [$F(2,226)=3.82$, $p<0.03$]. La interacción entre FO y 5-MTHF resultó también significativa [$F(1,113)=9.31$, $p<0.01$]. El análisis detallado de ésta interacción indicó que el grupo de 5-MTHF supera considerablemente las puntuaciones de los niños pertenecientes a los grupos Placebo ($p=0.002$), y FO+5-MTHF ($p<0.02$), y existe una tendencia casi significativa con el grupo de FO ($p=0.06$) (Figura 6). Los niños del grupo FO no difieren de los del grupo Placebo ($p=0.09$) o de los niños del grupo FO+5-MTHF ($p>0.32$). No se observaron diferencias entre los grupos Placebo y FO+5-MTHF ($p>0.59$). Es importante mencionar que estos efectos se mantienen incluso cuando se usaron el índice AA/DHA y el folato en plasma como confusores.

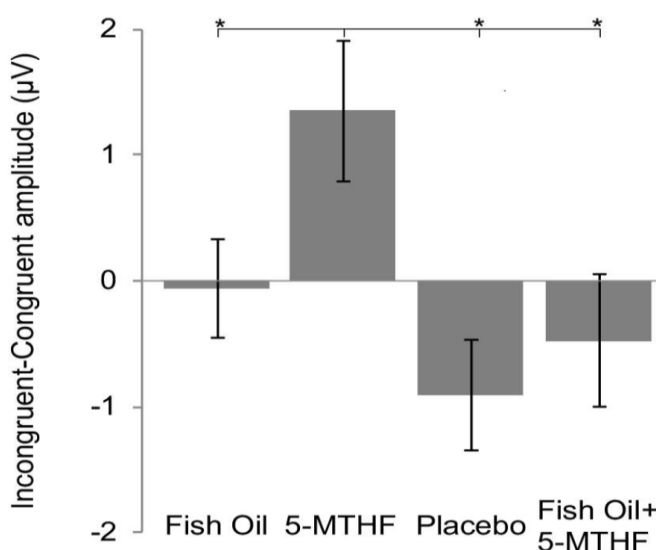


Figura 6. Media de las amplitudes de Conflicto asociadas al conjunto significativo de canales electroencefalográficos en el hemisferio izquierdo (canales frontales: F5, F3; canales fronto-centrales: FC5) en los niños participantes en el proyecto NUHEAL que fueron suplementadas con FO (Fish oil - Aceite de Pescado), n=37; 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), n=27; Placebo, n=32; o FO+5-MTHF, n=34. Los valores son medias \pm Error estándar de la media (SEMs). *Comparación significativa basada en la aproximación de masas-univariada usando la estadística t-max.

La estimación de sLORETA de las densidades actuales cerebrales en las ventanas de tiempo de interés (200-550 ms post-aparición de objetivo) para cada condición y grupo fueron también sometidos a una prueba-t de masas univariadas. Los resultados dieron lugar a dos grupos de voxels que discriminaron entre los grupos 5-MTHF y Placebo, uno en el lóbulo parietal inferior derecho (BA40, punta MNI coordenadas: 55, -40, 40) a 313-329 ms post-objetivo, y otro localizado en el giro cingulado derecho (BA24, pico a MNI coordenadas: 5, -5, 50), a 395-423 ms post-objetivo (Figura 7A). La figura 6 también muestra el tiempo de actividad estimada del clúster BA24 para la condición incongruente (Tabla 20, Figura 7B) y la condición congruente (Figura 7C). Un pequeño grupo precuneus posterior (4 voxels, coordenadas MNI: 15, -70, 25, BA31) discriminaron entre 5-MTHF y FO+5-MTHF a 403-419 ms post comienzo del objetivo.

Tabla 20. Regiones cerebrales relacionadas con las diferencias entre las condiciones Congruente e Incongruente en relación a las comparaciones de los grupos 5-MTHF (n=23) vs. Placebo (n=26) y los grupos 5-MTHF vs. FO+5-MTHF (n=34)¹.

	Lóbulo	Área	Tiempo (ms)	k	BA	x	Y	z	Valor- t
5-MTHF vs. Placebo	Lóbulo límbico	Giro Cingulado	395-423	12	24	5	-5	50	4.71*
	Lóbulo Parietal	Parietal Inferiorl	313-329	4	40	55	-40	40	4.51*
5-MTHF vs. FO+Placebo	Lóbulo Parietal	Precuneus	403-419	4	31	15	-70	25	5.45*

*K=número de voxels significativos; BA= Area de Brodman, x, y and z están en el espacio del Instituto Neurológico de Montreal. Las comparaciones se realizaron mediante la distribución empírica de la estadística t-max derivada de 5000 muestras aleatorias. *P<0.05.*

FO: Fish oil (aceite de pescado), 5-MTHF: 5-Metiltetrahydrofolato.



Figura 7.- (A) Clúster de la corteza medio-frontal en el que se observa aumento significativo en la activación relacionada con el Conflicto (estadística t-max del estudio univariado de masas) en los niños del grupo 5-MTHF ($n=27$) respecto a los del grupo Placebo ($n=32$) a los 395-423 ms post aparición de la ventana de tiempo del objetivo. Promedio de la fluctuaciones de actividad estimada del cluster frontal-medio, en cada grupo de suplementación para las condiciones incongruente **(B)** y congruente **(C)**. A, anterior; L, izquierda; P, posterior; R, Derecha; *5-MTHF*: 5-metiltetrahidrofolato.

4.2.5 Resultados Bioquímicos

En las Tablas 21 y 22 se muestran las concentraciones de los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos del plasma, ácido fólico y homocisteína, a lo largo de la gestación y durante el parto, y las diferencias encontradas entre los diferentes grupos de estudio.

Las madres mostraron el mismo nivel de ácidos grasos y homocisteína al inicio del estudio (semana 20, todas $p > 0.05$). Los niveles de ácido fólico en plasma eran más elevados al inicio del estudio en el grupo de madres que recibieron la suplementación con FO ($p = 0.03$). Las madres suplementadas con FO y sus hijos recién nacidos mostraron un incremento en los niveles de ácidos grasos a la semana 30 de gestación y durante el parto, especialmente de los ácidos grasos n-3, en comparación con las de los grupos suplementadas con 5-MTHF y Placebo (Todas $p < 0.05$, excepto para AA, índice n6/n3, y PUFA>n6, $p > 0.05$). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los ácidos grasos en el cordón umbilical entre los 4 grupos de estudio, excepto para la suma de PUFA>n6. Los grupos suplementados con 5-MTHF mostraron un aumento de los niveles de ácido fólico total y en plasma a la semana 30 de gestación, y también en el momento del parto, tanto en la madre como en el cordón umbilical (todos $p < 0.05$).

4.2.6 Asociaciones entre las puntuaciones de desempeño y los niveles bioquímicos

La Tabla 23 muestra las correlaciones lineales significativas encontradas entre los parámetros bioquímicos estudiados (ácidos grasos, ácido fólico y homocisteína) durante el embarazo y parto con las medidas conductuales (velocidad total, y redes de conflicto y alerta) y puntuaciones de eficiencia de desempeño (red atencional de conflicto: errores y puntuaciones de eficiencia del ERP), y Alerta (tiempo de reacción).

En general, el índice AA/DHA durante el embarazo (semanas 20 y 30) se correlacionó negativamente con la velocidad global. Los ácidos grasos poliinsaturados medidos en cordón umbilical (i.e. AA, DHA, n3-PUFA y PUFA>n3) se correlacionaron positivamente con los tiempos de reacción en general. Por otro lado, el índice n6/n3 durante la gestación (semanas 20 y 30) y el parto se correlacionaron positivamente con la velocidad en general. La homocisteína total al inicio del estudio y en el momento del parto también se correlacionó positivamente con la velocidad total (tiempo de reacción).

Tabla 21. Ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma, ácido fólico y homocisteína durante la gestación según el tipo de suplementación recibida.

	Grupo de suplementación				
	FO (n=37)	5-MTHF (n=27)	Placebo (n=32)	FO+5-MTHF (n=34)	P
Semana 20 de gestación					
AA (C20:4n6) (wt %)	5.98 ± 0.25	5.87 ± 0.22	6.07 ± 0.15	6.01 ± 0.17	0.930
EPA (C20:5n3) (wt %)	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.08	0.25 ± 0.06	0.650
DHA (C22:6n3) (wt %)	5.63 ± 0.29	5.88 ± 0.22	6.03 ± 0.36	6.03 ± 0.31	0.740
AA/DHA	3.74 ± 0.35	3.79 ± 0.35	3.86 ± 0.37	3.22 ± 0.35	0.570
n6-PUFA (wt %)	31.76 ± 0.49	31.76 ± 0.49	31.85 ± 0.57	31.19 ± 0.58	0.760
n3-PUFA (wt %)	6.70 ± 0.32	7.09 ± 0.22	7.10 ± 0.45	7.20 ± 0.35	0.740
n6/n3	2.17 ± 0.29	1.84 ± 0.28	1.95 ± 0.33	2.20 ± 0.29	0.810
PUFA>n3 (wt %)	6.66 ± 0.32	7.08 ± 0.22	7.06 ± 0.45	7.15 ± 0.34	0.730
PUFA>n6 (wt %)	7.32 ± 0.27	7.19 ± 0.21	7.22 ± 0.16	7.30 ± 0.18	0.970
Folato Plasma (nmol/L)	15.61 ± 1.44	11.69 ± 1.03	11.16 ± 1.01	12.29 ± 1.01	0.030
Folato total (nmol/L)	270.97 ± 17.00	269.77 ± 21.24	258.86 ± 23.23	265.12 ± 16.43	0.970
tHcy (µmol/L)	5.96 ± 0.23	5.97 ± 0.44	6.18 ± 0.36	5.96 ± 0.2	0.940
Semana 30 de gestación					
AA (C20:4n6) (wt %)	5.25 ± 0.13	5.49 ± 0.17	5.36 ± 0.16	5.22 ± 0.14	0.570
EPA (C20:5n3) (wt %)	0.57 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.001
DHA (C22:6n3) (wt %)	7.56 ± 0.28	5.74 ± 0.15	5.57 ± 0.23	7.87 ± 0.22	0.001
AA/DHA	2.53 ± 0.26	3.67 ± 0.35	3.83 ± 0.3	2.41 ± 0.25	0.001
n6-PUFA (wt %)	28.86 ± 0.47	30.58 ± 0.39	30.72 ± 0.42	30.72 ± 0.42	0.005
n3-PUFA (wt %)	9.16 ± 0.32	6.86 ± 0.16	6.86 ± 0.26	9.41 ± 0.25	0.001
n6/n3	1.57 ± 0.24	1.83 ± 0.3	1.88 ± 0.36	1.47 ± 0.20	0.670
PUFA>n3 (wt %)	9.07 ± 0.32	6.75 ± 0.15	6.77 ± 0.25	9.34 ± 0.25	0.001
PUFA>n6 (wt %)	6.56 ± 0.13	6.95 ± 0.16	6.71 ± 0.18	6.54 ± 0.16	0.270
Folato Plasma (nmol/L)	6.94 ± 0.59	10.88 ± 0.64	6.94 ± 0.69	16.79 ± 5.44	0.050
Folato total (nmol/L)	196.01 ± 11.12	228.52 ± 13.33	190.92 ± 12.76	258.44 ± 14.03	0.001
tHcy (µmol/L)	6.68 ± 0.35	5.30 ± 0.29	6.30 ± 0.33	6.64 ± 0.48	0.054
Parto					
AA (C20:4n6) (wt %)	5.14 ± 0.16	5.35 ± 0.20	5.49 ± 0.15	5.25 ± 0.13	0.430
EPA (C20:5n3) (wt %)	0.43 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.001
DHA (C22:6n3) (wt %)	7.27 ± 0.28	5.73 ± 0.33	5.56 ± 0.3	7.55 ± 0.30	0.001
AA/DHA	2.79 ± 0.26	3.66 ± 0.33	3.85 ± 0.37	2.9 ± 0.30	0.040
n6-PUFA (wt %)	29.15 ± 0.37	29.77 ± 0.46	30.92 ± 0.47	28.91 ± 0.45	0.006
n3-PUFA (wt %)	8.63 ± 0.32	7.09 ± 0.36	6.7 ± 0.34	8.88 ± 0.35	0.001
n6/n3	1.27 ± 0.21	1.79 ± 0.36	1.82 ± 0.31	1.14 ± 0.17	0.170
PUFA>n3 (wt %)	8.54 ± 0.32	6.92 ± 0.35	6.66 ± 0.35	8.8 ± 0.34	0.001
PUFA>n6 (wt %)	6.52 ± 0.16	6.90 ± 0.19	6.98 ± 0.17	6.62 ± 0.18	0.178
Folato Plasma (nmol/L)	5.98 ± 0.64	12.37 ± 1.09	6.33 ± 0.83	13.54 ± 1.13	0.001
Folato total (nmol/L)	173.58 ± 10.55	238.24 ± 16.11	170 ± 13.59	273.52 ± 18.98	0.001
tHcy (µmol/L)	7.46 ± 0.47	6.4 ± 0.57	6.58 ± 0.39	7.35 ± 0.6	0.360
Codón Umbilical					
AA (C20:4n6) (wt %)	10.31 ± 0.24	10.86 ± 0.21	10.75 ± 0.22	10.06 ± 0.25	0.070
EPA (C20:5n3) (wt %)	0.07 ± 0.03	0 ± 0	0.01 ± 0.01	0.1 ± 0.05	0.090
DHA (C22:6n3) (wt %)	9.9 ± 0.43	8.54 ± 0.4	9.03 ± 0.36	9.39 ± 0.46	0.140
AA/DHA	1.99 ± 0.11	2.34 ± 0.16	2.12 ± 0.12	2.03 ± 0.15	0.290
n6-PUFA (wt %)	21.66 ± 0.25	21.59 ± 0.34	21.75 ± 0.3	21.15 ± 0.32	0.500
n3-PUFA (wt %)	9.99 ± 0.44	8.54 ± 0.4	9.05 ± 0.36	9.5 ± 0.46	0.090
n6/n3	1.44 ± 0.14	1.69 ± 0.18	1.64 ± 0.18	1.5 ± 0.15	0.650
PUFA>n3 (wt %)	9.99 ± 0.44	8.54 ± 0.4	9.05 ± 0.36	9.5 ± 0.46	0.090
PUFA>n6 (wt %)	12.6 ± 0.24	13.2 ± 0.22	13.05 ± 0.21	12.32 ± 0.25	0.040
Folato Plasma (nmol/L)	14.05 ± 1.02	14.46 ± 0.75	13.1 ± 0.92	16.98 ± 1.18	0.050
tHcy (µmol/L)	6.77 ± 0.33	6.70 ± 0.76	5.68 ± 0.27	6.28 ± 0.50	0.350

FO: Aceite de Pescado (Fish oil); 5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato; AA= Ácido araquidónico (20:4n6); EPA=Ácido eicosapentaenoico; DHA= Ácido Docosahexaenoico (22:6n3); n6= ácidos grasos de la serie omega 6; n3= ácidos grasos de la serie omega 3; PUFA=ácidos grasos polinsaturados; tHcy=Homocisteína Total. Los ácidos grasos están expresados porcentajes (wt%) del total de ácidos grasos detectados en los fosfolípidos del plasma. El valor de P indica las diferencias entre grupos.

Tabla 22. Diferencias significativas entre los promedios de ácidos grasos, folato y homocisteína durante la gestación de los grupos de madres suplementadas.

	Semana 20	Semana 30	Parto Materno	Cordón Umbilical
C20:4n6	-	-	-	-
C20:5n3	-	(FO=FO+5-MTHF)	(FO=FO+5-MTHF)	-
		>	>	
		(5-MTHF=Placebo)	(5-MTHF=Placebo)	
C22:6n3	-	(FO=FO+5-MTHF)	(FO=FO+5-MTHF)	-
		>	>	
		(5-MTHF=Placebo)	(5-MTHF=Placebo)	
AA/DHA	-	(FO=FO+5-MTHF)	-	-
		<		
		(5-MTHF=Placebo)		
n6-PUFA	-	(FO=FO+5-MTHF)	(Placebo)	-
		<	>	
		(5-MTHF=Placebo)	(FO=FO+5-MTHF)	
n3-PUFA	-	(FO=FO+5-MTHF)	(FO=FO+5-MTHF)	-
		>	>	
		(5-MTHF=Placebo)	(5-MTHF=Placebo)	
Índice n6/n3	-	-	-	-
n3>PUFA	-	(FO=FO+5-MTHF)	(FO=FO+5-MTHF)	-
		>	>	
		(5-MTHF=Placebo)	(5-MTHF=Placebo)	
PUFA>n6	-	FO>(FO+5-MTHF)	-	-
Ácido fólico Plasma (nmol/L)	(FO) >(FO+5-MTHF)	-	(5-MTHF=FO+5-MTHF)	-
			>	
			(FO=Placebo)	
Ácido Fólico total (nmol/L)	-	(FO+5-MTHF)>(FO)	(5-MTHF=FO+5-MTHF)	(FO+5-MTHF)>(Placebo)
			>	
			(FO=Placebo)	
tHcy (μmol/L)	-	-	-	-

FO=Fish oil (Aceite de Pescado); 5-MTHF=metiltetrahidrofolato; AA=Ácido araquidónico de los fosfolípidos en plasma; DHA=Ácido Docosahexaenoico en los fosfolípidos del plasma; n6=Omega 6 ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma; n3=Omega 3 ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma; PUFA=ácidos grasos polinsaturados en los fosfolípidos del plasma; tHcy=Homocisteína. Todas las diferencias marcadas son significativas en $p<0.05$.

Tabla 23. Coeficientes de correlación lineal entre las puntuaciones atencionales comportamentales (*Velocidad Total, Conflicto, y las redes de Alerta*) (n:130) y eficiencia en el ERP (Red de conflicto) (n:117) con las medidas de los parámetros bioquímicos analizados en sangre y plasma materno durante la gestación, en el momento del parto y en cordón umbilical.

		Velocidad Total		Conflicto		Alerta
		RT	Errores	ERP	Errores	RT
Semana 20 de Gestación	AA/DHA	-0.265**		0.198*		
	n6/n3	0.320**				
	tHcy	0.220*				
Semana 30 de Gestación	AA/DHA	0.233**				0.214*
	n6/n3	0.310**				
	Folato total (sangre)	-0.181*				
Parto	EPA				-0.201*	
	AA/DHA			0.198*	0.195*	
	PUFA>n6					0.205*
	n6/n3	0.246**				
	n6-PUFA				0.242**	
	tHcy	0.173*	0.177*			
Cordón Umbilical	AA/DHA		-0.226*	0.211*		
	AA	-0.198*				
	DHA	0.253**				
	n3-PUFA	0.247**				
	n6/n3	0.330**				
	PUFA>n3	0.247**				
	Folato (plasma)				0.207*	

RT= Tiempo de Reacción; ERP= Potencial Relacionado con un Evento - diferencias en los promedios de amplitudes del cuero cabelludo; PUFA= Ácidos grasos poliinsaturados. Todos los ácidos grasos fueron medidos en los fosfolípidos del plasma; AA: ácido araquidónico (C20:4n-6); EPA: ácido eicosapentaenoico (C20:5n3); DHA: ácido docosahexaenoico (C22:6n3); n-6-PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6; n-3 PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3; tHcy=Homocisteína total; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se comprobaron asociaciones significativas de los parámetros bioquímicos y los tiempos de reacción de las puntuaciones de Conflicto. En relación a los errores, se demostraron correlaciones negativa del EPA y positiva del índice AA/DHA y de los n6-PUFAs maternos en el momento del parto, con los errores en la respuesta de la solución de conflicto. El ácido fólico en plasma de cordón umbilical y el índice AA/DHA en la madre en la semana 20 y 40 de embarazo y en cordón umbilical se correlacionaron de forma positiva con las puntuaciones de ERP de Conflicto en sus hijos a los 8.5 años de edad. Además, el folato en plasma del cordón umbilical se correlacionó significativamente con el promedio de puntuaciones de Conflicto para el clúster BA24 ($r=0.25$, $p < 0.01$) en las ventana de tiempo de interés (200-550 post-comienzo del objetivo). El EPA en los fosfolípidos del plasma materno en el momento del parto se correlacionó negativamente con la activación diferencial del clúster BA40 ($r=-0.23$, $p < 0.05$).

El índice AA/DHA en la madre en la semana 30 de gestación y los PUFAs>n-6 en el momento del parto se correlacionaron positivamente con el tiempo de reacción de las puntuaciones de alerta.



5. Discusión

5.1 Estudio 1. Efectos de la suplementación con aceite de pescado y/o 5-metil-tetrahidrofolato en madres gestantes sobre la atención en sus hijos a los 7.5 a 9 años.

El objetivo principal de éste estudio fue investigar los efectos de la suplementación materna con aceite de pescado {Fish oil (FO): 500 mg de DHA+150 mg de EPA/día} y/o 5-MTHF desde la semana 20 de gestación hasta el momento del parto, sobre desarrollo de la atención en los niños a los 7.5 y 9 años de vida. El presente estudio es único al tratar de evaluar los efectos de la suplementación de FO y 5-MTHF prenatal con referencia a la atención de los niños, llevando a cabo un seguimiento tan detallado a lo largo del tiempo y tan a largo plazo (Campoy et al., 2011; Helland, Smith, Saarem, Saugstad, & Drevon, 2003; Helland et al., 2008).

Los hallazgos del presente estudio muestran que la suplementación con FO mejora la atención de los niños a los 9 años en comparación con los demás grupos en la prueba CCTT 1 y Stroop Color. En el caso del CCTT1, CCTT2 y Stroop Color, los niños cuyas madres recibieron suplementos con FO durante la gestación mostraron más posibilidades de obtener una puntuación por encima del percentil 75, respecto a los niños de los otros grupos de estudio. En relación a la prueba Stroop Palabra-Color, los grupos suplementados no presentan una mejora con respecto a la atención, en congruencia con estudios previos publicados (Muldoon et al., 2010; Ryan & Nelson, 2008b). La suplementación con 5- MTHF o FO+5-MTHF no produjeron ningún cambio significativo en la atención medida con los tests mencionados. Se ha comprobado que la suplementación con FO resulta en un aumento de los valores plasmáticos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (DHA y EPA), lo cual puede ser un tratamiento efectivo para mejorar el desarrollo cognitivo, en especial la atención (Vaisman et al., 2008). Otros estudios han asociado Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad en niños con deficiencia de ácidos grasos esenciales y una reducción de las concentraciones plasmáticas de LC-PUFAs de las series n-3 y n-6 (Antalis et al., 2006).

Uno de los aspectos estudiados es la evolución de la atención entre los dos momentos temporales (7.5 vs 9 años). Tanto en las pruebas CCTT como en las pruebas Stroop se observa una mejoría en el rendimiento entre los 7.5 y los 9 años, lo cual es congruente con el proceso natural de desarrollo. En el

CCTT 2 la resolución de la tarea no muestra una diferencia significativa entre las diferentes edades, probablemente debido a la complejidad de la tarea.

Otro aspecto importante relacionado con el rendimiento en las pruebas atencionales es la influencia del tipo de parto, ya que se observa un efecto negativo en la atención de los niños medido en la prueba del CCTT1, siendo los niños nacidos por cesárea los que muestran un peor desempeño en la misma; aunque la bibliografía es escasa con relación a este tema, existen estudios como el de Ketzer et al. 2012, donde se ha visto que en los partos con complicaciones perinatales los niños tienen mayor riesgo de padecer un déficit de atención.

En relación a los niveles plasmáticos de ácidos grasos y folato, hay una asociación positiva entre el índice AA/DHA en PE de las madres en el momento del parto y la atención de los niños tanto para la prueba CCTT 1 y 2. Con respecto a la prueba Stroop se observa una asociación similar en el índice AA/DHA en la semana 30 del embarazo y en los niveles de AA del cordón umbilical. (Colombo et al., 2004a; Koletzko et al., 2008; Vaisman et al., 2008) encontraron evidencia que sugiere una conexión entre los niveles de DHA de la madre en el momento del parto y cordón umbilical, y un beneficio en el desarrollo cognitivo y atencional en la infancia (Bouwstra et al., 2006; Escolano-Margarit et al., 2011). Recientemente, Lepping et al. (Lepping RJ, et al. 2019) han demostrado en el seguimiento de los niños participantes en el estudio DIAMOND que el equilibrio entre DHA y AA determina una mayor conectividad funcional entre las regiones de las redes de atención dorsal (IPL) y ventral (DLPFC/Insula). Aunque estos dos sistemas de atención están implicados en diferentes procesos de atención, la coordinación es crítica para la orientación y los cambios de flexibilidad en las tareas de atención (Vossel, Geng, & Fink, 2014). Estos resultados confirman la importancia del equilibrio entre AA y DHA en la vida precoz obtenidos en el presente estudio y de los efectos sobre la atención de los niños a largo plazo.

Sorprendentemente, el consumo de tabaco ha mostrado una relación positiva con el Stroop. Estos resultados van en dirección opuesta a resultados previos que han mostrado el consumo de tabaco afecta de manera negativa en el desarrollo ulterior de la atención del niño (Banerjee, Middleton, & Faraone, 2007); asimismo, otros estudios previos han encontrado asociaciones negativas entre el consumo de tabaco por parte de la madre en el embarazo y el rendimiento de sus niños y el desempeño de los niños en diversas tareas de atención a los 6 años de edad (Fried, Watkinson, & Gray, 1992;

Leech, Richardson, Goldschmidt, & Day, 1999). Por esto, consideramos que los resultados obtenidos pueden ser espurios y deberán ser replicados.

5.2 Estudio 2. La suplementación materna de folato y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga durante la gestación y sus efectos en el sistema atencional de sus hijos a los 8.5 años. Estudio a doble ciego aleatorizado.

En el presente estudio aleatorizado a doble ciego, intentamos determinar los efectos de la suplementación materna durante la gestación con FO y/o 5-MTHF en el desarrollo a largo plazo del sistema de atención de los niños, respecto a aquellos cuyas madres recibieron placebo. Se obtuvieron dos resultados importantes; en primer lugar, tal y como se esperaba, dependiendo del tipo de suplementación que recibieron las madres desde la semana 20 de gestación hasta el momento del parto, se pudo observar un aumento de las concentraciones de ácidos grasos en los fosfolípidos del plasma y/o ácido fólico tanto en la madre como en el hijo (cordón umbilical) (Tablas 21 y 22). En segundo lugar, se comprobaron efectos a largo plazo de la intervención temprana en la madre, sobre el sistema atencional del niño a los 8.5 años. Se pudieron comprobar efectos de la suplementación materna sobre la conducta y la actividad cerebral (especialmente del 5-MTHF) sobre la red atencional Ejecutiva, y en menor grado sobre la red de Alerta. Teniendo en cuenta que la brecha temporal entre la suplementación nutricional en la madre y las pruebas de atención realizadas en los hijos fue de 8.5 años, los resultados obtenidos muestran una relación causal entre la alimentación temprana en la madre y el desarrollo a largo plazo de su hijo. Es interesante destacar que estos efectos se producen en un período crítico de maduración de las funciones ejecutivas (Shaw P, et al., 2008).

5.2.1 Atención ejecutiva

En relación a las medidas comportamentales, se observó que el índice de eficiencia de la red Ejecutiva (Puntuaciones de Conflicto) fue más bajo (mejor) en niños nacidos de madres suplementadas solamente con 5-MTHF; estos niños mostraron un mejor desempeño de aquellos nacidos de madres suplementadas con Placebo y FO+5-MTHF. Además, los análisis de ERP indicaron que en un conjunto de canales del hemisferio frontal-izquierdo, la eficiencia de las puntuaciones de ERP eran más altas a

los 270-290 ms post-objetivo en niños nacidos de madres suplementadas con 5-MTHF respecto al resto de los grupos. Esta ventana de tiempo se piensa habitualmente cuando se realiza una monitorización del conflicto y la supresión de la conducta irrelevante, y se interpreta como un índice neurológico de la función ejecutiva en niños (Abundis-Gutierrez, Checa, Castellanos, & Rosario, 2014; Espinet, Anderson, & Zelazo, 2013). Las estimaciones actuales de las fuentes de densidad cerebral indican que hay diferencias en la activación de un clúster de voxels localizados en la corteza medio-frontal derecha (incluyendo el cíngulo dorsal, área BA24). Se ha sugerido que estas áreas están involucradas en el control general del comportamiento (Fedorenko, Duncan, & Kanwisher, 2013) y en diferencias en la monitorización del conflicto como función de las trayectorias del desarrollo (van Meel, Heslenfeld, Rommelse, Oosterlaan, & Sergeant, 2012). Además, las diferencias de incongruencia-congruencia en la activación estimada de esta área cerebral, y los voltajes en el cráneo, están relacionados positivamente con los niveles de ácido fólico en plasma de cordón umbilical, pero no con las concentraciones de ácidos grasos en los fosfolípidos plasmáticos. Además, a pesar que no se comprobaron diferencias en las prevalencias del polimorfismo del MTHFR C677T, esta variación del MTHFR determina resultados similares, ya que una baja ingesta de folatos parece ser responsable de la disfunción del control de la respuesta por parte del cíngulo dorsal (Roffman et al., 2011a), cuya intensidad va a depender de los alelos de MTHFR que porte la madre (Roffman et al., 2011b). A esto se añade que se ha comprobado en *Macacus Rhesus* que los niveles altos de la homocisteína sérica se asocian a una reducción del volumen de materia gris en el córtex cíngulado anterior y medio, entre otras áreas cerebrales (Willette et al., 2012). Estos resultados sugieren que la suplementación prenatal con ácido fólico puede mejorar la función de las áreas cerebrales involucradas en el control ejecutivo de la conducta, tal vez previniendo la deficiencia de dopamina prefrontal comúnmente observada en las patologías de las funciones ejecutivas (Roffman et al., 2008).

Los niños nacidos de madres suplementadas con aceite de pescado mostraron también una pequeña ventaja en la resolución del conflicto (el grupo FO presentaron puntuaciones entre el grupo 5-MTHF y el grupo placebo y FO+5-MTHF). Aunque se esperaba ventajas en la función ejecutiva en este grupo, las recientes revisiones sistemáticas y meta-análisis de estudios a doble ciego con grupo control, indicaron que no hay una evidencia cierta en los efectos a largo plazo de la suplementación de LC-PUFA's durante el embarazo sobre el desarrollo cognitivo (Campoy et al., 2012; Gould et al., 2013).

De igual modo, varios resultados de RCT's han fracasado en el intento de mostrar ventajas a largo plazo en las respuestas a tareas de conflicto de sus participantes: a) Niños nacidos de madres lactantes suplementados con FO (Cheatham, Nerhammer, Asserhoj, Michaelsen, & Lauritzen, 2011b), o b) niños suplementados durante varias semanas antes de las evaluaciones cognitivas (Jackson, Reay, Scholey, & Kennedy, 2012; Yi, Kable, Evatt, & Singh, 2011). Además, parece que el aumento en el consumo de FO durante el embarazo no debe tener necesariamente un efecto a largo plazo sobre las funciones ejecutivas. Son necesarios más estudios para descubrir los efectos reales del FO durante la gestación sobre las redes frontales involucradas en las funciones ejecutivas.

También se pudo observar una reducción de la ventaja en la función ejecutiva de la suplementación temprana con 5-MTHF cuando se añade Aceite de Pescado (la condición FO+5-MTHF no difirió del grupo Placebo en ninguna de las medidas, pero fue diferente del grupo 5-MTHF cuando las madres lo recibieron de forma única). Por el momento, no existe un solo estudio con este mismo diseño, de tal manera que los resultados contradictorios reportados aquí, especialmente los relacionados con el grupo FO+5-MTHF deben ser tomados con cautela y necesitan de una investigación futura. Un posible mecanismo para esta interacción puede estar relacionado con alteraciones metabólicas (Jackson et al., 2012; Rao, Joshi, Kale, Hegde, & Mahadik, 2006). Se pudo comprobar que el ácido fólico en plasma en la semana 30 del embarazo resultó 1.5 veces superior en los grupos FO+5-MTHF y 5-MTHF. Teniendo en cuenta que el ácido fólico en plasma está significativamente relacionado con las puntuaciones de resolución de Conflicto, se puede decir que los beneficios del ácido fólico durante la gestación sobre las áreas cerebrales que controlan las funciones ejecutivas es dosis dependiente. Esto concuerda con los resultados de otros estudios que muestran una relación dosis-respuesta entre las concentraciones del folato en plasma y el riesgo de padecer problemas emocionales en niños de 6 años nacidos de madres deficientes de ácido fólico en el embarazo (Jackson et al., 2012; Steenweg-de et al., 2012; Jackson et al., 2012; Steenweg-de et al., 2012).

Diferentes estudios han demostrado una clara relación entre el ácido fólico, la vitamina B12 y los LC-PUFAs; de hecho, se ha sugerido un mecanismo sinérgico (Jackson et al., 2012; Meher, Joshi, & Joshi, 2014; Umhau et al., 2006). No obstante, esta posibilidad no explicaría por completo el aumento similar de las concentraciones de DHA en los fosfolípidos del plasma materno observado en las madres

que recibieron la suplementación FO o junto con 5-MTHF, con diferentes efectos a largo plazo sobre los sistemas de atención evaluados.

5.2.2. Red de Alerta

Los niños nacidos de madres suplementadas con FO o 5-MTHF no parecen aprovechar la ventaja de la información provista por la señal de alerta cercana a la presentación del objetivo, eso quiere decir, que su preparación para responder parece estar disminuida respecto a los niños nacidos de madres que recibieron Placebo o FO+5-MTHF. Estos resultados son coherentes con la propuesta relación inhibitoria entre las redes de conflicto y de alerta (Abundis-Gutierrez et al., 2014; Callejas, Lupianez, Funes, & Tudela, 2005; Jackson et al., 2012). Dado que las áreas cerebrales involucradas en las redes de alerta, estructuras subcorticales como el locus coeruleus, además de las áreas parietales y prefrontales, con la participación fundamental de la liberación de norepinefrina en la fase de alerta, merece la pena sugerir que el potencial efecto de estos dos nutrientes se basa en la reducción de las concentraciones de norepinefrina. Con esta idea, Hamazaki et al., 2005 en un estudio aleatorizado observaron que la suplementación aún pequeñas dosis de EPA+DHA reducían significativamente las concentraciones plasmáticas de norepinefrina, respecto al grupo control. Por otro lado, las bajas puntuaciones de Alerta en los niños nacidos de madres suplementadas con 5-MTHF pueden estar relacionadas a un aumento del nivel de norepinefrina. Los efectos de norepinefrina sobre la corteza cerebral son concentración-dependientes (Aston-Jones, Chiang, & Alexinsky, 1991), así que altas tasas de actividad del locus coeruleus (fuente cerebral de norepinefrina) pueden alterar el desempeño de la memoria (Birnbaum, Gobeske, Auerbach, Taylor, & Arnsten, 1999; Finlay, Zigmond, & Abercrombie, 1995), y del sistema de alerta (Rajkowski, Kubiak, & Aston-Jones, 1994; Usher, Cohen, Servan-Schreiber, Rajkowski, & Aston-Jones, 1999).

A pesar de la alta tasa de abandono en el presente estudio, se ha podido detectar una diferencia en el tiempo de reacción para las puntuaciones de conflicto (36 ms) en Atención Ejecutiva (poder estadístico de 80%). Además, éste es el primer estudio en el mundo en tener éste tipo de análisis en relación a la nutrición en 130 niños. El poder estadístico del estudio resultó lo suficientemente alto para detectar diferencias electrofisiológicas relevantes entre los grupos de estudio. Sólo existe una tendencia

observada en algunos de los resultados obtenidos mediante EEG, la cual probablemente sería significativa con una población más grande; pero, en general, no parece que una población más grande hubiera conducido a encontrar diferencias significativas en la mayoría de los sistemas de atención estudiados.

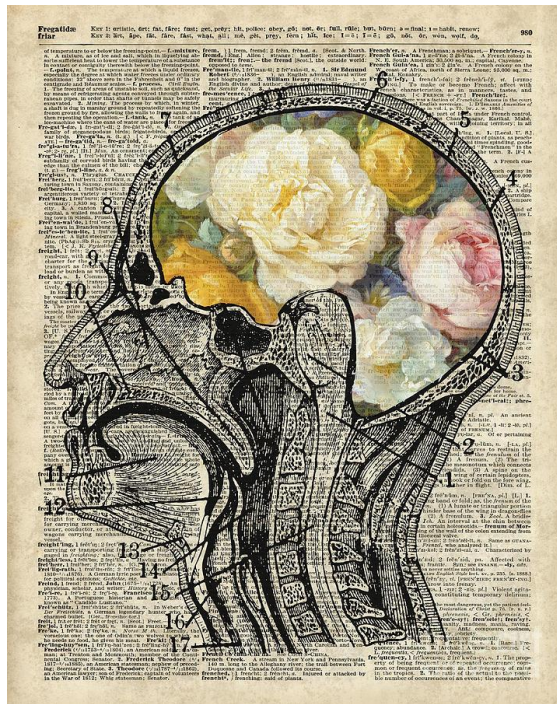
En relación al análisis de correlación con los parámetros bioquímicos, en el presente estudio se ha intentado ofrecer los resultados obtenidos con el análisis exploratorio, con los datos que consideramos interesantes, y por tanto se decidió no corregir por los problemas de comparación múltiple. Pero está claro que los resultados obtenidos requieren ser confirmados con estudios posteriores y mayor tamaño muestral.



6. Conclusiones

CONCLUSIONES:

- 1) La suplementación materna con FO durante la gestación mejora la atención en sus hijos a los 8.5 años medida con el CCTT. Esa mejoría se correlaciona de forma positiva con el índice AA:DHA.
- 2) Tras el ajuste por los factores confusores, los niños cuyas madres fueron suplementados con FO durante el embarazo, tienen más probabilidad de puntuar por encima del percentil 75 en los tests CCTT 1, CCTT 2 y Stroop Color.
- 3) La suplementación durante la gestación con 5-MTHF, y no el FO o FO+5-MTHF, mejora la atención ejecutiva (resolución del conflicto) en los niños a los 8.5 años, medida con la tarea ANT. Esta ventaja en la resolución del conflicto parece estar basada en la activación del córtex cingulado, área del cerebro fundamental en la red ejecutiva, cuya actividad parece ser dependiente de las concentraciones de ácido fólico en plasma durante la gestación.
- 4) El nivel del índice AA:DHA durante la gestación y el parto se asocia a la activación del córtex cingulado en sus hijos a los 8.5 años de edad. Se demuestra una vez más la importancia del equilibrio entre ambos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, AA y DHA, y la necesidad de un estado nutricional adecuado de estos ácidos grasos en la vida precoz, por el gran impacto a largo plazo que muestran sobre el desarrollo cerebral.
- 5) Los resultados que se exponen en el presente trabajo coinciden tanto los obtenidos mediante tests neuropsicológicos como los obtenidos mediante EEG/ERP que confirman los efectos de la suplementación prenatal sobre el desarrollo de la atención de los niños a la edad escolar. Los resultados sugieren la existencia de una programación precoz del córtex cingulado de los niños que se manifiesta a largo plazo en la edad escolar. Estos hallazgos son importantes para la salud pública, pues indican la posibilidad de diseñar estrategias individualizadas de intervención nutricional en la vida precoz que permitan mejorar el desarrollo cerebral de la población.



7. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abundis-Gutierrez, A., Checa, P., Castellanos, C., & Rosario, R. M. (2014). Electrophysiological correlates of attention networks in childhood and early adulthood. *Neuropsychologia*, *57*, 78-92.
- Agostini, C., Bellu, R., Troajn, S., Riva, E., & Giovannini, M. (1995). Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pediatric Research*, *38*, 262-266.
- Agostoni, C., Scaglioni, S., Bonvissuto, M., Bruzzese, M. G., Giovannini, M., & Riva, E. (2001). Biochemical effects of supplemented long-chain polyunsaturated fatty acids in hyperphenylalaninemia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, *64*(2), 111-115.
- Almaas, A. N., Tamnes, C. K., Nakstad, B., Henriksen, C., Walhovd, K. B., Fjell, A. M. et al. (2015). Long-chain polyunsaturated fatty acids and cognition in VLBW infants at 8 years: an RCT. *Pediatrics*, *135*, 972-980.
- Almeida, D. M., Jandacek, R. J., Weber, W. A., & McNamara, R. K. (2017). Docosahexaenoic acid biostatus is associated with event-related functional connectivity in cortical attention networks of typically developing children. *Nutr. Neurosci.*, *20*, 246-254.
- Alshweki, A., Munuzuri, A. P., Bana, A. M., de Castro, M. J., Andrade, F., Aldamiz-Echevarria, L. et al. (2015). Effects of different arachidonic acid supplementation on psychomotor development in very preterm infants; a randomized controlled trial. *Nutr.J.*, *14*, 101.
- Ambrosini, E., Vastano, R., Montefinese, M., & Ciavarrò, M. (2013). Functional specificity of the locus coeruleus-norepinephrine system in the attentional networks. *Front Behav. Neurosci.*, *7*, 201.
- Armengol, C. G. (2002). Stroop test in Spanish: Children's norms. *The Clinical Neuropsychologist*, *16*(1), 67-80.
- Anderson, J. R., Bothell, D., Byrne, M. D., Douglass, S., Lebiere, C., & Qin, Y. (2004). An integrated theory of the mind. *Psychol.Rev.*, *111*, 1036-1060.
- Anderson, N. D., Craik, F. I., & Naveh-Benjamin, M. (1998). The attentional demands of encoding and retrieval in younger and older adults: 1. Evidence from divided attention costs. *Psychol.Aging*, *13*, 405-423.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Remley, D. T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, *70*(4), 525-535.
- Anjos, T., Altmae, S., Emmett, P., Tiemeier, H., Closa-Monasterolo, R., Luque, V. et al. (2013). Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur.J.Nutr.*, *52*, 1825-1842.
- Antalis, C. J., Stevens, L. J., Campbell, M., Pazdro, R., Ericson, K., & Burgess, J. R. (2006). Omega-3 fatty acid status in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *75*, 299-308.
- Aston-Jones, G., Chiang, C., & Alexinsky, T. (1991). Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog.Brain Res.*, *88*, 501-520.
- Banerjee, T. D., Middleton, F., & Faraone, S. V. (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr.*, *96*, 1269-1274.
- Belânger, S. A., Vanesse, M., Sphalis, S., Silvestre, M., Lippé, S., L'Hereux, F. et al. (2009). Omega-3 fatty acid treatment of children with attention-deficit hyperactivity disorder: A randomized, double blind, placebo controlled study. *Pediatrics Children Health*, *14*, 89-98.
- Bertrand, P. C., O'kusky, J. R., & Innis, S. M. (2006). Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. *The Journal of nutrition*, *136*, 1570-1575.
- Birch, E. E., Carlson, S. E., Hoffman, D. R., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Fu, V. L., Drover, J. R. et al. (2010). The DIAMOND (DHA Intake And Measurement Of Neural Development) Study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of

- docosahexaenoic acid. *Am.J.Clin.Nutr.*, *91*, 848-859.
- Birch, E. E., Castaneda, Y. S., Wheaton, D. H., Birch, D. G., Uauy, R. D., & Hoffman, D. R. (2005). Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 mo. *Am.J.Clin.Nutr.*, *81*, 871-879.
- Birch, E. E., Garfield, S., Hoffman, D. R., Uauy, R., & Birch, D. G. (2000). A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev.Med.Child Neurol.*, *42*, 174-181.
- Birnbaum, S., Gobeske, K. T., Auerbach, J., Taylor, J. R., & Arnsten, A. F. (1999). A role for norepinephrine in stress-induced cognitive deficits: alpha-1-adrenoceptor mediation in the prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry*, *46*, 1266-1274.
- Bos, D. J., van Montfort, S. J., Oranje, B., Durston, S., & Smeets, P. A. (2016). Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human brain morphology and function: What is the evidence? *Eur.Neuropsychopharmacol.*, *26*, 546-561.
- Bouwstra, H., Dijck-Brouwer, J., Decsi, T., Boehm, G., Boersma, E. R., Muskiet, F. A. et al. (2006). Neurologic condition of healthy term infants at 18 months: positive association with venous umbilical DHA status and negative association with umbilical trans-fatty acids. *Pediatr.Res.*, *60*, 334-339.
- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients.*, *3*, 529-554.
- Braver, T. S., Barch, D. M., Gray, J. R., Molfese, D. L., & Snyder, A. (2001). Anterior cingulate cortex and response conflict: effects of frequency, inhibition and errors. *Cereb.Cortex*, *11*, 825-836.
- Brew, B. K., Toelle, B. G., Webb, K. L., Almqvist, C., & Marks, G. B. (2015). Omega-3 supplementation during the first 5 years of life and later academic performance: a randomised controlled trial. *Eur.J.Clin.Nutr.*, *69*, 419-424.
- Burgess, J. R., Stevens, L., Zhang, W., & Peck, L. (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am.J.Clin.Nutr.*, *71*, 327S-330S.
- Callejas, A., Lupianez, J., Funes, M. J., & Tudela, P. (2005). Modulations among the alerting, orienting and executive control networks. *Exp.Brain Res.*, *167*, 27-37.
- Campoy, C., Escolano-Margarit, M. V., Anjos, T., Szajewska, H., & Uauy, R. (2012). Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br.J.Nutr.*, *107 Suppl 2*, S85-106.
- Campoy, C., Escolano-Margarit, M. V., Ramos, R., Parrilla-Roure, M., Csabi, G., Beyer, J. et al. (2011). Effects of prenatal fish-oil and 5-methyltetrahydrofolate supplementation on cognitive development of children at 6.5 y of age. *Am.J.Clin.Nutr.*, *94*, 1880S-1888S.
- Carlson, S. E., Ford, A. J., Werkman, S. H., Peeples, J. M., & Koo, W. W. (1996). Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Pediatr.Res.*, *39*, 882-888.
- Caspi, A., Williams, B., Kim-Cohen, J., Craig, I. W., Milne, B. J., Poulton, R. et al. (2007). Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *104*, 18860-18865.
- Cetin, I., & Koletzko, B. (2008). Long-chain ω -3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *11*(3), 297-302.
- Cheatham, C. L., Nerhammer, A. S., Asserhoj, M., Michaelsen, K. F., & Lauritzen, L. (2011a). Fish oil supplementation during lactation: effects on cognition and behavior at 7 years of age. *Lipids*, *46*, 637-645.
- Cheatham, C. L., Nerhammer, A. S., Asserhoj, M., Michaelsen, K. F., & Lauritzen, L. (2011b). Fish oil supplementation during lactation: effects on cognition and behavior at 7 years of age. *Lipids*, *46*, 637-645.
- Checa Ros, A. (2017). Valoración del sueño mediante actigrafía en niños con trastornos del sueño y con déficit de atención y/o hiperactividad (TDAH): Papel de la melatonina y ácidos grasos de la serie omega-3.
- Checa, P., Castellanos, M. C., Abundis-Gutiérrez, A., & Rosario Rueda, M. (2014). Development of neural mechanisms of conflict and error processing during childhood: implications for self-regulation. *Frontiers in Psychology*, *5*, 326.
- Chica, A. B., Bartolomeo, P., & Valero-Cabre, A. (2011). Dorsal and ventral parietal

- contributions to spatial orienting in the human brain. *J.Neurosci.*, *31*, 8143-8149.
- Chmielewska, A., Dziechciarz, P., Gieruszczak-Bialek, D., Horvath, A., Piescik-Lech, M., Ruszczynski, M. et al. (2016). Effects of prenatal and/or postnatal supplementation with iron, PUFA or folic acid on neurodevelopment: update. *Br.J.Nutr.*, 1-6.
- Cohen, J. A., Deblinger, E., & Mannarino, A. (2004). Trauma-focused cognitive-behavioral therapy for sexually abused children. *Psychiatric Times*, *21*(10), 109-121.
- Collins, C. T., Gibson, R. A., Anderson, P. J., McPhee, A. J., Sullivan, T. R., Gould, J. F. et al. (2015a). Neurodevelopmental outcomes at 7 years' corrected age in preterm infants who were fed high-dose docosahexaenoic acid to term equivalent: a follow-up of a randomised controlled trial. *BMJ Open.*, *5*, e007314.
- Collins, C. T., Gibson, R. A., Anderson, P. J., McPhee, A. J., Sullivan, T. R., Gould, J. F. et al. (2015b). Neurodevelopmental outcomes at 7 years' corrected age in preterm infants who were fed high-dose docosahexaenoic acid to term equivalent: a follow-up of a randomised controlled trial. *BMJ Open.*, *5*, e007314.
- Colombo, J., Kannass, K. N., Shaddy, D. J., Kundurthi, S., Maikranz, J. M., Anderson, C. J. et al. (2004). Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. *Child Dev.*, *75*, 1254-1267.
- Colombo, J., Carlson, S. E., Cheatham, C. L., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Kepler, A., & Doty, T. (2011a). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infancy reduces heart rate and positively affects distribution of attention. *Pediatr.Res.*, *70*, 406-410.
- Colombo, J., Carlson, S. E., Cheatham, C. L., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Kepler, A., & Doty, T. (2011b). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infancy reduces heart rate and positively affects distribution of attention. *Pediatr.Res.*, *70*, 406-410.
- Colombo, J., Gustafson, K. M., Gajewski, B. J., Shaddy, D. J., Kerling, E. H., Thodosoff, J. M. et al. (2016). Prenatal DHA supplementation and infant attention. *Pediatr.Res.*, *80*, 656-662.
- Colter, A. L., Cutler, C., & Meckling, K. A. (2008). Fatty acid status and behavioural symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adolescents: a case-control study. *Nutr.J.*, *7*, 8.
- Cooley, E. L. & Morris, R. D. (2009). Attention in children: A neuropsychologically based model for assessment. *Developmental Neuropsychology*, *6*, 239-274.
- Corbetta, M., Kincade, J. M., & Shulman, G. L. (2002). Neural systems for visual orienting and their relationships to spatial working memory. *J.Cogn Neurosci.*, *14*, 508-523.
- Corteen, R. S. & Wood, B. (1972). Autonomic responses to shock-associated words in an unattended channel. *J.Exp.Psychol.*, *94*, 308-313.
- Crider, K. S., Devine, O., Hao, L., Dowling, N. F., Li, S., Molloy, A. M., ... & Berry, R. J. (2014). Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: Bayesian model. *Bmj*, *349*, g4554.
- de, J. C., Kikkert, H. K., Fidler, V., & Hadders-Algra, M. (2010). The Groningen LCPUFA study: no effect of postnatal long-chain polyunsaturated fatty acids in healthy term infants on neurological condition at 9 years. *Br.J.Nutr.*, *104*, 566-572.
- Demmelair, H., von, R. J., & Koletzko, B. (2006). Long-term consequences of early nutrition. *Early Hum.Dev.*, *82*, 567-574.
- Denomme, J., Stark, K. D., & Holub, B. J. (2005). Directly quantitated dietary (n-3) fatty acid intakes of pregnant Canadian women are lower than current dietary recommendations. *J.Nutr.*, *135*, 206-211.
- Dorner, G. (1983). Hormone-dependent brain development. *Psychoneuroendocrinology*, *8*, 205-212.
- Drover, J., Hoffman, D. R., Castaneda, Y. S., Morale, S. E., & Birch, E. E. (2009). Three randomized controlled trials of early long-chain polyunsaturated Fatty Acid supplementation on means-end problem solving in 9-month-olds. *Child Dev.*, *80*, 1376-1384.
- Drover, J. R., Felius, J., Hoffman, D. R., Castaneda, Y. S., Garfield, S., Wheaton, D. H. et al. (2012). A randomized trial of DHA intake during infancy: school readiness and receptive vocabulary at 2-3.5 years of age. *Early Hum.Dev.*, *88*, 885-891.
- Dunstan, J. A., Simmer, K., Dixon, G., & Prescott, S. L. (2008). Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed*, *93*, F45-F50.

- Elmadfa, I. & Meyer, A. L. (2012). Vitamins for the first 1000 days: preparing for life. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.*, *82*, 342-347.
- Escamilla-Nuñez, M. C., Barraza-Villarreal, A., Hernández-Cadena, L., Navarro-Olivos, E., Sly, P. D., & Romieu, I. (2014). Omega-3 fatty acid supplementation during pregnancy and respiratory symptoms in children. *Chest*, *146*(2), 373-382.
- Escolano-Margarit, M. V., Campoy, C., Ramirez-Tortosa, M. C., Demmelmair, H., Miranda, M. T., Gil, A. et al. (2013). Effects of fish oil supplementation on the fatty acid profile in erythrocyte membrane and plasma phospholipids of pregnant women and their offspring: a randomised controlled trial. *Br.J.Nutr.*, *109*, 1647-1656.
- Escolano-Margarit, M. V., Ramos, R., Beyer, J., Csabi, G., Parrilla-Roure, M., Cruz, F. et al. (2011). Prenatal DHA status and neurological outcome in children at age 5.5 years are positively associated. *J.Nutr.*, *141*, 1216-1223.
- Espinet, S. D., Anderson, J. E., & Zelazo, P. D. (2013). Reflection training improves executive function in preschool-age children: behavioral and neural effects. *Dev.Cogn Neurosci.*, *4*, 3-15.
- Falkenstein, M., Hoormann, J., Christ, S., & Hohnsbein, J. (2000). ERP components on reaction errors and their functional significance: a tutorial. *Biol.Psychol.*, *51*, 87-107.
- Fan, J., Flombaum, J. I., McCandliss, B. D., Thomas, K. M., & Posner, M. I. (2003). Cognitive and brain consequences of conflict. *Neuroimage.*, *18*, 42-57.
- Fan, J., McCandliss, B. D., Fossella, J., Flombaum, J. I., & Posner, M. I. (2005). The activation of attentional networks. *Neuroimage.*, *26*, 471-479.
- Fan, J., McCandliss, B. D., Sommer, T., Raz, A., & Posner, M. I. (2002). Testing the efficiency and independence of attentional networks. *J.Cogn Neurosci.*, *14*, 340-347.
- Fang, P. C., Kuo, H. K., Huang, C. B., Ko, T. Y., Chen, C. C., & Chung, M. Y. (2005). The effect of supplementation of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on visual acuity and neurodevelopment in larger preterm infants. *Chang Gung.Med.J.*, *28*, 708-715.
- Fazili, Z., Pfeiffer, C. M., Zhang, M., & Jain, R. (2005). Erythrocyte folate extraction and quantitative determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison of results with microbiologic assay. *Clin.Chem.*, *51*, 2318-2325.
- Fedorenko, E., Duncan, J., & Kanwisher, N. (2013). Broad domain generality in focal regions of frontal and parietal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *110*, 16616-16621.
- Feng, L., Ng, T. P., Chuah, L., Niti, M., & Kua, E. H. (2006). Homocysteine, folate, and vitamin B-12 and cognitive performance in older Chinese adults: findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study. *Am.J.Clin.Nutr.*, *84*, 1506-1512.
- Fewtrell, M. S., Abbott, R. A., Kennedy, K., Singhal, A., Morley, R., Caine, E. et al. (2004). Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants. *J.Pediatr.*, *144*, 471-479.
- Finlay, J. M., Zigmond, M. J., & Abercrombie, E. D. (1995). Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience*, *64*, 619-628.
- FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, *226*, 497-509.
- Folstein, J. R. & Van, P. C. (2008). Influence of cognitive control and mismatch on the N2 component of the ERP: a review. *Psychophysiology*, *45*, 152-170.
- Fried, P. A., Watkinson, B., & Gray, R. (1992). A follow-up study of attentional behavior in 6-year-old children exposed prenatally to marijuana, cigarettes, and alcohol. *Neurotoxicol.Teratol.*, *14*, 299-311.
- Furuya Gispert-Llaurado, M., Perez-Garcia, M., Escribano, J., Closa-Monasterolo, R., Luque, V., Grote, V., ... & Martin, F. (2016). Fish consumption in mid-childhood and its relationship to neuropsychological outcomes measured in 7-9 year old children using a NUTRIMENTHE neuropsychological battery. *Clinical Nutrition*, *35*(6), 1301-1307.
- Ghanizadeh, A., Sayyari, Z., & Mohammadi, M. R. (2013). Effect of methylphenidate and folic acid on ADHD symptoms and quality of life and aggression: a randomized double blind placebo controlled clinical trial. *Iranian journal of psychiatry*, *8*(3), 108.

- Georgieff, M. K. (2007a). Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am.J.Clin.Nutr.*, *85*, 614S-620S.
- Int.J.Med.Sci.*, *8*, 523-528.
- Golden, Z. L., & Golden, C. J. (2001). Do early onset conduct disordered adolescents perform like brain injured or normal adolescents on cognitive tests?. *International journal of neuroscience*, *111*(1-2), 109-121.
- Golden, C. J., & Freshwater, S. M. (1978). Stroop color and word test.
- Gould, J. F., Treyvaud, K., Yelland, L. N., Anderson, P. J., Smithers, L. G., Gibson, R. A. et al. (2016a). Does n-3 LCPUFA supplementation during pregnancy increase the IQ of children at school age? Follow-up of a randomised controlled trial. *BMJ Open.*, *6*, e011465.
- Gould, J. F., Anderson, A. J., Yelland, L. N., Gibson, R. A., & Makrides, M. (2016b). Maternal characteristics influence response to DHA during pregnancy. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *108*, 5-12.
- Gould, J. F., Makrides, M., Colombo, J., & Smithers, L. G. (2014). Randomized controlled trial of maternal omega-3 long-chain PUFA supplementation during pregnancy and early childhood development of attention, working memory, and inhibitory control. *Am.J.Clin.Nutr.*, *99*, 851-859.
- Gould, J. F., Smithers, L. G., & 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. *Am.J.Clin.Nutr.*, *97*, 531-544.
- Green, J. J., Conder, J. A., & McDonald, J. J. (2008). Lateralized frontal activity elicited by attention-directing visual and auditory cues. *Psychophysiology*, *45*, 579-587.
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., ... & Hinck, A. P. (2008). Cooperative assembly of TGF- β superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Molecular cell*, *29*(2), 157-168.
- Groppe, D. M., Urbach, T. P., & Kutas, M. (2011). Mass univariate analysis of event-related brain potentials/fields I: a critical tutorial review. *Psychophysiology*, *48*, 1711-1725.
- Hamazaki, K., Itomura, M., Huan, M., Nishizawa, H., Sawazaki, S., Tanouchi, M. et al. (2005). Effect of omega-3 fatty acid-containing phospholipids on blood catecholamine concentrations in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Nutrition*, *21*, 705-710.
- Harbild, H. L., Harslof, L. B., Christensen, J. H., Kannass, K. N., & Lauritzen, L. (2013). Fish oil-supplementation from 9 to 12 months of age affects infant attention in a free-play test and is related to change in blood pressure. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *89*, 327-333.
- Heaton, A. E., Meldrum, S. J., Foster, J. K., Prescott, S. L., & Simmer, K. (2013a). Does docosahexaenoic acid supplementation in term infants enhance neurocognitive functioning in infancy? *Front Hum.Neurosci.*, *7*, 774.
- Heaton, M. B., Siler-Marsiglio, K., Paiva, M., Kotler, A., Rogozinski, J., Kubovec, S. et al. (2013b). Ethanol influences on Bax associations with mitochondrial membrane proteins in neonatal rat cerebellum. *Dev.Neurobiol.*, *73*, 127-141.
- Helland, I. B., Smith, L., Blomen, B., Saarem, K., Saugstad, O. D., & Drevon, C. A. (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*, e472-e479.
- Helland, I. B., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O. D., & Drevon, C. A. (2003). Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*, *111*, e39-e44.
- Henriksen, C., Haugholt, K., Lindgren, M., Aurvag, A. K., Ronnestad, A., Gronn, M. et al. (2008). Improved cognitive development among preterm infants attributable to early supplementation of human milk with docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *Pediatrics*, *121*, 1137-1145.
- Hibbeln, J. R., Davis, J. M., Steer, C., Emmett, P., Rogers, I., Williams, C. et al. (2007). Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet*, *369*, 578-585.

- Hirayama, S., Hamazaki, T., & Terasawa, K. (2004). Effect of docosahexaenoic acid-containing food administration on symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder - a placebo-controlled double-blind study. *Eur.J.Clin.Nutr.*, *58*, 467-473.
- Hoet, J. J. & Hanson, M. A. (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J.Physiol*, *514* (Pt 3), 617-627.
- Huffman, S. L., Harika, R. K., Eilander, A., & Osendarp, S. J. (2011). Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Matern.Child Nutr.*, *7 Suppl 3*, 44-65.
- Huss, M., Volp, A., & Stauss-Grabo, M. (2010). Supplementation of polyunsaturated fatty acids, magnesium and zinc in children seeking medical advice for attention-deficit/hyperactivity problems - an observational cohort study. *Lipids Health Dis.*, *9*, 105.
- Innis, S. M. (2007a). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J.Nutr.*, *137*, 855-859.
- Innis, S. M., Davidson, A. G., Melynk, S., & James, S. J. (2007b). Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis. *Am.J.Clin.Nutr.*, *85*, 702-708.
- Innis, S. M. & Elias, S. L. (2003). Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women. *Am.J.Clin.Nutr.*, *77*, 473-478.
- Innis, S. M., Adamkin, D. H., Hall, R. T., Kalhan, S. C., Lair, C., Lim, M. et al. (2002). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid enhance growth with no adverse effects in preterm infants fed formula. *J.Pediatr.*, *140*, 547-554.
- Isaacs, E. B., Ross, S., Kennedy, K., Weaver, L. T., Lucas, A., & Fewtrell, M. S. (2011). 10-year cognition in preterms after random assignment to fatty acid supplementation in infancy. *Pediatrics*, *128*, e890-e898.
- Jackson, P. A., Reay, J. L., Scholey, A. B., & Kennedy, D. O. (2012). Docosahexaenoic acid-rich fish oil modulates the cerebral hemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults. *Biol.Psychol.*, *89*, 183-190.
- Jakobik, V., Burus, I., & Decsi, T. (2009). Fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in healthy subjects from birth to young adulthood. *Eur.J.Pediatr.*, *168*, 141-147.
- James, W. (1890). Origin of Right-handedness. *Science*, *16*, 275.
- Jensen, C. L., Voigt, R. G., Prager, T. C., Zou, Y. L., Fraley, J. K., Rozelle, J. C. et al. (2005). Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am.J.Clin.Nutr.*, *82*, 125-132.
- Jensen, C. L. & Lapillonne, A. (2009). Docosahexaenoic acid and lactation. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *81*, 175-178.
- Jensen, C. L., Voigt, R. G., Llorente, A. M., Peters, S. U., Prager, T. C., Zou, Y. L. et al. (2010). Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants. *J.Pediatr.*, *157*, 900-905.
- Jones, A. D., Cho, R. Y., Nystrom, L. E., Cohen, J. D., & Braver, T. S. (2002). A computational model of anterior cingulate function in speeded response tasks: effects of frequency, sequence, and conflict. *Cogn Affect.Behav.Neurosci.*, *2*, 300-317.
- 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. *Am.J.Clin.Nutr.*, *85*, 1572-1577.
- Julvez, J., Fortuny, J., Mendez, M., Torrent, M., Ribas-Fito, N., & Sunyer, J. (2009). Maternal use of folic acid supplements during pregnancy and four-year-old neurodevelopment in a population-based birth cohort. *Paediatr.Perinat.Epidemiol.*, *23*, 199-206.
- Kennedy, D. O., Jackson, P. A., Elliott, J. M., Scholey, A. B., Robertson, B. C., Greer, J., ... & Haskell, C. F. (2009). Cognitive and mood effects of 8 weeks' supplementation with 400 mg or 1000 mg of the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) in healthy children aged 10-12 years. *Nutritional neuroscience*, *12*(2), 48-56.
- Kennedy, K., Ross, S., Isaacs, E. B., Weaver, L. T., Singhal, A., Lucas, A. et al. (2010). The 10-year follow-up of a randomised trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants:

- effects on growth and blood pressure. *Arch.Dis.Child*, *95*, 588-595.
- Ketzer, C. R., Gallois, C., Martinez, A. L., Rohde, L. A., & Schmitz, M. (2012). Is there an association between perinatal complications and attention-deficit/hyperactivity disorder-inattentive type in children and adolescents? *Rev.Bras.Psiquiatr.*, *34*, 321-328.
- Kirby, A., Woodward, A., Jackson, S., Wang, Y., & Crawford, M. A. (2010). A double-blind, placebo-controlled study investigating the effects of omega-3 supplementation in children aged 8–10 years from a mainstream school population. *Research in developmental disabilities*, *31*(3), 718-730.
- Kitajka, K., Puskas, L. G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Barcelo-Coblijn, G., Yeo, Y. K. et al. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *99*, 2619-2624.
- Kolarovic, L. & Fournier, N. C. (1986). A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. *Anal.Biochem.*, *156*, 244-250.
- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Bohles, H., Campoy, C., Cetin, I. 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*, 5-14.
- Koletzko, B., Symonds, M. E., & Olsen, S. F. (2011). Programming research: where are we and where do we go from here? *Am.J.Clin.Nutr.*, *94*, 2036S-2043S.
- Koletzko, B., Chourdakis, M., Grote, V., Hellmuth, C., Prell, C., Rzehak, P., ... & Weber, M. (2014). Regulation of early human growth: impact on long-term health. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *65*(2-3), 101-109.
- Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y. et al. (2006). Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci.Res.*, *56*, 159-164.
- Kramer, M. S., Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R. W., Matush, L., ... & Collet, J. P. (2008). Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Archives of general psychiatry*, *65*(5), 578-584.
- Krauss-Etschmann, S., Shadid, R., Campoy, C., Hoster, E., Demmelmair, H., Jimenez, M. et al. (2007). Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am.J.Clin.Nutr.*, *85*, 1392-1400.
- Krauss-Etschmann, S., Hartl, D., Rzehak, P., Heinrich, J., Shadid, R., Del, C. R.-T. et al. (2008). Decreased cord blood IL-4, IL-13, and CCR4 and increased TGF-beta levels after fish oil supplementation of pregnant women. *J.Allergy Clin.Immunol.*, *121*, 464-470.
- Leech, S. L., Richardson, G. A., Goldschmidt, L., & Day, N. L. (1999). Prenatal substance exposure: effects on attention and impulsivity of 6-year-olds. *Neurotoxicol.Teratol.*, *21*, 109-118.
- Lepage, G., Levy, E., Ronco, N., Smith, L., Galeano, N., & Roy, C. C. (1989). Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J.Lipid Res.*, *30*, 1483-1490.
- Lepping R.J., Honea R.A., Martin L.E., Liao K., Choi IY., Lee P., Papa V., Brooks W.M., Shaddy D.J., Carlson S.E., Colombo J., Gustafson K.M. Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in the first year of life affects brain function, structure, and metabolism at age nine years. *Dev Psychobiol.* 2019 January; *61*(1): 5–16.
- Lewis, J. L. (1970). Semantic processing of unattended messages using dichotic listening. *J.Exp.Psychol.*, *85*, 225-228.
- Lo, Y. H., Liang, W. K., Lee, H. W., Wang, C. H., Tzeng, O. J., Hung, D. L. et al. (2013). The neural development of response inhibition in 5- and 6-year-old preschoolers: an ERP and EEG study. *Dev.Neuropsychol.*, *38*, 301-316.
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J.Nutr.*, *128*, 401S-406S.
- Lucas, A. (2005). Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. *J.Perinatol.*, *25 Suppl 2*, S2-S6.
- Llorente, A. M., Voigt, R. G., Williams, J., Frailey, J. K., Satz, P., & D'Elia, L. F. (2009). Children's Color Trails Test 1 & 2: test-retest reliability and factorial validity.

- The Clinical Neuropsychologist, 23(4), 645-660.
- Llorente, A. M., Voigt, R. G., Bhatnagar, P., Jensen, C. L., Heird, W. C., Williams, J., ... & Satz, P. (2012). Simultaneous visual sustained attention-discrimination and goal-directed search are associated with excretion of catecholaminergic metabolites in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 2(2), 115-122.
- MacDonald, P. A. & Joordens, S. (2000). Investigating a memory-based account of negative priming: support for selection-feature mismatch. *J.Exp.Psychol.Hum.Percept.Perform.*, 26, 1478-1496.
- Mackay, D. G. (1973). Aspects of the theory of comprehension, memory and attention. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 25, 22-40.
- Macnamara, A. & Hajcak, G. (2010). Distinct electrocortical and behavioral evidence for increased attention to threat in generalized anxiety disorder. *Depress.Anxiety.*, 27, 234-243.
- Makrides, M., Gibson, R. A., McPhee, A. J., Yelland, L., Quinlivan, J., & Ryan, P. (2010). Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial. *Jama*, 304(15), 1675-1683.
- Makrides, M., Collins, C. T., & Gibson, R. A. (2011). Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans. *Matern.Child Nutr.*, 7 Suppl 2, 80-88.
- Makrides, M., Gould, J. F., Gawlik, N. R., Yelland, L. N., Smithers, L. G., Anderson, P. J. et al. (2014). Four-year follow-up of children born to women in a randomized trial of prenatal DHA supplementation. *JAMA*, 311, 1802-1804.
- Malcolm, C. A., McCulloch, D. L., Montgomery, C., Shepherd, A., & Weaver, L. T. (2003). Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed*, 88, F383-F390.
- Martínez, H., Allen, L. H., Lung'aho, M., Chávez, A., & Pelto, G. H. (1994). Maternal fatness in Mexican women predicts body composition changes in pregnancy and lactation. In *Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation, and Infant Growth* (pp. 99-107). Springer, Boston, MA.
- Mattson, M. P. & Shea, T. B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.*, 26, 137-146.
- Mc Cann, J. C. & Ames, B. N. (2017a). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American journal of clinical nutrition*, 82, 281-295.
- Mc Cann, J. C. & Ames, B. N. (2017b). Reply to P Wainwright. *The American Journal of Nutrition*, 83, 920-921.
- MacLeod, C. M. (1991). Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review. *Psychological bulletin*, 109(2), 163.
- McNamara, R. K., Able, J., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Eliassen, J. C. et al. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation increases prefrontal cortex activation during sustained attention in healthy boys: a placebo-controlled, dose-ranging, functional magnetic resonance imaging study. *Am.J.Clin.Nutr.*, 91, 1060-1067.
- Meher, A., Joshi, A., & Joshi, S. (2014). Differential regulation of hepatic transcription factors in the Wistar rat offspring born to dams fed folic acid, vitamin B12 deficient diets and supplemented with omega-3 fatty acids. *PLoS.One.*, 9, e90209.
- Meldrum, S. J., D'Vaz, N., Simmer, K., Dunstan, J. A., Hird, K., & Prescott, S. L. (2012). Effects of high-dose fish oil supplementation during early infancy on neurodevelopment and language: a randomised controlled trial. *Br.J.Nutr.*, 108, 1443-1454.
- Meyer, B. J., Mann, N. J., Lewis, J. L., Milligan, G. C., Sinclair, A. J., & Howe, P. R. (2003). Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 38, 391-398.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1215.
- Millichap, J. G. & Yee, M. M. (2012). The diet factor in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 129, 330-337.
- Milte, C. M., Parletta, N., Buckley, J. D., Coates, A. M., Young, R. M., & Howe, P. R.

- (2015). Increased Erythrocyte Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Are Associated With Improved Attention and Behavior in Children With ADHD in a Randomized Controlled Three-Way Crossover Trial. *J.Atten.Disord.*, 19, 954-964.
- Milte, C. M., Parletta, N., Buckley, J. D., Coates, A. M., Young, R. M., & Howe, P. R. (2012). Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, cognition, and behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized controlled trial. *Nutrition*, 28(6), 670-677.
- Milte, C. M., Sinn, N., Buckley, J. D., Coates, A. M., Young, R. M., & Howe, P. R. (2011). Polyunsaturated fatty acids, cognition and literacy in children with ADHD with and without learning difficulties. *J.Child Health Care*, 15, 299-311.
- Mitchell, E. A., Aman, M. G., Turbott, S. H., & Manku, M. (1987). Clinical characteristics and serum essential fatty acid levels in hyperactive children. *Clin.Pediatr.(Phila)*, 26, 406-411.
- Mognon, A., Jovicich, J., Bruzzone, L., & Buiatti, M. (2011). ADJUST: An automatic EEG artifact detector based on the joint use of spatial and temporal features. *Psychophysiology*, 48, 229-240.
- Morse, N. L. (2012). Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. *Nutrients.*, 4, 799-840.
- Muldoon, M. F., Ryan, C. M., Sheu, L., Yao, J. K., Conklin, S. M., & Manuck, S. B. (2010). Serum phospholipid docosahexaenoic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. *J.Nutr.*, 140, 848-853.
- Muthayya, S., Dwarkanath, P., Thomas, T., Ramprakash, S., Mehra, R., Mhaskar, A., ... & Kurpad, A. V. (2009). The effect of fish and ω -3 LCPUFA intake on low birth weight in Indian pregnant women. *European journal of clinical nutrition*, 63(3), 340.
- Nguyen, C. T., Gracely, E. J., & Lee, B. K. (2013). Serum folate but not vitamin B-12 concentrations are positively associated with cognitive test scores in children aged 6-16 years. *J.Nutr.*, 143, 500-504.
- Novak, K. & Swain, M. G. (2008). Role of methotrexate in the treatment of chronic cholestatic disorders. *Clin.Liver Dis.*, 12, 81-96, viii.
- Oddy, W. H., Kendall, G. E., Blair, E., De Klerk, N. H., Stanley, F. J., Landau, L. I., ... & Zubrick, S. (2003). Breast feeding and cognitive development in childhood: a prospective birth cohort study. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 17(1), 81-90.
- Osendarp, S. J. (2011). The role of omega-3 fatty acids in child development. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(6), 307-313.
- Parletta, N., Cooper, P., Gent, D. N., Petkov, J., & O'Dea, K. (2013). Effects of fish oil supplementation on learning and behaviour of children from Australian Indigenous remote community schools: a randomised controlled trial. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 89, 71-79.
- Pascual-Marqui, R. D. (2002). Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.*, 24 Suppl D, 5-12.
- Patel, S. H. & Azzam, P. N. (2005). Characterization of N200 and P300: selected studies of the Event-Related Potential. *Int.J.Med.Sci.*, 2, 147-154.
- Pérez-Duenas, C., Acosta, A., & Lupiáñez, J. (2014). Reduced habituation to angry faces: increased attentional capture as to override inhibition of return. *Psychological research*, 78(2), 196-208.
- Petersen, S. E. & Posner, M. I. (2012). The attention system of the human brain: 20 years after. *Annu.Rev.Neurosci.*, 35, 73-89.
- Pfeiffer, C. M., Fazili, Z., McCoy, L., Zhang, M., & Gunter, E. W. (2004). Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clin.Chem.*, 50, 423-432.
- Posner, M. I. & Dehaene, S. (1994). Attentional networks. *Trends Neurosci.*, 17, 75-79.
- Posner, M. I., Early, T. S., Reiman, E., Pardo, P. J., & Dhawan, M. (1988). Asymmetries in hemispheric control of attention in schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry*, 45, 814-821.
- Posner, M. I. & Petersen, S. E. (1990). The attention system of the human brain. *Annu.Rev.Neurosci.*, 13, 25-42.

- Posner, M. I. & Rothbart, M. K. (2007). Research on attention networks as a model for the integration of psychological science. *Annu.Rev.Psychol.*, *58*, 1-23.
- Qawasmi, A., Landeros-Weisenberger, A., Leckman, J. F., & Bloch, M. H. (2012). Meta-analysis of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula and infant cognition. *Pediatrics*, *129*, 1141-1149.
- Rajkowski, J., Kubiak, P., & Aston-Jones, G. (1994). Locus coeruleus activity in monkey: phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res.Bull.*, *35*, 607-616.
- Rao, S., Joshi, S., Kale, A., Hegde, M., & Mahadik, S. (2006). Maternal folic acid supplementation to dams on marginal protein level alters brain fatty acid levels of their adult offspring. *Metabolism*, *55*, 628-634.
- Raz, A. & Buhle, J. (2006). Typologies of attentional networks. *Nat.Rev.Neurosci.*, *7*, 367-379.
- Reitan, R. M. (1979). Trail making test: TMT. Testzentrale.
- Reitan, R. M., & Herring, S. (1985). A short screening device for identification of cerebral dysfunction in children. *Journal of clinical psychology*, *41*(5), 643-650.
- Reitan, R. M. & Wolfson, D. (1992). Conventional intelligence measurements and neuropsychological concepts of adaptive abilities. *J.Clin.Psychol.*, *48*, 521-529.
- Richardson, A. J., Burton, J. R., Sewell, R. P., Spreckelsen, T. F., & Montgomery, P. (2012). Docosahexaenoic acid for reading, cognition and behavior in children aged 7-9 years: a randomized, controlled trial (the DOLAB Study). *PLoS.One.*, *7*, e43909.
- Riahi, F., Tashakori, A., & Vanani, G. S. (2018). Effects of Folic Acid on Appetite in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Treated with Methylphenidate: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Iranian journal of medical sciences*, *43*(1), 9.
- Roffman, J. L., Brohawn, D. G., Friedman, J. S., Dyckman, K. A., Thakkar, K. N., Agam, Y. et al. (2011a). MTHFR 677C>T effects on anterior cingulate structure and function during response monitoring in schizophrenia: a preliminary study. *Brain Imaging Behav.*, *5*, 65-75.
- Roffman, J. L., Nitenson, A. Z., Agam, Y., Isom, M., Friedman, J. S., Dyckman, K. A. et al. (2011b). A hypomethylating variant of MTHFR, 677C>T, blunts the neural response to errors in patients with schizophrenia and healthy individuals. *PLoS.One.*, *6*, e25253.
- Roffman, J. L., Gollub, R. L., Calhoun, V. D., Wassink, T. H., Weiss, A. P., Ho, B. C. et al. (2008). MTHFR 677C --> T genotype disrupts prefrontal function in schizophrenia through an interaction with COMT 158Val --> Met. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *105*, 17573-17578.
- Roza, S. J., van Batenburg-Eddes, T., Steegers, E. A., Jaddoe, V. W., Mackenbach, J. P., Hofman, A. et al. (2010). Maternal folic acid supplement use in early pregnancy and child behavioural problems: The Generation R Study. *Br.J.Nutr.*, *103*, 445-452.
- Rueda, M. R., Fan, J., McCandliss, B. D., Halparin, J. D., Gruber, D. B., Lercari, L. P. et al. (2004). Development of attentional networks in childhood. *Neuropsychologia*, *42*, 1029-1040.
- Ryan, A. & Nelson, E. B. (2008a). Assessing the effect of Docosahexaenoic Acid on Cognitive Functions in Healthy, Preschool Children: A Randomized, Placebo-Controlled, Double Blind Study. *Clinical Pediatrics*, *8*.
- Ryan, S. H., Williams, J. K., & Thomas, J. D. (2008b). Choline supplementation attenuates learning deficits associated with neonatal alcohol exposure in the rat: effects of varying the timing of choline administration. *Brain research*, *1237*, 91-100.
- Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav.Brain Funct.*, *6*, 24.
- Shaw, P., Kabani, N. J., Lerch, J. P., Eckstrand, K., Lenroot, R., Gogtay, N. et al. (2008). Neurodevelopmental trajectories of the human cerebral cortex. *J.Neurosci.*, *28*, 3586-3594.
- Schlutz, W., Jones, A., Phillips, D. I., Gale, C. R., Robinson, S. M., & Godfrey, K. M. (2010). Lower maternal folate status in early pregnancy is associated with childhood hyperactivity and peer problems in offspring. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *51*(5), 594-602.
- Sell Salazar, F. (2003). Epilepsia en la niñez. In *Epilepsia en la niñez*.
- Sinn, N., Bryan, J., & Wilson, C. (2008). Cognitive effects of polyunsaturated fatty

- acids in children with attention deficit hyperactivity disorder symptoms: a randomised controlled trial. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *78*, 311-326.
- Skórka, A., Gieruszczak-Bialek, D., Piescik, M., & Szajewska, H. (2017). Effects of prenatal and/or postnatal (maternal and/or child) folic acid supplementation on the mental performance of children. *Critical reviews in food science and nutrition*, *52*, 959-964.
- Smithers, L. G., Gibson, R. A., & Makrides, M. (2011). Maternal supplementation with docosahexaenoic acid during pregnancy does not affect early visual development in the infant: a randomized controlled trial. *Am.J.Clin.Nutr.*, *93*, 1293-1299.
- Stark, K. D., Beblo, S., Murthy, M., Buda-Abela, M., Janisse, J., Rockett, H. et al. (2005). Comparison of bloodstream fatty acid composition from African-American women at gestation, delivery, and postpartum. *J.Lipid Res.*, *46*, 516-525.
- Steenweg-de, G. J., Roza, S. J., Steegers, E. A., Hofman, A., Verhulst, F. C., Jaddoe, V. W. et al. (2012). Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Generation R Study. *Am.J.Clin.Nutr.*, *95*, 1413-1421.
- Steer, C. D., Lattka, E., Koletzko, B., Golding, J., & Hibbeln, J. R. (2013). Maternal fatty acids in pregnancy, FADS polymorphisms, and child intelligence quotient at 8 y of age-. *The American journal of clinical nutrition*, *98*(6), 1575-1582.
- Stein, A. D., Wang, M., Rivera, J. A., Martorell, R., & Ramakrishnan, U. (2012). Auditory and visual-evoked potentials in Mexican infants are not affected by maternal supplementation with 400 mg/d docosahexaenoic acid in the second half of pregnancy. *J.Nutr.*, *142*, 1577-1581.
- Stillwell, W., Shaikh, S. R., Zerouga, M., Siddiqui, R., & Wassall, S. R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod.Nutr.Dev.*, *45*, 559-579.
- Stuss, D. T., Benson, D. F., Kaplan, E. F., Weir, W. S., & Della, M. C. (1981). Leucotomized and nonleucotomized schizophrenics: comparison on tests of attention. *Biol.Psychiatry*, *16*, 1085-1100.
- Szajewska, H., Horvath, A., & Koletzko, B. (2006). Effect of n- 3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, *83*(6), 1337-1344.
- Tang, A. C., Liu, J. Y., & Sutherland, M. T. (2005). Recovery of correlated neuronal sources from EEG: the good and bad ways of using SOBI. *Neuroimage.*, *28*, 507-519.
- Tofail, F., Kabir, I., Hamadani, J. D., Chowdhury, F., Yesmin, S., Mehreen, F. et al. (2006). Supplementation of fish-oil and soy-oil during pregnancy and psychomotor development of infants. *J.Health Popul.Nutr.*, *24*, 48-56.
- Trabetti, E. (2008). Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *Journal of applied genetics*, *49*(3), 267-282.
- Treisman, A., Squire, R., & Green, J. (1974). Semantic processing in dichotic listening? A replication. *Mem.Cognit.*, *2*, 641-646.
- Treisman, A. M. & Gelade, G. (1980). A feature-integration theory of attention. *Cogn Psychol.*, *12*, 97-136.
- Umhau, J. C., Dauphinais, K. M., Patel, S. H., Nahrwold, D. A., Hibbeln, J. R., Rawlings, R. R. et al. (2006). The relationship between folate and docosahexaenoic acid in men. *Eur.J.Clin.Nutr.*, *60*, 352-357.
- Usher, M., Cohen, J. D., Servan-Schreiber, D., Rajkowski, J., & Aston-Jones, G. (1999). The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science*, *283*, 549-554.
- Vaisman, N., Kaysar, N., Zaruk-Adasha, Y., Pelled, D., Brichon, G., Zwingelstein, G. et al. (2008). Correlation between changes in blood fatty acid composition and visual sustained attention performance in children with inattention: effect of dietary n-3 fatty acids containing phospholipids. *Am.J.Clin.Nutr.*, *87*, 1170-1180.
- van der Merwe, L. F., Moore, S. E., Fulford, A. J., Halliday, K. E., Drammeh, S., Young, S. et al. (2013). Long-chain PUFA supplementation in rural African infants: a randomized controlled trial of effects on gut integrity, growth, and cognitive development. *Am.J.Clin.Nutr.*, *97*, 45-57.
- van Goor, S. A., Dijck-Brouwer, D. A., Erwich, J. J., Schaafsma, A., & Hadders-Algra, M. (2011). The influence of supplemental docosahexaenoic and arachidonic acids during pregnancy and lactation on neurodevelopment at eighteen months. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *84*, 139-146.
- van Meel, C. S., Heslenfeld, D. J., Rommelse, N. N., Oosterlaan, J., & Sergeant, J. A.

- (2012). Developmental trajectories of neural mechanisms supporting conflict and error processing in middle childhood. *Dev. Neuropsychol.*, *37*, 358-378.
- Veena, S. R., Krishnaveni, G. V., Srinivasan, K., Wills, A. K., Muthayya, S., Kurpad, A. V. et al. (2010a). Higher maternal plasma folate but not vitamin B-12 concentrations during pregnancy are associated with better cognitive function scores in 9- to 10-year-old children in South India. *J.Nutr.*, *140*, 1014-1022.
- Virk, J., Liew, Z., Olsen, J., Nohr, E. A., Catov, J. M., & Ritz, B. (2018). Pre-conceptual and prenatal supplementary folic acid and multivitamin intake, behavioral problems, and hyperkinetic disorders: A study based on the Danish National Birth Cohort (DNBC). *Nutritional neuroscience*, *21*(5), 352-360.
- Voigt, R. G., Llorente, A. M., Jensen, C. L., Farley, J. K., Berreta, M. C., & Heird, W. C. (2001). A randomized, double blind, placebo controlled trial of docosahexaenoic acid supplementation in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *The Journal of Pediatrics*, *139*, 189-196.
- Vossel, S., Geng, J. J., & Fink, G. R. (2014). Dorsal and ventral attention systems: distinct neural circuits but collaborative roles. *The Neuroscientist*, *20*(2), 150-159.
- Werkman, S. H. & Carlson, S. E. (1996). A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until nine months. *Lipids*, *31*, 91-97.
- Westerberg, A. C., Henriksen, C., Ellingvag, A., Veierod, M. B., Juliusson, P. B., Nakstad, B. et al. (2010). First year growth among very low birth weight infants. *Acta Paediatr.*, *99*, 556-562.
- Westerberg, A. C., Schei, R., Henriksen, C., Smith, L., Veierod, M. B., Drevon, C. A. et al. (2011). Attention among very low birth weight infants following early supplementation with docosahexaenoic and arachidonic acid. *Acta Paediatr.*, *100*, 47-52.
- Widenhorn-Müller, K., Schwanda, S., Scholz, E., Spitzer, M., & Bode, H. (2014). Effect of supplementation with long-chain ?-3 polyunsaturated fatty acids on behavior and cognition in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A randomized placebo-controlled intervention trial. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA)*, *9*, 49-60.
- Willatts, P., Forsyth, S., Agostoni, C., Casaer, P., Riva, E., & Boehm, G. (2013). Effects of long-chain PUFA supplementation in infant formula on cognitive function in later childhood. *Am.J.Clin.Nutr.*, *98*, 536S-542S.
- Willette, A. A., Gallagher, C., Bendlin, B. B., McLaren, D. G., Kastman, E. K., Canu, E. et al. (2012). Homocysteine, neural atrophy, and the effect of caloric restriction in rhesus monkeys. *Neurobiol.Aging*, *33*, 670-680.
- Williams, J., Rickert, V., Hogan, J., Zolten, A. J., Satz, P., D'Elia, L. F., ... & Light, R. (1995). Children's color trails. *Archives of Clinical Neuropsychology*, *10*(3), 211-223.
- Windelberg, A., Arseth, O., Kvalheim, G., & Ueland, P. M. (2005). Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin.Chem.*, *51*, 2103-2109.
- Wright, B. C., & Wanley, A. (2003). Adults' versus children's performance on the Stroop task: Interference and facilitation. *British Journal of Psychology*, *94*(4), 475-485.
- Yi, S. H., Kable, J. A., Evatt, M. L., & Singh, R. H. (2011). A randomized, placebo-controlled, double-blind trial of supplemental docosahexaenoic acid on cognitive processing speed and executive function in females of reproductive age with phenylketonuria: A pilot study. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, *85*, 317-327.



Anexos

Anexo

Publicaciones científicas

- Catena, A., Muñoz-Machicao, J. A., Torres-Espínola, F. J., Martínez-Zaldívar, C., Diaz-Piedra, C., Gil, A., ... & Koletzko, B. (2016). Folate and long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation during pregnancy has long-term effects on the attention system of 8.5-y-old offspring: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(1), 115-127.
- Muñoz-Machicao, A., Alcántara, M. F., Correa-Delgado, C., Ramirez, A. R. G., García, M. P., & Rubio, C. L. (2019). Visual Memory Test based on Snodgrass Pictures (VMT-SP): a New Neuropsychological Measure of Visual Memory on Children with Learning Disabilities. *Universitas Psychologica*, 18(2), 1-15.
- Fernández-Alcántara, M., Correa-Delgado, C., Muñoz, Á., Salvatierra, M. T., Fuentes-Hélices, T., & Laynez-Rubio, C. (2017). Parenting a child with a learning disability: A qualitative approach. *International Journal of Disability, Development and Education*, 64(5), 526-543.
- Muñoz Machicao, J. A., & Sánchez Pinto, M. (2006). Estructura de la familia de origen del trastorno límite de la personalidad. *Ajayu Órgano de Difusión Científica del Departamento de Psicología UCBSP*, 4(1), 59-89.

Comunicaciones en Congresos

XXII Congreso de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Murcia – Spain, 21-23 May 2015

Cerdó T, Ruiz-Rodríguez A, Herrmann F, Muñoz-Machicao A, Nieto A, Rivero M, Moreras M, Pérez-García M, Suarez A, Campoy C. *Relación de la microbiota intestinal y neurodesarrollo en lactantes sanos alimentados artificialmente.* **Participation:** [Oral presentation](#)

63º Congreso de la Asociación Española de Pediatría. Bilbao, Spain - 11-13 Junio 2015

Herrmann F, Muñoz-Machicao A, Nieto A, Arias M, Parejo E, Rivero M, Morera M, Pérez-García M, Campoy C. *Evolución del perímetro cefálico en lactantes sanos durante los primeros 18 meses de vida según el tipo de alimentación.* Participation: [Oral presentation](#)

Publication: *Anales de Pediatría (suppl.)* 2015

63º Congreso de la Asociación Española de Pediatría. Bilbao, Spain - 11-13 Junio 2015

Salas I, Muñoz-Machicao A, Rivero M, Morera M, Campoy C, López-Sabater MC. *Influencia de la alimentación en el contenido de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga de la mucosa bucal de lactantes.* Participation: [Oral presentation.](#) **Publication:** *Anales de Pediatría (suppl.)* 2015

The Power of Programming 2014, International Conference on Developmental Origins of Adiposity and Long-Term Health. München – Germany, 13-15 May 2014

Muñoz-Machicao A., Torres –Espínola F.J., Martínez-Zaldívar C., Anjos T., Haile G., Pérez-García M., Decsi T., Koletzko B., Catena A., Campoy C. *Long-term effects of prenatal supplementation with 5-methyl-tetrahydrofolate on offspring's attention system at 8 years.*

2nd International Conference on Nutrition and Growth 2014. Barcelona, Febrero 2014

M.C. Baltazar, F.J. Torres-Espínola, A. Muñoz-Machicao, C. Martínez-Zaldívar, J.D. Luna, F. Cruz, M.F. Olea, N. Olena, M. Pérez-García, C. Campoy. *Prenatal Exposure to Organochlorine Pesticides and Children's Development*. Participation: Oral Presentation

IV Jornadas del Instituto de Neurociencias "Federico Oloriz". 14 de Marzo de 2012

Torres Espínola FJ, Martínez-Zaldívar MC, Muñoz-Machicao A, Brandi P, Cruz F, Décsi T, Koletzko B, Pérez-García M, Campoy C. *Efectos de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados y/o ácido fólico en mujeres embarazadas sobre la velocidad de procesamiento en sus hijos a los 7.5 años*. Participation: Oral Presentation

III JORNADAS DEL INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS "FEDERICO OLÓRIZ" 18 de Marzo de 2010 - Parque de las Ciencias – Granada

Torres-Espínola FJ, García-Valdés L, Segura MT, Jerez A, Muñoz-Machicao A, Piqueras MJ, Anjos T, López-Robles JC, Martínez-Zaldívar MC, Pascual H, Aguilar MJ, Campoy C. *The role of micronutrients in children's neurodevelopment from obese and diabetic mothers*. Participation: Presentación oral.

11th EUROPEAN NUTRITION CONFERENCE. 26-29 October 2011 – Madrid

Torres-Espínola FJ, Correa C, Machicao A, Anjos T, Martínez-Zaldívar MC, Cruz F, Pérez-García M, Haile G, Csáby G, Decsi T, Koletzko B & Campoy C.

Long-term effects of prenatal dha and/or folate supplementation on attention and impulsivity at 7.5 years. Participation: Poster

Autores: J. Angela Muñoz Machicao, Francisco Jose Torres Espínola, Cristina Martínez Zaldívar, Tania Anjos, Haile Gudrum, Miguel Pérez García, Tamas Decsi, Andres Catena, Berthold Koletzko, Cristina Campoy .

Título: Long term effects of prenatal supplementation with 5 methyl tetrahydrofolate on the offspring's sustained attention at 8 years

Tipo de participación: Poster

Congreso: Congress of Paediatric Gastroenterology and Nutrition Jerusalén.

Publicación: 2014

Autores: J. Angela Muñoz Machicao, Cayetana Correa Delgado, Carolina Laynez Rubio, María Teresa Salvatierra, Concepción Robles Vizcaíno.

Título: La atención en niños con problemas de aprendizaje

Tipo de participación: Póster

Congreso: Congreso de Neuropedíatria Granada

Publicación: 2011

Autores: J. Angela Muñoz Machicao, Cayetana Correa Delgado, Carolina Laynez Rubio, María Teresa Salvatierra, Concepción Robles Vizcaíno.

Título: WISCIV vs K-BIT: Correlación de la fiabilidad de las pruebas de razonamiento abstracto

Tipo de participación: comunicación Oral

Congreso: Congreso de Neuropedíatria Granada

Publicación: 2011

Autores: Angela Muñoz, Cayetana Correa, Francisco Cruz, Carolina Laynez, Miguel Pérez.

Título: "Alteraciones de memoria, atencionales y de comprensión en niños con problemas de aprendizaje"

Tipo de participación: Póster

Congreso: Congreso de Neuropsicología

Publicación: 2009



See corresponding editorial on page I.

Folate and long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation during pregnancy has long-term effects on the attention system of 8.5-y-old offspring: a randomized controlled trial^{1–3}

Andrés Catena,⁴ J Angela Muñoz-Machicao,⁵ Francisco J Torres-Espínola,⁵ Cristina Martínez-Zaldívar,⁵ Carolina Díaz-Piedra,³ Angel Gil,⁶ Gudrun Haile,⁸ Eszter Györei,⁹ Anne M Molloy,¹⁰ Tamás Decsi,⁹ Berthold Koletzko,⁸ and Cristina Campoy^{5,7*}

⁴Mind, Brain, and Behavior Research Center–CIMCYC, ⁵EURISTIKOS Excellence Center for Pediatric Research, and Departments of ⁶Biochemistry and Molecular Biology and ⁷Pediatrics, University of Granada, Granada, Spain; ⁸Dr. von Hauner Children's Hospital, Ludwig-Maximilians University of Munich Medical Center, Munich, Germany; ⁹Department of Pediatrics, University of Pécs, Pécs, Hungary; and ¹⁰School of Clinical Medicine, Trinity College, Dublin, Ireland

ABSTRACT

Background: During fetal and perinatal periods, many nutrients, such as long-chain polyunsaturated fatty acids [contained in fish oil (FO)] and folate, are important in achieving normal brain development. Several studies have shown the benefits of early nutrition on children's neurocognitive development. However, the evidence with regard to the attention system is scarce.

Objectives: The aim of this study was to analyze the long-term effects of FO, 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), or FO+5-MTHF prenatal supplementation on attention networks.

Design: Participants were 136 children born to mothers from the NUHEAL (Nutraceuticals for a Healthy Life) project (randomly assigned to receive FO and/or 5-MTHF or placebo prenatal supplementation) who were recalled for a new examination 8.5 y later. The response conflict-resolution ability (using congruent and incongruent conditions), alerting, and spatial orienting of attention were evaluated with behavioral measures (Attention Network Test), electroencephalography/event-related potentials (ERPs), and standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA).

Results: Children born to mothers supplemented with 5-MTHF alone solved the response conflict more quickly than did the placebo and the FO+5-MTHF groups (all $P < 0.05$). Differences between ERP amplitudes for the conflict conditions were also observed. sLORETA analysis showed higher activation of the right midcingulate cortex for the incongruent condition. In addition, a significant slowing down of response speed depending on the warning cue in the 5-MTHF and FO groups was observed.

Conclusions: Folate supplementation during pregnancy, rather than FO or FO+5-MTHF supplementation, improves children's ability to solve response conflicts. This advantage seems to be based on the higher activation of the midcingulate cortex, indicating that early nutrition influences the functionality of specific brain areas involved in executive functions. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01180933. *Am J Clin Nutr* 2016;103:115–27.

Keywords: attention, child development, evoked potentials, polyunsaturated fatty acids, folate, prenatal nutrition

INTRODUCTION

The effect of prenatal nutrition on later brain and cognitive development is receiving increasing attention (1). During fetal and neonatal periods, all nutrients are important for achieving normal development—in particular, B-group vitamins (2), long-chain PUFAs (LC-PUFAs)¹¹ (3), and folate (4). There is a wealth of data that indicates that insufficient maternal nutrition leads to impairments in brain development, encompassing cell proliferation and maturation, and a decrease in growth factors, which may have long-term effects on cerebral structure and function (5).

LC-PUFAs, especially docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n–3) and arachidonic acid (AA; 20:4n–6), have several influences on brain development (6–8). They seem to affect membrane structure

¹Supported in part by the Commission of the European Research and Technological Development Programme “Quality of Life and Management of Living Resources” within the 5th Framework Programme [contract QLK1-CT-1999-00888 (NUHEAL “Nutraceuticals for a Healthier Life”)] and the European Community's 7th Framework Programme (FP7/2008–2013) under grant agreement 212652 (NUTRIMENTHE Project “The Effect of Diet on the Mental Performance of Children”). Research by AC is funded by a Spanish Ministry of Economy and Competitiveness grant (State Secretariat for Research, Development, and Innovation; PSI2012-39292). BK is supported by the European Research Council advanced grant ERC-2012-AdG (no.322605 META-GROWTH).

²This publication is the work of the authors and does not necessarily reflect the views of the Commission of the European Community.

³Supplemental Tables 1 and 2 are available from the “Online Supporting Material” link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://ajcn.nutrition.org>.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: ccampoy@ugr.es.

¹¹Abbreviations used: AA, arachidonic acid; ERP, event-related potential; FO, fish oil; LC-PUFA, long-chain PUFA; MNI, Montreal Neurological Institute; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; NUHEAL, Nutraceuticals for a Healthy Life; RCT, randomized controlled trial; sLORETA, standardized low-resolution brain electromagnetic tomography; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

Received February 12, 2015. Accepted for publication September 29, 2015.

First published online November 11, 2015; doi: 10.3945/ajcn.115.109108.

and function of neuron cell membranes, speed of signal transmission (9), gene expression, ion channel regulation (10), and neurogenesis (11). Some randomized controlled trials (RCTs) that specifically addressed n-3 LC-PUFA supplementation during pregnancy and/or lactation persistently showed a direct dose-response relation between DHA intake and mothers' DHA concentrations in plasma or erythrocyte phospholipids and brain development but have not consistently shown benefits on developmental outcomes in children (6, 12–17).

The published research about the potential positive effects of LC-PUFAs on the attention system is scarce. It has been reported that DHA supplementation in children is associated with an increase in dorsolateral prefrontal cortex activation (18). Children's looking behavior and distractibility are related to maternal concentrations of DHA at delivery (19), and fish consumption during pregnancy has been shown to have a protective effect against attention-deficit/hyperactivity disorder (20). However, there is no clear evidence that shows a positive effect of DHA supplementation during pregnancy on the offspring's attention system (17).

Folate also plays a crucial role in the prevention of neural tube defects (21) and in neurogenesis, apoptosis, and the normal development of the nervous system (22, 23). Low folic acid intake is known to contribute to increased concentrations of plasma homocysteine, which are related to poor pregnancy outcomes (24) and to variations in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene (25). Low maternal folate concentrations during pregnancy are associated with behavioral problems during childhood (26), an increased risk of attention deficits, reduced problem-solving ability (27), and lower cognitive function, such as with reasoning or verbal fluency (28, 29). However, the use of multivitamin-containing folic acid supplementation during pregnancy is not associated with any benefit to mental performance in children (30).

The attention system represents a complex interaction of neural systems. Different authors (31, 32) have summarized the well-known attention network theory, which separates the attention system into 3 segregated networks: conflict (executive control), alerting, and orienting. The conflict network involves mechanisms for monitoring behavior and for resolving conflict among stimuli, thoughts, feelings, and responses. This network includes the basal ganglia, cingulate cortex, and the dorsolateral prefrontal cortex (33–35). Simultaneous electroencephalography and fMRI recordings indicate that the activity of midfrontal and temporoparietal areas (36) underlies the processes involved in response conflict resolution (37). Therefore, electroencephalography has been considered to be a valuable method for the assessment of the brain's functions that are linked to nutrition and higher cognitive functions (38–40). "Alerting" involves arousal and vigilance; it is related to achieving and maintaining a state of being very sensitive to incoming stimuli combined with a readiness to react. The cerebral areas implicated in alerting tasks are the locus coeruleus, the parietal lobe, and the right frontal cortex (41). Attentional "orienting" is associated with the processes of selecting information from sensory input and shifting attention between stimuli. The frontal eye fields, the superior colliculus, the temporal parietal junction, the superior parietal cortex, and the thalamus are considered their major nodes (42).

The methodologic procedures to explore the attention system related to the effects of early supplementation are under

discussion; most of the research used classical attention tests that do not provide a whole picture of the attention system state. Moreover, when the attention system has been the main target of research, only a subset of the attentive functions has been explored. In fact, no single study has simultaneously examined the 3 major attention networks (conflict resolution, orienting, and alerting), and no one used techniques designed to explore the specific critical window when early nutrition can affect the sophisticated brain events that mediate stimulus and response.

The present research aimed at determining the potential effect of LC-PUFA [contained in fish oil (FO)], folate [5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF)], placebo or FO+5-MTHF supplements during pregnancy on the long-term development of the human attentional system in the offspring up to 8.5 y by using behavioral and event-related potential (ERP) measures. Thus, our research attempts to uncover the effects of maternal early supplementation on the executive, alerting, and orienting functions of the attention system by using behavioral and electrophysiologic recordings while the children performed the Attention Network Test.

METHODS

Study design

This is a follow-up study of the NUHEAL (Nutraceuticals for a Healthy Life) cohort, a multicenter, randomized, double-blind, 2 × 2 factorial placebo-controlled trial aimed at determining the long-term effects of LC-PUFAs and folate supplementation during the second half of pregnancy on several health and development outcomes in the offspring. A total of 312 pregnant women attending antenatal care clinics were recruited before the 20th week of pregnancy in 3 European centers (Germany, Spain, and Hungary); 270 women were followed up until they gave birth. Inclusion criteria were as follows: healthy, pregnant women, aged 18–40 y, with uncomplicated singleton pregnancies and a body weight between 50 and 92 kg at study entry. The women were not supplemented with FO from the beginning of their pregnancy or folate and/or vitamin B-12 supplements after the 16th week of gestation.

Details of the original sample in the NUHEAL study design have been reported elsewhere (43). In short, pregnant women were randomly assigned to 1 of 4 supplementation groups. From the 20th week of pregnancy until delivery, women were supplemented with 1 sachet of a milk-based supplement/d (Blemil Plus Matter; Ordesa Laboratories S.L.) containing 1 of 4 formulas: 1) modified FO, providing 500 mg DHA + 150 mg EPA (Pronova Biocare); 2) 400 µg 5-MTHF (BASF); 3) FO+5-MTHF; or 4) placebo together with vitamins and minerals meeting the European recommendations for pregnant women in the second half of pregnancy. Detailed instructions were given on the label of each sachet, and sufficient supplement was provided at each visit to last until the next one or, in the last visit until delivery. Subjects were instructed to return leftover sachets to the study center. Compliance was assessed in standardized questionnaires at gestation week 30 and at delivery by asking each subject how many days of dosing she had missed (e.g., <6, <5, or none); mothers returned the sachets that were not consumed.

After delivery, women were encouraged to breastfeed their infants. Infants who required formula feeding because their mother did not (fully) breastfeed were provided with 2 different infant formulas; both of the formulas met the European

legislative standards and were identical in all components with the exception of fatty acid composition. If the newborns were born to FO-supplemented women, they received an infant formula containing 0.5% of total fatty acids as DHA and 0.4% as AA, whereas children born to mothers in the placebo or 5-MTHF groups received a formula virtually free of DHA and AA during the first 6 mo of postnatal life.

Participants

Parents of the NUHEAL children were later reapproached and asked to participate in a new neurologic assessment when their child was 8.5 y. Several children were not included in the follow-up study for the following reasons: 4 children were born prematurely before the 35th week of pregnancy, 1 child was born with a congenital left-side anophthalmus, 1 child developed craniosynostosis, and another was reported to have left-side deafness. One hundred thirty-six children (23.5%, $n = 32$, from Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany; 70.6%, $n = 96$, from the University of Granada, Spain; and 5.9%, $n = 8$, from the University of Pécs, Hungary) accepted to participate in this follow-up assessment.

At 8.5 y we did not observe differences in the drop-out rates between intervention groups ($P = 0.82$). The main reasons for dropping out were relocation ($n = 7$), loss of contact ($n = 75$), and unwillingness to continue ($n = 45$). A total of 136 children were therefore included in the present study at 8.5 y. No differences were observed in sociodemographic variables (all $P > 0.20$) (Table 1). Parents of the participants reported similar family status, which included mother's and father's jobs, employment, career, cultural, and academic levels. In addition, the distribution of the *MTHFR C677T* polymorphisms was also similar between groups.

Data collection

Sociodemographic, clinical, and anthropometric data from mothers and their offspring were previously collected at the beginning of the study as well as for the children at the present evaluation time. Maternal blood samples were obtained by venipuncture at week 20 and 30 of pregnancy, at delivery, and from the umbilical cord.

Behavioral attentional scores were obtained from the child version of the Attention Network Test. Electroencephalography data were collected while participants performed the attention task. In the present report, primary outcome measures included behavioral scores (attention efficiency scores and errors) and ERP data collected during the performance of the Attention Network Test. Source localization analysis and neuroimaging were also performed.

The study protocol was approved by the human research ethics committees of all centers participating in the study. Written informed consent was obtained from all participants at study entry and at follow-up. The NUHEAL project is registered at www.clinicaltrials.gov (NCT01180933).

Biochemical data analysis

For the assessment of fatty acids in plasma phospholipids [AA, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), DHA, AA:DHA ratio, n-6 PUFAs, n-3 PUFAs, n-6:n-3 ratio, PUFAs >n-3, PUFAs >n-6], folate status (plasma and whole-blood folate), and homo-

cysteine, 10 mL maternal venous blood was collected into EDTA tubes at study entry (week 20) and again at gestation week 30. At delivery, 12 mL maternal blood was collected into EDTA tubes in addition to 12 mL venous placental cord blood.

After blood centrifugation ($3500 \times g$ for 10 min at room temperature within 2 h), plasma was obtained and stored at -80°C until analysis. Lipid extraction followed the Kolarovic and Fournier method (44). Liquid chromatography with aminopropyl columns (Sep Pak cartridges; Water) were used for phospholipid isolation (45). The isolated phospholipids were trans-esterified by treatment with methanolic hydrochloric acid (46). Results are expressed as percentages by weight (wt%) of total detected fatty acids.

A microbiologic assay with the use of a chloramphenicol-resistant strain of *Lactobacillus casei* was performed for folate analysis as described previously (47). Intra- and interassay CVs were <11%. Results are expressed in micrograms per liter. The analysis of whole-blood folate was obtained by using a method adapted from the CDC ID-LC-MS/MS method (48, 49). Results are expressed in nanomoles per liter. Total homocysteine analysis was performed by using the isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method (50). Results are expressed in micromoles per liter. The full procedure of fatty acids and folate analysis can be found in Campoy et al. (13).

Genetic analysis: *MTHFR C677T* polymorphism

Genomic DNA was prepared from blood samples from mothers and their offspring (umbilical cord) obtained at delivery. The methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C > T polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction amplification, restriction enzyme digestion, and DNA fragment separation by electrophoresis. Allelic frequencies and genotype distributions were established in the mothers and their offspring (51).

The Attention Network Test

Electroencephalography, reaction times, and response accuracy were collected while participants performed the child version (52) of the Attention Network Test (53). The test was designed to evaluate the 3 attention networks: executive, alerting, and orienting. In short, a target horizontal array of either 5 fish (a central target flanked on each side by 2 distractors) or a single fish was displayed above or below a central fixation cross. The target was preceded by 1 of 4 warning cues: a single central asterisk; a double asterisk above and below the fixation point; no asterisk; or a single spatial asterisk located at the same position as the incoming target. The child participant had to click a computer mouse indicating whether the central target fish pointed to the left or to the right. After the target display, auditory and visual performance feedback was provided. After a practice block of 24 trials, each participant performed 3 blocks of 48 trials each. Each block consisted of 16 trials for each flanker-target condition: incongruent (the central target fish pointed to the side opposite to the flanker fish), congruent (all of the fish pointed to the same side), and neutral (single fish). In each block there were 12 trials for each warning cue condition. Warning cue and flanker conditions were crossed in a factorial array, so that for each block there were 4 trials for each cue-flanker experimental condition.

TABLE 1
Baseline characteristics of the 130 children at the age of 8.5 y and of their mothers during pregnancy in the 4 supplemented groups¹

	FO (n = 37)	5-MTHF (n = 27)	Placebo (n = 32)	FO+5-MTHF (n = 34)	P
Center, n (%)					0.81
Spain	25 (67.57)	20 (70.07)	24 (75)	22 (64.71)	
Germany	9 (24.32)	7 (29.93)	6 (18.75)	10 (29.41)	
Hungary	3 (8.11)	0 (0)	2 (6.25)	2 (5.88)	
Age at EEG, y	8.49 ± 0.18 ²	8.51 ± 0.18	8.55 ± 0.17	8.56 ± 0.20	0.38
BMI at 8.5 y, kg/m ²	17.43 ± 3.05	16.65 ± 2.17	18.16 ± 2.61	17.59 ± 2.85	0.22
Maternal					
Age, y	31.09 ± 4.86	32.65 ± 5.50	32.34 ± 4.23	31.25 ± 4.53	0.47
BMI (20 wk), kg/m ²	24.62 ± 3.27	25.32 ± 3.19	24.60 ± 3.02	25.06 ± 2.52	0.74
BMI (30 wk), kg/m ²	26.17 ± 5.85	27.34 ± 3.31	26.01 ± 5.66	26.37 ± 5.30	0.77
Hematocrit (30 wk), %	34.71 ± 3.88	33.01 ± 5.10	33.73 ± 2.55	34.29 ± 3.03	0.31
Parity, n (%)					0.64
0	21 (56.76)	12 (44.44)	14 (43.75)	15 (44.12)	
≥1	16 (43.24)	15 (55.56)	18 (56.25)	19 (55.88)	
Smoking (20 wk), n (%)	6 (16.22)	3 (11.11)	2 (6.25)	5 (14.71)	0.62
Gravidity risk at 20 wk, n (%)					0.85
No risk factors	1 (2.70)	0 (0)	1 (3.13)	0 (0)	
≥1 risk factor	36 (97.30)	27 (100)	31 (93.87)	34 (100)	
Delivery risk, n (%)					0.25
No risk factors	12 (37.5)	13 (50)	19 (63.33)	16 (51.61)	
≥1 risk factor	20 (62.5)	13 (50)	11 (33.33)	15 (48.39)	
Gestational age, wk	39.08 ± 2.24	39.90 ± 4.26	39.64 ± 1.71	38.82 ± 2.24	0.37
Sex, n (%)					0.36
Female	15 (40.54)	14 (51.85)	14 (43.75)	20 (58.82)	
Male	22 (59.46)	13 (48.15)	18 (56.25)	14 (41.18)	
Perinatal morbidity, n (%)					0.61
None	26 (81.25)	23 (88.46)	25 (83.33)	26 (83.87)	
Preterm (>35 wk)	4 (12.50)	3 (11.54)	1 (3.33)	4 (12.90)	
Others	2 (6.25)	0 (0)	4 (13.33)	1 (3.23)	
Apgar score					
At 1 min	8.57 ± 1.26	9.08 ± 0.63	8.72 ± 0.92	8.33 ± 1.96	0.90
At 5 min	9.68 ± 0.67	9.77 ± 0.65	9.77 ± 0.43	9.55 ± 1.09	0.80
Birth weight, g	3228.11 ± 560.48	3358.08 ± 411.65	3370.09 ± 410.23	3157.58 ± 437.09	0.20
Birth length, cm	50.57 ± 3.45	51.46 ± 2.08	51.23 ± 2.06	50.97 ± 2.90	0.60
Birth head circumference, cm	34.39 ± 2.01	34.76 ± 1.52	34.77 ± 1.39	34.59 ± 1.60	0.76
Infant feeding, n (%)					0.78
Breastfed	14 (46.67)	10 (38.46)	13 (52)	16 (59.26)	
Mixed	9 (30)	7 (26.92)	5 (20)	5 (18.52)	
Formula	7 (23.33)	9 (34.62)	7 (28)	6 (22.22)	
Residence area, n (%)					0.62
Urban	15 (40.54)	13 (48.15)	10 (31.25)	14 (41.18)	
Rural	22 (59.46)	14 (51.85)	22 (68.75)	20 (58.82)	
Education, ³ n (%)					
Mother	17 (45.95)	11 (40.74)	12 (37.5)	16 (48.48)	0.66
Father	20 (54.05)	10 (37.04)	11 (34.38)	10 (30.30)	0.40

¹For qualitative variables, a chi-square test was used; for quantitative variables, 1-factor ANOVA was performed. *P* values indicate between-group differences unless otherwise indicated. EEG, electroencephalogram; FO, fish oil; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

²Mean ± SD (all such values).

³Attained general qualification level for university entrance or university degree. *P* values refer to the interaction or between-group effects.

The angle of the target array subtended $\sim 8.84^\circ$ (1.6° each fish, with a gap of 0.2°) and was displayed 1° above or below the fixation cross, until the participant response or up to a maximum of 1700 ms. The warning cue (0.3°) was displayed for 80 ms and started 400 ms before the target onset. The complete task takes ~ 25 min. Participants were asked to maintain their fixation on the cross in the center of the screen throughout the task, to pay

attention to the central fish, and to respond as quickly and accurately as possible. Efficiency scores were computed both for reaction times and error percentages for each participant, subtracting congruent from incongruent scores (hereafter, conflict score), subtracting central cue from spatial cue scores (hereafter, orienting score), and subtracting no cue from double cue scores (hereafter, alerting score).

Electroencephalography acquisition and analysis

The electroencephalography was conducted by using a 64-channel Active Two BioSemi EEG recording system (BioSemi; Amsterdam, Holland.) using a sampling rate of 1024 Hz and a 100-Hz low-pass filter. Details with regard to the online BioSemi reference method can be found at <http://www.biosemi.com/faq/cms&drl.htm>. The raw electroencephalographic data were 0.5- to 25-Hz band-pass filtered, down-sampled to 256 Hz, and re-referenced to average. After a visual inspection aimed at detecting bad channels (4.7% on average), spherical splines were used to correct them. Segments from -200 to +800 ms post-target were extracted. Epochs for correct trials with maximum amplitudes within the -100- to +100- μ V range were used to compute Second Order Blind Identification Independent Component Analysis (SOBI ICA) (54, 55) and then submitted to the ADJUST procedure (56) to automatically remove eye artifacts.

ERPs were obtained by averaging epochs for the 3 flanker conditions—congruent, incongruent, and neutral—and the 4 warning cue conditions: no cue, spatial, double cue, and center cue. The conflict network efficiency waveforms were computed by subtracting congruent from incongruent ERPs. Orienting network scores were obtained by subtracting the spatial condition from the double warning cue condition. The alerting network scores were obtained by subtracting the central cue and no cue conditions. ERP analysis was performed in a 3-step procedure. First, we used a mass-univariate approach (5000 random samples), a procedure that protects against the multiple-comparison problem (57), combined with classical ANOVA to uncover the potential effects of early supplementation on brain electrophysiologic indexes and to determine the time windows at which these effects appear.

Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA) (58) was used to estimate the brain areas that are potentially responsible for the observed scalp event-related potential effects. This software reports Montreal Neurological Institute (MNI) coordinates. sLORETA images represent the electrical activity at each voxel as the squared standardized magnitude of the estimated current density. We focused on the 200–550 ms post-target intervals because differences in amplitudes in this time window between congruent and incongruent conditions have been associated with brain attentive functions (59–64). sLORETA estimation of brain activities in the time interval of interest were also submitted to a mass-univariate *t* test (5000 random samples) to ascertain what brain areas can account for the observed ERP differences between groups. Note that mass-univariate analysis controls for the multiple-comparison problems by using the empirical distribution of the *t*-max statistic (57). Statistical analyses (ANOVA, *t* test, and linear correlations) of behavioral and biochemical data were conducted by using SPSS for Windows (version 17, 2008; SPSS Inc.).

RESULTS

In all of the statistical analyses reported here a significance threshold of $P < 0.05$ was used. We considered as suggestive when the significance of the tests was $0.10 > P > 0.05$. The multiple-comparison problem was controlled for by using Bonferroni methods (to set up the family-wise $P < 0.05$) or the *t*-max statistic (for the ERP and sLORETA data) with a family-wise *P* value of 0.05. The *t*-max is based on the empirical distribution

of the *t*-scores obtained in a set of comparisons after a number of random permutations (5000) are performed.

Behavioral results

Median reaction times (in ms) for correct responses and error percentages were obtained for each flanker and warning cue condition. The efficiency scores for each attention network were then computed by subtracting reaction times: congruent from incongruent trials (conflict score), double cue from no cue (alerting score), and spatial from central cue (orienting score). Six children who had <50% of correct responses on the incongruent condition were excluded from the analysis. The final numbers of children ($n = 130$) for each group were as follows: 37 (FO), 27 (5-MTHF), 32 (placebo), and 34 (FO+5-MTHF). Logarithmic transformation was used to improve normality fitting.

Conflict network

Log-transformed averages of median reaction times for correct responses (Table 2, Figure 1) were submitted to a 2 (FO, between-subjects) \times 2 (5-MTHF, between-subjects) \times 3 (within-subjects flanker condition: congruent, incongruent, neutral) repeated-measures ANCOVA (controlled for age in months, sex, family status, and laterality). The Greenhouse-Geisser correction was used to control the sphericity assumption.

We observed a significant effect of the interaction of flanker, FO, and 5-MTHF [$F(2,244) = 5.04, P < 0.01$]. Simple-effects analysis of this interaction showed that conflict scores were lower for the 5-MTHF than for the placebo and the FO+5-MTHF groups (all $P < 0.05$) but similar to those of the FO group ($P = 0.24$). There were no other significant differences (data not shown).

With regard to response error percentages (Table 3), the analysis showed only main effects of flank [$F(2,244) = 32.53, P < 0.01$]. No other effects were significant (all $F < 1$). After Bonferroni correction, error percentages were larger for the incongruent than for the congruent or neutral flankers ($P < 0.01$; data not shown) and for the neutral than for the congruent flanker ($P < 0.01$; data not shown).

Alerting and orienting networks

Log-transformed averages of median reaction times for correct responses (Table 2, Figure 2) were submitted to a 2 (FO, between-subjects) \times 2 (5-MTHF, between-subjects) \times 4 (within-subjects cue condition: spatial, center, double cue, no cue) repeated-measures ANCOVA (controlled for age in months, sex, family status, and laterality).

We observed significant main effects of cue [$F(3,378) = 77.12, P < 0.001$]. The interaction of FO and 5-MTHF [$F(1,122) = 4.91, P = 0.03$] as well as the interaction of FO, 5-MTHF, and cue condition [$F(3,366) = 2.99, P < 0.04$] were significant. Thus, alerting and orienting scores were submitted to 2 (FO) \times 2 (5-MTHF) ANCOVA (controlled for age in months, sex, family status, and laterality). Neither main nor interaction effects were observed for the orienting scores [all $F(1,122) < 1$]. However, the interaction of FO and 5-MTHF was significant for reaction-time alerting score [$F(1,122) = 5.28, P < 0.03$]. Simple-effects analysis of this interaction indicated that alerting scores for FO and 5-MTHF groups were lower than

TABLE 2
Average of median reaction times for each supplemented group, distractors, and warning cue conditions¹

	FO (n = 37)	5-MTHF (n = 27)	Placebo (n = 32)	FO+5-MTHF (n = 34)	P
Global speed, ms	854 ± 135	872 ± 98	818 ± 132	825 ± 111	0.07
Interference, ms	83 ± 67	60 ± 75	101 ± 63	96 ± 66	0.01
Congruent	830 ± 142	862 ± 125	793 ± 136	801 ± 111	
Incongruent	913 ± 130	923 ± 93	894 ± 139	897 ± 120	
Neutral	819 ± 145	831 ± 101	767 ± 132	778 ± 118	
Orienting, ms	47 ± 48	36 ± 69	41 ± 54	38 ± 70	0.95
Spatial	819 ± 135	847 ± 104	785 ± 130	795 ± 137	
Center	866 ± 147	883 ± 103	825 ± 121	832 ± 102	
Alertness, ms	43 ± 56	48 ± 77	74 ± 65	71 ± 55	0.03
Double	845 ± 140	861 ± 119	784 ± 134	792 ± 106	
No	888 ± 133	909 ± 109	857 ± 131	863 ± 111	

¹Values are the group average of the participant median reaction times ± SDs. Statistical analysis was performed by using ANCOVA with FO and 5-MTHF as between-subject factors and flankers or cues as within-subject factors. The covariates were age, sex, socioeconomic status, and laterality. *P* values indicate differences between groups for the executive (interference), alerting (alertness), and orienting scores. *P* values for global speed refer to between-group differences; the remaining *P* values refer to the interaction analysis. "Interference" indicates the difference between incongruent and congruent trials. "Orienting" indicates the differences between center and spatial cues. "Alertness" indicates the difference between no cue and double cue. FO, fish oil; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

for the FO+5-MTHF group (both $P < 0.04$). The same analysis for response errors (Table 3) yielded no significant effects [all $F(3,366) < 1$].

Electroencephalography results

Only 117 (FO, $n = 30$; 5-MTHF, $n = 23$; placebo, $n = 30$; FO+5-MTHF, $n = 34$) of 136 participants with at least 25 artifact-free epochs per flanker condition were used for the remaining analysis. The mass-univariate *t* test yielded significant differences for the comparison between 5-MTHF and placebo groups only for the conflict network ERP efficiency scores in the 270–290 ms post-target at 3 left-hemisphere channels: F5, F3, and FC5. These efficiency scores at this interval for these electrodes were then submitted to a 2 (FO, between-subjects) × 2 (5-MTHF, between-subjects) × 3 (channels: F5, F3, FC5) repeated-measures ANCOVA (controlled for age in months, sex, family status, and laterality).

We observed significant main effects of channel [$F(2,226) = 3.82$, $P < 0.03$]. The interaction between FO and 5-MTHF was also significant [$F(1,113) = 9.31$, $P < 0.01$]. The detailed analysis of this interaction indicated that the 5-MTHF group significantly outscored the placebo ($P = 0.002$) and FO+5-MTHF ($P < 0.02$) groups, and there was a trend toward significance with the FO group ($P = 0.06$) (Figure 3). The FO group did not significantly differ from the placebo ($P = 0.09$) or FO+5-MTHF ($P > 0.32$) groups. No differences were observed between placebo and FO+5-MTHF groups ($P > 0.59$). Importantly, these effects held even when AA:DHA and plasma folate were used as confounders.

sLORETA estimations of brain current densities at the time windows of interest (200–550 ms post-target onset) for each condition and group were also submitted to mass-univariate *t* test. Results yielded 2 clusters of voxels that discriminated between 5-MTHF and placebo groups, one in the right inferior parietal lobe (BA40, peak MNI coordinates: 55, -40, 40) at 313–329 ms post-target and another located in the right cingu-

late gyrus (BA24, peak at MNI coordinates: 5, -5, 50) at 395–423 ms post-target (Table 4, Figure 4A). Figure 4 also shows the time course of the BA24 cluster estimated activity for the incongruent (Figure 4B) and congruent (Figure 4C) conditions. A small posterior precuneus cluster (4 voxels, MNI coordinates: 15, -70, 25, BA31) discriminated between 5-MTHF and FO+5-MTHF at 403–419 ms post-target onset.

Biochemical results

Fatty acid, folate, and homocysteine results for the 4 collection times (20 and 30 wk of pregnancy, delivery, and umbilical cord) are shown in Supplemental Table 1. Mothers had the same

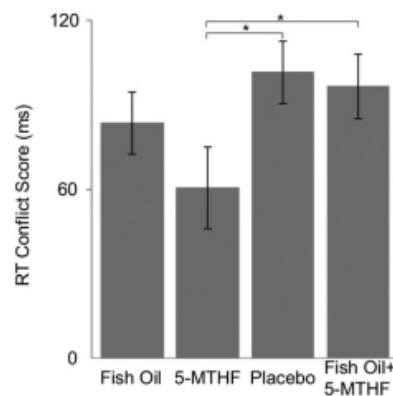


FIGURE 1 Reaction-time conflict scores for the children born to supplemented mothers. Scores are presented as a function of the 4 supplemented groups (fish oil, $n = 37$; 5-MTHF, $n = 27$; placebo, $n = 32$; 5-MTHF+fish oil, $n = 34$). Values are averages of medians ± SEMs. *Significant comparison based on ANOVA followed by Bonferroni-corrected *t* test. 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate; RT, reaction time.

EARLY NUTRITION AND OFFSPRING'S ATTENTION SYSTEM

121

TABLE 3
Error percentages according to supplemented groups, distractors, and warning cue conditions¹

	FO (n = 37)	5-MTHF (n = 27)	Placebo (n = 32)	FO+5-MTHF (n = 34)	P
Total errors	8.1 ± 5.8	8.0 ± 7.3	7.2 ± 6.2	6.9 ± 6.1	0.42
Interference	4.0 ± 5.3	4.8 ± 6.4	6.3 ± 10.8	5.8 ± 8.0	0.52
Congruent	6.5 ± 6.5	5.6 ± 6.2	4.5 ± 5.2	4.3 ± 5.1	
Incongruent	10.5 ± 8.2	10.4 ± 9.5	10.8 ± 12.3	10.1 ± 9.2	
Neutral	7.2 ± 4.8	8.2 ± 8.0	6.2 ± 5.6	6.3 ± 6.8	
Orienting	0.3 ± 6.0	-0.3 ± 7.3	-0.3 ± 5.7	-0.2 ± 5.0	0.81
Spatial	8.1 ± 6.6	8.7 ± 9.0	7.8 ± 5.7	6.8 ± 6.4	
Center	8.4 ± 6.7	8.4 ± 8.4	7.5 ± 8.4	6.6 ± 6.3	
Alertness	1.2 ± 6.9	1.2 ± 4.1	-0.1 ± 5.5	0.5 ± 6.1	0.32
Double	7.8 ± 7.7	7.4 ± 8.3	7.0 ± 6.7	7.3 ± 7.2	
No	9.0 ± 6.6	8.6 ± 6.4	6.9 ± 6.8	7.8 ± 7.6	

¹Values are group averages ± SDs. Statistical analysis was performed by using ANCOVA with FO and 5-MTHF as between-subject factors and flankers or cues as within-subject factors. The covariates were age, sex, socioeconomic status, and laterality. *P* values indicate differences between groups for the executive (interference), alerting (alertness), and orienting scores. *P* values for global speed refer to between-group differences; the remaining *P* values refer to the interaction analysis. "Interference" indicates the difference between incongruent and congruent trials. "Orienting" indicates the differences between center and spatial cues. "Alertness" indicates the difference between no cue and double cue. FO, fish oil; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

concentrations of fatty acids and homocysteine at study entry (week 20; all *P* > 0.05). However, there was an initially higher concentration of plasma folate for the FO-supplemented group (*P* = 0.03). FO-supplemented mothers showed increased concentrations of fatty acids at 30 wk of pregnancy and at delivery, especially n-3 fatty acids, in comparison with the 5-MTHF-supplemented and placebo groups from week 30 of pregnancy (all *P* < 0.05, except for AA, n-6:n-3 ratio, and PUFAs >n-6; *P* > 0.05). We did not observe increased concentrations in children's umbilical cords (*P* > 0.05). 5-MTHF-supplemented groups showed increased concentrations of whole-blood folate from week 30 of pregnancy, including the umbilical cord measure (all *P* < 0.05). Plasma folate was significantly higher for the supplemented groups only at delivery (*P* < 0.05) (Supplemental Table 2).

Associations between performance scores and biochemical values

Table 5 shows the significant linear correlations between biological measures of fatty acids, folate, and homocysteine with overall measures of children's processing speed and performance accuracy for the attentional networks of conflict (errors and ERP efficiency scores) and alerting (reaction time). Overall speed was negatively related to AA:DHA during pregnancy (20 and 30 wk). From umbilical cord measures, several fatty acids measures (i.e., AA, DHA, n-3 PUFAs, and PUFAs >n-3) were also positively related to overall speed. In addition, n-6:n-3 during pregnancy (20 and 30 wk) and delivery was also positively related to overall speed. Total homocysteine at study entry and delivery was also positively related to this performance measure.

We observe significant associations of biochemical measures with reaction-time conflict scores. With regard to errors, at delivery fatty acid measures were negatively (EPA) and positively (AA:DHA and n-6 PUFAs) associated with the response errors measure of conflict solution. The ERP conflict score was positively associated with a fatty acid measure (AA:DHA) at week 20, at delivery, and in the umbilical cord and with umbilical cord

plasma folate. In addition, umbilical cord plasma folate was significantly associated with the averaged conflict scores for BA24 cluster (*r* = 0.25, *P* < 0.01) at the time window of interest (200–550 ms post-target onset). Differential activation of the BA40 cluster was related to a fatty acid measure (EPA) at delivery (*r* = -0.23, *P* < 0.05).

Reaction-time alerting score was positively related to fatty acid measures at 30 wk of pregnancy (AA:DHA) and at delivery (PUFAs >n-6). We did not observe significant associations of biochemical measures with errors for the alerting network.

DISCUSSION

In the present RCT, we aimed to identify the potential effects of prenatal supplementation (fatty acids and/or folate) on the

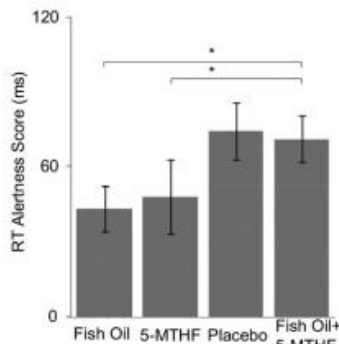


FIGURE 2 Reaction-time alerting scores for the children born to supplemented mothers. Scores are presented as a function of the 4 supplemented groups (fish oil, *n* = 37; 5-MTHF, *n* = 27; placebo, *n* = 32; 5-MTHF+fish oil, *n* = 34). Values are averages of medians ± SEMs. *Significant comparison based on ANOVA followed by Bonferroni-corrected *t* test, *P* = 0.04. RT, reaction time; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

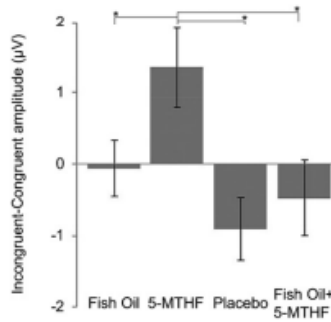


FIGURE 3 Average conflict-related amplitudes of the significant set of electroencephalographic channels in the left hemisphere (frontal channels: F5, F3; fronto-central channel: FC5) for the children born to supplemented mothers. Incongruent-congruent wave amplitudes are presented as a function of the 4 supplemented groups (fish oil, $n = 37$; 5-MTHF, $n = 27$; placebo, $n = 32$; 5-MTHF+fish oil, $n = 34$). Values are medians \pm SEMs. *Significant comparison based on the mass-univariate approach by using the t-max statistic. 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

long-term development of the attention system of the offspring compared with a placebo control group. We observed 2 important results: first, as expected, depending on the type of supplementation during pregnancy, increased concentrations of fatty acids or folate were observed in our study sample (Supplemental Tables 1 and 2); second, we observed long-term effects of this early maternal intervention on the attention system of the offspring. We observed behavioral and brain activity effects of this supplementation (especially of 5-MTHF) on the executive and, to a lesser degree, alerting attention networks. Taking into account that the time gap between nutritional supplementation and the attention test was ~ 8.5 y, our results show a causal relation between early maternal nutrition and offspring's long-term brain development. Importantly, these effects take place during a critical period for the maturation process of the executive functions (65).

Executive attention

With regard to behavioral measures, we found that the efficiency index of the executive network (the conflict score) was lower (better) in children born to mothers supplemented with 5-MTHF alone; these children performed better than those born to

mothers from the placebo and FO+5-MTHF groups. Moreover, ERP analysis indicated that in a set of left-frontal-hemisphere channels, ERP efficiency scores were higher at 270–290 ms post-target in children born to 5-MTHF-supplemented mothers than in those in the other groups. This time window is commonly thought to be when conflict monitoring and suppression of irrelevant behavior takes place, and is interpreted as a neural index of executive function in children (66, 67). Brain current source density estimations indicated that there are differences in the activation of a cluster of voxels located in the right mid-frontal cortex (including the dorsal cingulate, BA24 area). These areas have been suggested to be involved in the general control of behavior (68) and in differences in conflict monitoring as a function of developmental trajectories (69). Furthermore, the incongruent-congruent differences in the estimated activation of this brain area, and in scalp voltages, are positively related to umbilical cord plasma folate concentrations but not with fatty acid plasma phospholipid concentrations. In addition, although we did not find different prevalences of the *MTHFR C677T* polymorphism, this *MTHFR* variation produces similar outcomes because low folate intake seems to be responsible for the dysfunction of the response-monitoring function of the dorsal cingulate (70), the extent of which depends on allele load (71). Moreover, high serum concentrations of homocysteine have been linked to reduced gray matter volumes in the anterior cingulate and midcingulate cortex, among other brain areas, in rhesus monkeys (72). These results suggest that prenatal folate supplementation can improve the function of brain areas involved in executive control of behavior, perhaps by preventing prefrontal dopamine deficiency commonly observed in executive function pathologies (73).

Children born to mothers supplemented with FO also showed a small conflict-resolution advantage (FO group had scores between the 5-MTHF and the placebo and FO+5-MTHF groups). Although we expected executive function advantages for this group, recent systematic reviews and a meta-analysis of RCTs indicated that there is no clear evidence of the long-term effect of LC-PUFA supplementation during pregnancy on cognitive development (6, 74). Similarly, several RCT results failed to show long-term advantages in response-conflict tasks in 1) children born to lactating mothers supplemented with FO (75) or 2) children supplemented for several weeks before cognitive testing (76, 77). Thus, it seems that increasing FO intake during pregnancy will not necessarily have a long-term effect on executive functions in the offspring. More studies are needed to

TABLE 4

Brain regions that account for the differences between incongruent and congruent conditions with regard to the 5-MTHF compared with placebo and 5-MTHF compared with FO+5-MTHF group comparisons¹

Lobe	Area	Time, ms	<i>k</i>	BA	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	t-value
5-MTHF vs. placebo								
Limbic	Cingulate gyrus	395–423	12	24	5	-5	50	4.71*
Parietal	Inferior parietal	313–329	4	40	55	-40	40	4.51*
5-MTHF vs. FO+5-MTHF								
Parietal	Precuneus	403–419	4	31	15	-70	25	5.45*

¹ $n = 23, 26,$ and 34 for the 5-MTHF, placebo, and FO+5-MTHF groups, respectively. $x, y,$ and z are in the Montreal Neurological Institute space. Comparisons were performed by using the empirical distribution of the t-max statistic derived from 5000 random samples. * $P < 0.05$. BA, Brodmann area; FO, fish oil; k , number of significant voxels; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

EARLY NUTRITION AND OFFSPRING'S ATTENTION SYSTEM

123

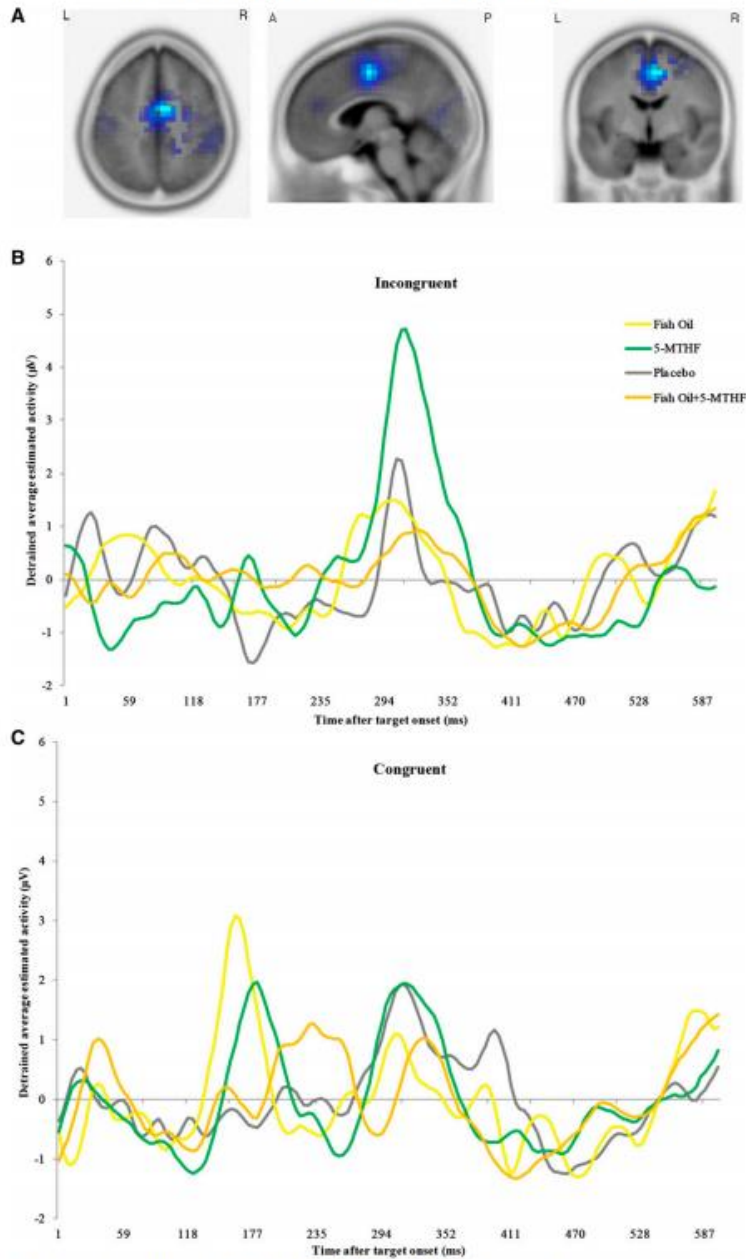


FIGURE 4 (A) Cluster of the midfrontal cortex in which significant enhanced conflict-related activation (t-max statistic of the mass-univariate approach) was observed when the 5-MTHF group ($n = 27$) was compared with the placebo group ($n = 32$) at the 395–423-ms post-target time window. Averaged detrended estimated activity of the midfrontal cluster for each supplemented group for the incongruent (B) and congruent (C) conditions. A, anterior; L, left; P, posterior; R, right; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate.

Downloaded from <https://academic.oup.com/ajcn/article/103/1/115/4662850> by guest on 08 November 2020

TABLE 5

Linear correlation coefficients between behavioral (overall speed, conflict and alerting networks) and ERP efficiency (conflict network) scores and biochemical measures during pregnancy¹

	Overall speed		Conflict		Alerting
	RT	Errors	ERP	Errors	RT
20 wk of pregnancy					
AA:DHA	-0.265**		0.198*		
n-6:n-3	0.320**				
tHcy	0.220*				
30 wk of pregnancy					
AA:DHA	0.233**				0.214*
n-6:n-3	0.310**				
Whole-blood folate	-0.181*				
At maternal delivery					
EPA				-0.201*	
AA:DHA			0.198*	0.195*	
PUFAs >n-6					0.205*
n-6:n-3	0.246**				
n-6 PUFAs				0.242**	
tHcy	0.173*	0.177*			
Umbilical cord					
AA:DHA		-0.226*	0.211*		
AA	-0.198*				
DHA	0.253**				
n-3 PUFAs	0.247**				
n-6:n-3	0.330**				
PUFAs >n-3	0.247**				
Plasma folate			0.207*		

¹Only variables showing at least one significant association are listed. AA, DHA, EPA, PUFAs, and n-6 and n-3 fatty acids were measured in plasma phospholipids. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Behavioral measures, $n = 130$; ERP efficiency, $n = 117$. ERP, event-related potential differences in average scalp amplitudes; AA, arachidonic acid; RT, reaction time; tHcy, total homocysteine.

disentangle the real effect of FO on the frontal network involved in executive functions.

We also observed a reduction in executive function advantage of early 5-MTHF supplementation when supplied together with FO (our FO+5-MTHF condition did not differ from placebo in any of the measures but did differ from the 5-MTHF-alone condition). To the best of our knowledge, there is no single study that used this same manipulation, so the apparently contradictory results reported here, especially with regard to the FO+5-MTHF group, must be interpreted cautiously and need further research. A possible mechanism for this interaction relies on metabolic alterations (78). We observed that plasma folate at 30 wk of pregnancy was 1.5 times higher in the FO+5-MTHF group than in the 5-MTHF group. Taking into account that plasma folate is significantly related to conflict-resolution scores, it is plausible to suggest that the beneficial effects of folate on executive function brain areas might be dose dependent. This agrees with the results from other recent studies that showed a dose-response relation between plasma folate concentration and the risk of emotional problems at age 6 y in the children of folate-deficient mothers (79).

Different studies have shown a clear relation between folic acid, vitamin B-12, and LC-PUFAs; in fact, a synergistic mechanism has been suggested (80, 81). However, this possibility does not fully explain the similar increase in maternal DHA concentrations observed in our mothers supplemented with FO or

with FO together with 5-MTHF or the different long-term attention effects. The interaction between FO and 5-MTHF supplementation may therefore have had a different effect with regard to the attention system evaluated here.

Alerting network

Children born to mothers supplemented with FO or 5-MTHF did not seem to take advantage of the information provided by the warning cue about when the target would be displayed—that is, their readiness to respond seems to be lower than that of the placebo and the FO+5-MTHF groups. These results are in agreement with the proposed inhibitory relation between the conflict and the alerting networks (66, 82). Given the brain areas involved in the alerting network (subcortical structures such as the locus coeruleus plus the parietal and prefrontal areas and the crucial involvement of norepinephrine release in phasic alertness), it is worth suggesting that a potential effect of these 2 supplements might rely on the reduction in norepinephrine concentration. Similarly, Hamazaki et al. (83) in an RCT study observed that even small doses of EPA plus DHA supplementation significantly reduced plasma concentrations of norepinephrine compared with the control group. On the other hand, the reduced alerting scores for the 5-MTHF-supplemented group might be related to an enhanced concentration of norepinephrine. The effects of norepinephrine on the cerebral cortex are concentration-dependent (84), so that high firing rates of the locus coeruleus (the brain source of norepinephrine) impairs memory performance (85, 86) and the alerting system (87, 88).

Despite the high attrition in our study, we were able to detect a difference in the reaction-time conflict score (36 ms) in executive attention (statistical power of 80%). Moreover, this is the first study to our knowledge that used this type of analysis in relation to nutrition in 130 children. We consider the power of the study to be high enough to detect electrophysiologically relevant differences between groups. There was only one trend observed in some of the results obtained by the electroencephalography, which probably would be significant with a larger sample size; however, in general, we do not think that a larger sample size would have led to significant differences in the majority of the attention systems studied.

With regard to the correlation analysis with the biochemical variables, in the present article we attempted to address the data found with this “exploratory” analysis, which data we considered to be interesting, and so we decided not to correct for the multiple-comparisons problem. Of course these results should be confirmed with further studies and a larger sample size.

Conclusions

In summary, our study showed that 5-MTHF supplementation during pregnancy, rather than FO alone or the combination of FO and 5-MTHF, improves children’s ability to solve conflicts—that is, their executive function—but tends to reduce their readiness to respond to an incoming target. This conflict-resolution advantage seems to be based on the activation of the cingulate cortex, a core area in the executive network, whose activity appears to be dependent on plasma folate concentrations during pregnancy. Further research should be conducted to improve the knowledge on this matter as well as the direct influence of early

folic acid and FO supplementation on cingulate cortex function and the optimal doses at different stages.

We especially thank Unilever and Sheila Wiseman for facilitating the 64-channel Active Two BioSemi EEG recording system (BioSemi, Amsterdam, Netherlands) and for facilitating the harmonization of the electroencephalography/ERP measurements in Germany and Hungary. We also thank Leandro L Di Stasi (Barrow Neurological Institute) for his assistance in designing the graphical material. The results of this article are likely to be included in the doctoral thesis of JAM-M in the context of the Genetic, Nutritional and Environmental Factors for Growth and Development Doctoral Program at the University of Granada.

The authors' responsibilities were as follows—AC: analyzed the electrophysiologic data and performed the neuroimaging interpretation and statistical analysis; AC and CC: wrote the manuscript; JAM-M, FJT-E, CM-Z, GH, and EG: conducted the research and performed the examination at 8.5 y and the electroencephalography/ERP recording; JAM-M and CD-P: collaborated on writing, reviewing, and formatting the manuscript; AG: analyzed the fatty acids data; AMM: analyzed folate status, homocysteine, and *MTHFR C677T* polymorphisms and reviewed the manuscript; AC, TD, BK, and CC: designed the research and had primary responsibility for final content; TD and BK: were coordinators of the NUHEAL study in Germany and Hungary and supervised the manuscript; CC: supervised the NUHEAL study in Granada; and all authors: helped in the interpretation of results and contributed to manuscript preparation. None of the authors reported a conflict of interest.

REFERENCES

- Anjos T, Altmäe S, Emmett P, Tiemeier H, Ciosa-Monasterolo R, Luque V, Wiseman S, Pérez-García M, Lattka E, Demmelmair H, et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr* 2013;52:1825–42.
- Elmadfa I, Meyer AL. Vitamins for the first 1000 days: preparing for life. *Int J Vitam Nutr Res* 2012;82(5):342–7.
- Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* 2003;143(4 Suppl):S1–8.
- Julvez J, Fortuny J, Mendez M, Torrent M, Ribas-Fitó N, Sunyer J. Maternal use of folic acid supplements during pregnancy and four-year-old neurodevelopment in a population-based birth cohort. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009;23:199–206.
- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Cox LA, Li C, Stuchlik K, Witte OW, Nathanielsz PW, McDonald TJ. Vulnerability of the fetal primate brain to moderate reduction in maternal global nutrient availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:3011–6.
- Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr* 2012;107(Suppl 2):S85–106.
- Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007;137:855–9.
- Koletzko B, Boey CCM, Campoy C, Carlson SE, Chang N, Guillermino-Tuazon MA, Joshi S, Prell C, Quak SH, Sjarif DR, et al. Current information and Asian perspectives on long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation, and infancy: systematic review and practice recommendations from an Early Nutrition Academy Workshop. *Ann Nutr Metab* 2014;65:49–80.
- Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:559–79.
- Kitajka K, Puskás LG, Zvara A, Hackler L, Barceló-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2619–24.
- Coti Bertrand P, O'Kusky JR, Innis SM. Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. *J Nutr* 2006;136:1570–5.
- Lauritzen L, Jørgensen MH, Olsen SF, Straarup EM, Michaelsen KF. Maternal fish oil supplementation in lactation: effect on developmental outcome in breast-fed infants. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:535–47.
- Campoy C, Escolano-Margarit MV, Ramos R, Parrilla-Roure M, Csábi G, Beyer J, Ramirez-Tortosa MC, Molloy AM, Decsi T, Koletzko BV. Effects of prenatal fish-oil and 5-methyltetrahydrofolate supplementation on cognitive development of children at 6.5 y of age. *Am J Clin Nutr* 2011;94(6 Suppl):1880S–8S.
- Escolano-Margarit MV, Ramos R, Beyer J, Csábi G, Parrilla-Roure M, Cruz F, Perez-García M, Hadders-Algra M, Gil A, Decsi T, et al. Prenatal DHA status and neurological outcome in children at age 5.5 years are positively associated. *J Nutr* 2011;141:1216–23.
- Helland IB, Smith L, Blomén B, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. 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* 2008;122:e472–9.
- Smithers LG, Gibson RA, Makrides M. Maternal supplementation with docosahexaenoic acid during pregnancy does not affect early visual development in the infant: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1293–9.
- Gould JF, Makrides M, Colombo J, Smithers LG. Randomized controlled trial of maternal omega-3 long-chain PUFA supplementation during pregnancy and early childhood development of attention, working memory, and inhibitory control. *Am J Clin Nutr* 2014;99:851–9.
- McNamara RK, Able J, Jandacek R, Rider T, Tso P, Eliasson JC, Alfieri D, Weber W, Jarvis K, DelBello MP, et al. Docosahexaenoic acid supplementation increases prefrontal cortex activation during sustained attention in healthy boys: a placebo-controlled, dose-ranging, functional magnetic resonance imaging study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1060–7.
- Colombo J, Kannass KN, Shaddy DJ, Kundurthi S, Maikranz JM, Anderson CJ, Blaga OM, Carlson SE. Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. *Child Dev* 2004;75:1254–67.
- Sagiv SK, Thurston SW, Bellinger DC, Amarasingwardena C, Korrick SA. Prenatal exposure to mercury and fish consumption during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder-related behavior in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2012;166:1123–31.
- Crider KS, Devine O, Hao L, Dowling NF, Li S, Molloy AM, Li Z, Zhu J, Berry RJ. Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: Bayesian model. *BMJ* 2014;349:g4554.
- Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137–46.
- Pérez-Dueñas B, Ormazábal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano M, Sierra C, De Grandis E, Marfa MP, García-Cazorla A, et al. Cerebral folate deficiency syndromes in childhood: clinical, analytical, and etiologic aspects. *Arch Neurol* 2011;68:615–21.
- Sram RJ, Binkova B, Lnenickova Z, Solansky I, Dejmeek J. The impact of plasma folate levels of mothers and newborns on intrauterine growth retardation and birth weight. *Mutat Res* 2005;591:302–10.
- Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiovascular risk. *J Appl Genet* 2008;49:267–82.
- Roza SJ, van Batenburg-Eddes T, Steegers EAP, Jaddoe VVW, Mackenbach JP, Hofman A, Verhulst FC, Tiemeier H. Maternal folic acid supplement use in early pregnancy and child behavioural problems: the Generation R Study. *Br J Nutr* 2010;103:445–52.
- Schlutz W, Jones A, Phillips DIW, Gale CR, Robinson SM, Godfrey KM. Lower maternal folate status in early pregnancy is associated with childhood hyperactivity and peer problems in offspring. *J Child Psychol Psychiatry* 2010;51:594–602.
- Nguyen CT, Gracely EJ, Lee BK. Serum folate but not vitamin B-12 concentrations are positively associated with cognitive test scores in children aged 6–16 years. *J Nutr* 2013;143:500–4.
- Veena SR, Krishnaveni GV, Srinivasan K, Wills AK, Muthayya S, Kurpad AV, Yajnik CS, Fall CH. Higher maternal plasma folate but not vitamin B-12 concentrations during pregnancy are associated with better cognitive function scores in 9- to 10-year-old children in South India. *J Nutr* 2010;140:1014–22.
- Skórka A, Gienuszczyk-Białek D, Pieścik M, Szajewska H. Effects of prenatal and/or postnatal (maternal and/or child) folic acid supplementation on the mental performance of children. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012;52:959–64.
- Petersen SE, Posner MI. The attention system of the human brain: 20 years after. *Annu Rev Neurosci* 2012;35:73–89.
- Raz A, Buhle J. Typologies of attentional networks. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:367–79.
- Botvinick MM, Braver TS, Barch DM, Carter CS, Cohen JD. Conflict monitoring and cognitive control. *Psychol Rev* 2001;108:624–52.
- MacDonald AW, Cohen JD, Stenger VA, Carter CS. Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. *Science* 2000;288:1835–8.

35. Shenhav A, Botvinick MM, Cohen JD. The expected value of control: an integrative theory of anterior cingulate cortex function. *Neuron* 2013;79:217–40.
36. Karch S, Feurecker R, Leicht G, Meindl T, Hantschk I, Kirsch V, Ertl M, Lutz J, Pogarell O, Mulert C. Separating distinct aspects of the voluntary selection between response alternatives: N2- and P3-related BOLD responses. *Neuroimage* 2010;51:356–64.
37. Albert J, López-Martín S, Hinojosa JA, Carretié L. Spatiotemporal characterization of response inhibition. *Neuroimage* 2013;76:272–81.
38. Isaacs EB. Neuroimaging, a new tool for investigating the effects of early diet on cognitive and brain development. *Front Hum Neurosci* 2013;7:445.
39. Paus T. A primer for brain imaging: a tool for evidence-based studies of nutrition? *Nutr Rev* 2010;68(Suppl 1):S29–37.
40. Sizonenko SV, Babiloni C, Sijben JW, Walhovd KB. Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies? *Adv Nutr* 2013;4:554–6.
41. Ambrosini E, Vastano R, Montefinese M, Ciavarrò M. Functional specificity of the locus coeruleus-norepinephrine system in the attentional networks. *Front Behav Neurosci* 2013;7:201.
42. Chica AB, Bartolomeo P, Valero-Cabré A. Dorsal and ventral parietal contributions to spatial orienting in the human brain. *J Neurosci* 2011;31:8143–9.
43. Krauss-Etschmann S, Shadid R, Campoy C, Hoster E, Demmelmair H, Jiménez M, Gil A, Rivero M, Veszprémi B, Decsi T, et al; Nutrition and Health Lifestyle (NUHEAL) Study Group. Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1392–400.
44. Kolarovic L, Fournier NC. A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. *Anal Biochem* 1986;156:244–50.
45. Agren JJ, Julkunen A, Penttilä I. Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *J Lipid Res* 1992;33:1871–6.
46. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986;27:114–20.
47. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43–53.
48. Fazili Z, Pfeiffer CM, Zhang M, Jain R. Erythrocyte folate extraction and quantitative determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison of results with microbiologic assay. *Clin Chem* 2005;51:2318–25.
49. Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, Zhang M, Gunter EW. Determination of folate vitamins in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clin Chem* 2004;50:423–32.
50. Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G, Ueland PM. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:2103–9.
51. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
52. Rueda MR, Fan J, McCandliss BD, Halparin JD, Gruber DB, Lercari LP, Posner MI. Development of attentional networks in childhood. *Neuropsychologia* 2004;42:1029–40.
53. Fan J, McCandliss BD, Sommer T, Raz A, Posner MI. Testing the efficiency and independence of attentional networks. *J Cogn Neurosci* 2002;14:340–7.
54. Belouchrani A, Abed-Meraim K, Cardoso J-F, Moulines E. A blind source separation technique using second-order statistics. *IEEE Trans Signal Process* 1997;45:434–44.
55. Tang AC, Sutherland MT, McKinney CJ. Validation of SOBI components from high-density EEG. *Neuroimage* 2005;25:539–53.
56. Mognon A, Jovicich J, Bruzzone L, Buiatti M. ADJUST: an automatic EEG artifact detector based on the joint use of spatial and temporal features. *Psychophysiology* 2011;48:229–40.
57. Groppa DM, Urbach TP, Kutas M. Mass univariate analysis of event-related brain potentials/fields I: a critical tutorial review. *Psychophysiology* 2011;48:1711–25.
58. Pascual-Marqui RD. Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24(Suppl D):5–12.
59. Braver TS, Barch DM, Gray JR, Molfese DL, Snyder A. Anterior cingulate cortex and response conflict: effects of frequency, inhibition and errors. *Cereb Cortex*. 2001;11(9):825–36.
60. Falkenstein M, Hoormann J, Hohnsbein J. ERP components in Go/Nogo tasks and their relation to inhibition. *Acta Psychol (Amst)* 1999;101:267–91.
61. Folstein JR, Van Petten C. Influence of cognitive control and mismatch on the N2 component of the ERP: a review. *Psychophysiology* 2008;45:152–70.
62. Jones AD, Cho RY, Nystrom LE, Cohen JD, Braver TS. A computational model of anterior cingulate function in speeded response tasks: effects of frequency, sequence, and conflict. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2002;2:300–17.
63. Lo Y-H, Liang W-K, Lee H-W, Wang C-H, Tzeng OJL, Hung DL, Cheng SK, Juan CH. The neural development of response inhibition in 5- and 6-year-old preschoolers: an ERP and EEG study. *Dev Neuropsychol* 2013;38:301–16.
64. Patel SH, Azzam PN. Characterization of N200 and P300: selected studies of the event-related potential. *Int J Med Sci* 2005;2:147–54.
65. Shaw P, Kabani NJ, Lerch JP, Eckstrand K, Lenroot R, Gogtay N, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Rapoport JL, et al. Neurodevelopmental trajectories of the human cerebral cortex. *J Neurosci* 2008;28:3586–94.
66. Abundis-Gutiérrez A, Checa P, Castellanos C, Rosario Rueda M. Electrophysiological correlates of attention networks in childhood and early adulthood. *Neuropsychologia* 2014;57:78–92.
67. Espinet SD, Anderson JE, Zelazo PD. Reflection training improves executive function in preschool-age children: behavioral and neural effects. *Dev Cogn Neurosci* 2013;4:3–15.
68. Fedorenko E, Duncan J, Kanwisher N. Broad domain generality in focal regions of frontal and parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:16616–21.
69. van Meel CS, Heslenfeld DJ, Rommelse NN, Oosterlaan J, Sergeant JA. Developmental trajectories of neural mechanisms supporting conflict and error processing in middle childhood. *Dev Neuropsychol* 2012;37:358–78.
70. Roffman JL, Brohawn DG, Friedman JS, Dyckman KA, Thakkar KN, Agam Y, Vangel MG, Goff DC, Manoach DS. MTHFR 677C>T effects on anterior cingulate structure and function during response monitoring in schizophrenia: a preliminary study. *Brain Imaging Behav* 2011;5:65–75.
71. Roffman JL, Nitenson AZ, Agam Y, Isom M, Friedman JS, Dyckman KA, Brohawn DG, Smoller JW, Goff DC, Manoach DS. A hypomethylating variant of MTHFR, 677C>T, blunts the neural response to errors in patients with schizophrenia and healthy individuals. *PLoS One* 2011;6:e25253.
72. Willette AA, Gallagher C, Bendlin BB, McLaren DG, Kastman EK, Canu E, Kosmatka KJ, Field AS, Alexander AL, Colman RJ, et al. Homocysteine, neural atrophy, and the effect of caloric restriction in rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 2012;33:670–80.
73. Roffman JL, Gollub RL, Calhoun VD, Wassink TH, Weiss AP, Ho BC, White T, Clark VP, Fries J, Andreasen NC, et al. MTHFR 677C → T genotype disrupts prefrontal function in schizophrenia through an interaction with COMT 158Val → Met. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17573–8.
74. Gould JF, Smithers LG, Makrides M. 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. *Am J Clin Nutr* 2013;97:531–44.
75. Cheatham CL, Nerhammer AS, Asserhøj M, Michaelsen KF, Lauritzen L. Fish oil supplementation during lactation: effects on cognition and behavior at 7 years of age. *Lipids* 2011;46:637–45.
76. Jackson PA, Reay JL, Scholey AB, Kennedy DO. Docosahexaenoic acid-rich fish oil modulates the cerebral hemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults. *Biol Psychol* 2012;89:183–90.
77. Yi SHL, Kable JA, Evatt ML, Singh RH. A randomized, placebo-controlled, double-blind trial of supplemental docosahexaenoic acid on cognitive processing speed and executive function in females of reproductive age with phenylketonuria: a pilot study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85:317–27.
78. Rao S, Joshi S, Kale A, Hegde M, Mahadik S. Maternal folic acid supplementation to dams on marginal protein level alters brain fatty acid levels of their adult offspring. *Metabolism* 2006;55:628–34.
79. Steenweg-de Graaff J, Roza SJ, Steegers EA, Hofman A, Verhulst FC, Jaddoe VW, Tiemeier H. Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1413–21.

EARLY NUTRITION AND OFFSPRING'S ATTENTION SYSTEM

127

80. Meher A, Joshi A, Joshi S. Differential regulation of hepatic transcription factors in the Wistar rat offspring born to dams fed folic acid, vitamin B12 deficient diets and supplemented with omega-3 fatty acids. *PLoS One* 2014;9(2):e90209.
81. Umhau JC, Dauphinais KM, Patel SH, Nahrwold DA, Hibbeln JR, Rawlings RR, George DT. The relationship between folate and docosahexaenoic acid in men. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:352-7.
82. Callejas A, Lupiáñez J, Funes MJ, Tudela P. Modulations among the alerting, orienting and executive control networks. *Exp Brain Res* 2005;167:27-37.
83. Hamazaki K, Itomura M, Huan M, Nishizawa H, Sawazaki S, Tanouchi M, Watanabe S, Hamazaki T, Terasawa K, Yazawa K. Effect of omega-3 fatty acid-containing phospholipids on blood catecholamine concentrations in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Nutrition* 2005;21:705-10.
84. Aston-Jones G, Chiang C, Alexinsky T. Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog Brain Res* 1991;88:501-20.
85. Bimbaum S, Gobeske KT, Auerbach J, Taylor JR, Arnsten AF. A role for norepinephrine in stress-induced cognitive deficits: alpha-1-adrenoceptor mediation in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 1999;46:1266-74.
86. Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED. Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 1995;64:619-28.
87. Rajkowski J, Kubiak P, Aston-Jones G. Locus coeruleus activity in monkey: phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res Bull* 1994;35:607-16.
88. Usher M, Cohen JD, Servan-Schreiber D, Rajkowski J, Aston-Jones G. The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science* 1999;283:549-54.

