



Papel de los ácidos grasos trans (AGT) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) en el desarrollo de enfermedades atópicas en la primera etapa de la vida

Aida Maribel Chisaguano Tonato

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS (AGT) Y ÁCIDOS
GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA (AGPI-CL)
EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES ATÓPICAS
EN LA PRIMERA ETAPA DE LA VIDA**

Aida Maribel Chisaguano Tonato, 2014



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

DOCTORADO EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

**PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS (AGT) Y ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA (AGPI-CL) EN EL
DESARROLLO DE ENFERMEDADES ATÓPICAS
EN LA PRIMERA ETAPA DE LA VIDA**

Memoria presentada por **Aida Maribel Chisaguano Tonato** para optar al título
de Doctor por la Universidad de Barcelona

Las Directoras,

Dra. M. Carmen López Sabater

Dra. Ana Isabel Castellote Bargalló

La Doctoranda,

Aida Maribel Chisaguano Tonato

Aida Maribel Chisaguano Tonato, 2014

Este trabajo ha sido financiado por



Ministerio de Economía y competitividad, mediante la concesión del Proyecto de Investigación “Importancia de los ácidos grasos durante la primera etapa de la vida en la prevención de enfermedades atópicas”, referencia AGL2009-09730/ALI.

Ministerio de Economía y competitividad, mediante la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI), disfrutada desde Agosto de 2010 hasta Julio de 2014.

A mi familia

Agradecimientos

Quisiera mostrar mi gratitud en primer lugar a mis directoras de tesis, a la Dra. M Carmen López y a la Dra. Ana Isabel Castellote, por confiar en mí desde el primer momento para desarrollar este trabajo, gracias por sus buenos consejos, recomendaciones, por compartir conmigo sus conocimientos siempre con la mejor disposición y sobre todo gracias por su entusiasmo y amabilidad demostrados a lo largo de estos años.

También quiero agradecer el apoyo incondicional de mi familia, en especial a mis padres, Víctor y Blanca, sin su apoyo en la vida hubiera imaginado siquiera que hoy estuviera aquí, terminando una de las etapas que más han marcado mi vida, personal y profesionalmente. El esfuerzo y su sacrificio valió la pena padres queridos, gracias por su infinita paciencia y su amor. Gracias a Carmen mi amiga, mi hermana y la persona que me ha enseñado a no rendirme y a seguir siempre con ganas. Mony, la pequeña de las hermanas “energía pura” gracias por enseñarme que en esta vida de vez en cuando “ser práctico” no es malo. A mis pequeños “caramelos”, Sebastián y Alejandro, gracias por sus mil sonrisas y los mil “te quiero Mary”, sin duda no hay amor más sincero que el de un niño. A Darwin, mi cuñado y mi amigo, que llegó a nuestras vidas en el momento indicado, gracias por sus consejos. A ustedes quiero dedicarles esta modesta investigación pues sé la ilusión que les hace y comprenden perfectamente lo que significó este reto para mí.

Guardo un pedacito muy especial para mi abuelita Carmen, quien en su vida no tuvo algo material que compartir, pero siempre me dio lo más importante, su cariño, creo firmemente que ella es el ángel que cuida a toda mi familia. Quiero agradecer a mis primos/as Miriam (prima-hermana), Diana, Emily, Luis, Juan Carlos, Raúl, Patricio y a mis tíos Isabel y Rafael, por su apoyo en la distancia.

Un agradecimiento a mis amigos de Ecuador, de manera especial a Cris Sánchez y a tu familia, por recibirme en tu hogar siempre con mucho cariño. A Julieta, Byron, Luis, Verónica y Andrea por creer en mí y apoyarme en todo momento. Los quiero mucho amigos, la familia va creciendo y espero estar allí para compartir con ustedes.

Un agradecimiento muy especial a mis amigas/os de Barcelona, doy gracias por haber conocido a buenas personas y de las que he aprendido mucho. Marcela, me siento una privilegiada de haber conocido a una persona que me da la confianza que sólo una amistad sincera permite, gracias por los mil y un momentos, las anécdotas que nos quedan para contar generación tras generación. Rouse, nuestra amistad ha ido creciendo a pasitos, gracias por tu paciencia, tu sencillez y por tu calidez humana, gracias por guiarme afectuosamente en este camino siempre con los mejores

consejos. Mis largas jornadas en el laboratorio me han permitido también conocer a personas especiales como Cris Fernández, eres la inocencia en estado puro, con quien compartí los más divertidos e interminables días en el lab. Andrea, que llegaste con tu gran sonrisa y tu buen humor, gracias por llenarme este tiempo de energía positiva. Gracias chicas por las sonrisas y las historias compartidas.

No quiero terminar sin decir gracias a Cori, Luis Mendoza, Lydía y Mónica por todo su apoyo durante mi larga estancia en Barcelona.

Gracias!!!

Contenido

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tablas	v
I. RESUMEN.....	1
II. INTERÉS.....	7
III. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	11
1. Epidemiología de las enfermedades atópicas en la infancia.....	11
1.1. Atopía, alergia y enfermedades atópicas.....	11
1.2. Prevalencia de las enfermedades atópicas.....	12
1.3. Factores que influyen en el desarrollo de las enfermedades atópicas.....	14
2. Ácidos grasos y enfermedades atópicas en la infancia	15
2.1. Ácidos grasos: estructura, nomenclatura, fuentes y biosíntesis.....	15
2.1.1. Estructura y nomenclatura	15
2.1.2. Fuentes alimentarias y biosíntesis endógena.....	17
2.1.2.1. Ácidos grasos poliinsaturados	17
2.1.2.2. Ácidos grasos <i>trans</i>	21
2.2.3. Transporte de los ácidos grasos a través de la placenta.....	24
2.2. Ácidos grasos: proceso inflamatorio y atopía	27
2.2.1. Efectos sobre la síntesis de mediadores lipídicos.....	29
2.2.2. Efectos en la expresión génica.....	37
2.3. Ácidos grasos poliinsaturados: embarazo y recién nacido y riesgo de enfermedades atópicas en la infancia.....	39
2.4. Ácidos grasos <i>trans</i> y enfermedades atópicas en la infancia.....	46
3. Desaturasas y elongasas y enfermedades atópicas en la infancia.....	48
3.1. Desaturasas y Elongasas: estructura y función	52
3.1.1. $\Delta 5$ -desaturasa (D5D) y $\Delta 6$ -desaturasa (D6D): genes FADS1 y FADS2	52
3.1.2. Elongasa-2 y Elongasa-5: genes ELOVL2 y ELOVL5	53
3.1.3. Actividad enzimática de desaturasas y elongasas	54

3.2. Variantes genéticas de <i>FADS1</i> y <i>FADS2</i> y su relación con los niveles de AGPI-CL en los tejidos humanos	54
3.3. Variantes genéticas del clúster <i>FADS</i> y <i>ELOVL</i> y riesgo de enfermedad en la infancia	61
3.4. Expresión génica de los genes <i>FADS</i> y <i>ELOVL</i> y riesgo de enfermedad	65
IV. OBJETIVOS	69
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	73
VI. METODOLOGÍA	77
1. Población de estudio: Proyecto INMA	77
2. Recogida de datos.....	78
3. Aspectos éticos.....	79
VII. RESULTADOS.....	83
1. PUBLICACIÓN 1: <i>Elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid (c9,t11-CLA) determination in human plasma phospholipids and human milk by fast gas chromatography.....</i>	83
2. PUBLICACIÓN 2: <i>Elaidic, t-vaccenic and rumenic acid status during pregnancy: association with maternal plasmatic LC-PUFAs and atopic manifestations in infants.....</i>	95
3. PUBLICACIÓN 3: <i>Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort.....</i>	123
4. PUBLICACIÓN 4: <i>FADS and ELOVL genetic variants, cord blood fatty acid composition and risk of eczema and wheeze in childhood.....</i>	131
5. PUBLICACIÓN 5: <i>Gene Expression of Desaturase (FADS1 and FADS2) and Elongase (ELOVL5) Enzymes in Peripheral Blood: Association with Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Atopic Eczema in 4-Year-Old Children.....</i>	167
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	179
1. Metodología analítica.....	179

2.	Estudios sobre la influencia de la composición plasmática de ácidos grasos en el desarrollo de enfermedades atópicas.....	181
3.	Estudios de la influencia de factores genéticos sobre la composición de ácidos grasos y enfermedades atópicas	186
IX.	CONCLUSIONES.....	193
X.	BIBLIOGRAFÍA	197
XI.	ANEXOS	217
1.	Participación en otras publicaciones	217
1.1.	PUBLICACIÓN 6: <i>Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk.....</i>	218
1.2.	PUBLICACIÓN 7: <i>Consumption of olive oil affects the phenolic content and fatty acid profile of human high-density lipoproteins</i>	230
2.	Comunicaciones presentadas en Congresos.....	231

Lista de Abreviaturas

A	Ácido adrénico (<i>Adrenic acid</i>)
AA	Ácido araquidónico (<i>Arachidonic acid</i>)
AG	Ácido/s graso/s (<i>Fatty acid/s</i>)
AGE	Ácido/s graso/s esencial/es (<i>Essential fatty acid/s</i>)
AGMI	Ácido/s graso/s monoinsaturado/s (<i>Monounsaturated fatty acid/s</i>)
AGPI	Ácido/s graso/s poliinsaturado/s (<i>Polyunsaturated fatty acid/s</i>)
AGPI-CL	Ácido/s graso/s poliinsaturado/s de cadena larga (<i>Long-chain polyunsaturated fatty acid/s</i>)
AGS	Ácido/s graso/s saturado/s (<i>Saturated fatty acid/s</i>)
ALA	Ácido α -linolénico (<i>α-linolenic acid</i>)
CLA	Ácido linoleico conjugado (<i>Conjugated linoleic acid</i>)
CFA	Cuestionario de frecuencia alimentaria (<i>Food frequency questionnaire</i>)
COX	Ciclooxigenasa (<i>Cyclooxygenase</i>)
D5D	Δ 5-desaturasa (<i>Δ5-desaturase</i>)
D6D	Δ 6-desaturasa (<i>Δ6-desaturase</i>)
D9D	Δ 9-desaturasa (<i>Δ9-desaturase</i>)
DGLA	Ácido Dihomo- γ -linolénico (<i>Dihomo-γ-linolenic acid</i>)
DHA	Ácido docosahexaenoico (<i>Docosahexaenoic acid</i>)
EA	Eczema atópico (<i>Atopic eczema</i>)
EDA	Ácido Eicosadienoico (<i>Eicosadienoic acid</i>)
ELA	Ácido Elaídico (<i>Elaidic acid</i>)
ELOVL	Elongasa/as de ácidos grasos de cadena muy larga (<i>Elongase of very long chain fatty acid</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenoico (<i>Eicosapentaenoic acid</i>)
FADS	Desaturasa/as de ácidos grasos (<i>Fatty acid desaturases</i>)
FAME	Éster metílico de un ácido graso (<i>Fatty acid methyl ester</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas chromatography</i>)
GLA	Ácido γ -linolénico (<i>γ-linolenic acid</i>)
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
i.d.	Diámetro interno (<i>Internal diameter</i>)

IgE	Inmunoglobulina E (<i>Immunoglobulin E</i>)
IL	Interleucinas (<i>Interleukin</i>)
LA	Ácido linoleico (<i>Linoleic acid</i>)
LOX	Lipoxigenasa (<i>Lypoxigenase</i>)
LPL	Lipoproteinlipasa (<i>Lipoprotein lipase</i>)
LTs	Leucotrienos (<i>Leukotrienes</i>)
MAF	Frecuencia del alelo minoritario (<i>Minor allele frequency</i>)
NFκβ	Factor nuclear κβ (<i>Nuclear factor κβ</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
OR	Odds ratios (<i>odds ratio</i>)
PGs	Prostaciclinas (<i>Prostacyclines</i>)
PGs	Prostaglandinas (<i>Prostaglandins</i>)
PLA₂	Fosofolipasa A ₂ (<i>Phospholipase A₂</i>)
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales (<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>)
RA	Ácido ruménico (<i>Rumenic acid</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
RV	Resolvinas (<i>Resolvins</i>)
SNP	Polimorfismos de un sólo nucleótido (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
TG	Triglicéridos (<i>Triglycerides</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumoral necrosis factor</i>)
TXs	Tromboxanos (<i>Tromboxanes</i>)
VA	Ácido vaccénico (<i>Vaccenic acid</i>)
WAO	Organización Mundial de Alergias (<i>World Allergy Organization</i>)

Lista de Figuras

Figura 1.	Incidencia de las enfermedades atópicas en la infancia.....	13
Figura 2.	Estructura y nomenclatura de los ácidos grasos (a) Oleico (C18:1 n-9; c9-C18:1), (b) <i>t</i> -vaccénico (<i>t</i> 11-C18:1), (c) Elaídico (<i>t</i> 9-C18:1) y (d) Ruménico (<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA).....	16
Figura 3.	Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) de las series n-6 y n-3.....	20
Figura 4.	Ruta de síntesis del ácido ruménico (<i>c</i> 9 <i>t</i> 11-CLA) en el rumen y en la glándula mamaria de rumiantes.....	24
Figura 5.	Transporte de los ácidos grasos a través de la placenta de la madre hacia el feto.....	25
Figura 6.	Mecanismos de acción implicados en el efecto de los AGPI sobre la respuesta inmunitaria.....	28
Figura 7.	Biosíntesis de los mediadores lipídicos: Eicosanoides y Docosanoides a partir de AGPI-CL.....	30
Figura 8.	Efecto del aumento de consumo de AGPI n-6 y n-3 sobre las manifestaciones atópicas.....	34
Figura 9.	Posible ruta metabólica seguida por el CLA.....	36
Figura 10.	Efectos del CLA (<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA) en la síntesis de eicosanoides.....	37
Figura 11.	Posible acción de los AGPI-CL (e.j. EPA y DHA) y CLA (e.j. RA) en la expresión génica.....	39
Figura 12.	Esquema de un Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP, del inglés <i>Single Polymorphism Nucleotid</i>).....	49
Figura 13.	Localización de los genes <i>FADS1</i> y <i>FADS2</i> en el cluster <i>FADS</i> del Cromosoma 11 del Genoma Humano.....	53
Figura 14.	Localización de los genes <i>ELOVL2</i> y <i>ELOVL5</i> en el Cromosoma 6 del Genoma Humano.....	53
Figura 15.	Desaturasas y Elongasas que participan en la biosíntesis de AGPI-CL.....	55

Figura 16. Localización geográfica de las siete cohortes de estudio del Proyecto INMA, distinguiendo entre las cohortes <i>de novo</i> y las cohortes preexistentes.....	78
Figura 17. Diseño del estudio aplicado en la tesis doctoral. Recogida de datos y muestras biológicas. Cohorte INMA-Sabadell.....	79

Lista de Tablas

Tabla 1.	Nombre de los principales ácidos grasos analizados en muestras biológicas.....	18
Tabla 2.	Efectos fisiológicos de los principales mediadores lipídicos producidos a partir de AGPI-CL.....	32
Tabla 3.	Papel del consumo de alimentos y ácidos grasos durante el embarazo en relación en el desarrollo de enfermedades atópicas: resumen de estudios prospectivos de cohortes de nacimientos.....	42
Tabla 4.	Papel del estatus de AG de la madre y del recién nacido (cordón umbilical) en el desarrollo de enfermedades atópicas: resumen de los estudios prospectivos de cohortes de nacimientos.....	45
Tabla 5.	Concentraciones de AGPI y AGPI-CL en el suero ó plasma de niños atópicos comparados con los no-atópicos.....	50
Tabla 6.	Asociación entre las variantes genéticas de <i>FADS1</i> y <i>FADS2</i> de la madre y el niño con las concentraciones de ácidos grasos en diferentes fluidos corporales.....	57
Tabla 7.	Asociación entre las variantes genéticas de <i>FADS1</i> y <i>FADS2</i> en la población adulta con las concentraciones de ácidos grasos en diferentes fluidos corporales.....	59
Tabla 8.	Asociación entre los polimorfismos del clúster <i>FADS</i> y las enfermedades atópicas.....	63

RESUMEN

I. RESUMEN

La prevalencia de enfermedades atópicas en la infancia se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, principalmente en los países industrializados. Los cambios en la dieta, con la consecuente alteración de la composición de ácidos grasos, han sido sugeridos como factores responsables.

La composición de **ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga** (AGPI-CL) en los tejidos humanos es esencial para mantener las funciones metabólicas y la salud. Enfermedades como, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular y enfermedades atópicas han sido relacionadas con los niveles de AGPI-CL. Además de la dieta, un factor que influye en la composición de los AGPI-CL en los tejidos humanos es la síntesis *de novo* de los mismos. En este proceso, los AGPI-CL son sintetizados a partir de ácidos grasos esenciales a través de diferentes etapas de desaturación y elongación. Las enzimas que participan en las cascadas de reacción son las desaturasas: **$\Delta 5$ -desaturasa (D5D, codificada por el gen *FADS1*) y $\Delta 6$ -desaturasa (D6D, codificada por el gen *FADS2*), y las elongasas: **Elongasa-2 (codificada por el gen *ELOVL2*) y Elongasa-5 (codificada por el gen *ELOVL5*).****

Por otro lado, existe un escaso conocimiento sobre la relación de los **ácidos grasos trans** (AGT) con el desarrollo de las enfermedades atópicas. Se ha sugerido que los AGT pueden modificar el metabolismo de los AGPI-CL, teniendo efectos beneficiosos los AGT procedentes de fuentes naturales (ácido *t*-vaccénico y ácido ruménico) respecto a los AGT de fuentes industriales (ácido elaídico).

El objetivo principal de esta tesis fue investigar si la composición plasmática de AG, durante la vida fetal y postnatal, afecta al desarrollo de las enfermedades atópicas en los niños, por lo que se planteó la hipótesis de que niveles plasmáticos elevados de ácido *t*-vaccénico, ácido ruménico y AGPI-CL de la serie n-3 en mujeres embarazadas disminuyen el riesgo mientras que los niveles altos de ácido elaídico y AGLP-CL n-6 aumentan el riesgo de desarrollo de enfermedades atópicas en sus hijos en la infancia. Además, se planteó la hipótesis de que las diferencias genéticas entre individuos pueden

modificar la composición de los AG y por tanto influir en el desarrollo de las enfermedades atópicas.

Esta tesis doctoral ha dado lugar a cinco publicaciones que están basadas en el Proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente) de la Cohorte de Sabadell (Cataluña, España).

La primera publicación se focalizó en el desarrollo del método que nos permita identificar, separar y cuantificar los ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos y de la leche humana, especialmente los ácidos grasos *trans*, como el ácido elaídico (*t9*-C18:1), ácido *t*-vaccénico (*t11*-C18:1) y ácido ruménico (*c9t11*-C18:2, CLA). Se usaron placas de extracción en fase sólida (SPE) de 96 pocillos para las muestras de plasma humano, y se optimizó la cantidad de muestra para la leche humana. La adecuada preparación de la muestra junto con la aplicación de la cromatografía de gases rápida nos permitió cuantificar los ácidos grasos de interés dentro de un perfil total de ácidos grasos en un tiempo considerablemente menor respecto a metodologías tradicionales. Una adecuada precisión y recuperación garantizan la validez del método desarrollado.

En la segunda publicación se estudió la posible relación entre los niveles plasmáticos en las mujeres embarazadas de los ácidos grasos *trans* procedentes de dos fuentes diferentes de la dieta y el desarrollo del eczema atópico y sibilancias en los niños durante el primer año de vida, considerando al ácido elaídico como marcador de la ingesta de grasa procedente del procesamiento industrial de los alimentos (fuente industrial), y el ácido *t*-vaccénico junto con el ácido ruménico como marcadores de la ingesta de alimentos de origen lácteo y cárnico de rumiantes (fuente natural). Los resultados indican que niveles altos de ácido ruménico ayudan a una mejor metabolización de los AGPI-CL en el plasma materno, y que una exposición temprana del feto a niveles altos de ácido *t*-vaccénico puede tener un efecto protector frente al desarrollo del eczema atópico en el primer año de vida. Por otro lado, parece poco probable que la exposición fetal al ácido graso elaídico sea un factor determinante en el desarrollo eczema atópico y sibilancias en la infancia temprana.

En la tercera publicación se investigó la asociación entre los niveles de ácidos grasos en el plasma materno y plasma de cordón umbilical y el riesgo de desarrollo de eczema atópico en el niño durante el primer año de vida, con especial interés en los AGPI-CL de la serie

n-3 y n-6. Los resultados muestran que bajos niveles de AGLP-CL n-3, especialmente EPA y DHA en el plasma del cordón umbilical están asociados con el incremento del riesgo de desarrollo de eczema atópico en el primer año de vida. Así también, bajos niveles de la suma del total de AGPI-CL fueron encontrados en el plasma de madres alérgicas, lo que nos indica que la dieta durante el embarazo junto con la transferencia de los ácidos grasos al feto juega un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad.

En la cuarta publicación se analizaron que variantes genéticas de los genes *FADS* y *ELOVL*, tanto de las madres como de sus hijos, influyen en la concentración de ácidos grasos del cordón umbilical como fuente de alimentación del feto, así como las posibles asociaciones con el riesgo de desarrollo de eczema atópico y sibilancias en los niños hasta los 4 años de edad. Los resultados obtenidos indican que las variaciones genéticas de *FADS* y *ELOVL* en las madres y los niños determinan la composición de ácidos grasos en el nacimiento y están asociadas con el desarrollo de eczema atópico y sibilancias.

Finalmente, en la quinta publicación se estudiaron los cambios de expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en la síntesis de los AGPI-CL en niños de 4 años de edad. Los resultados indican que los niños atópicos tienen una baja expresión de los genes que codifican a las enzimas D6D (*FADS2*) y Elongasa-5 (*ELOVL5*). Además, se pudo comprobar que los niveles de DGLA y la actividad enzimática de la enzima D6D están directamente influidos por los cambios de expresión del gen *FADS2*.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis sostienen la hipótesis de que existe una relación causal entre los ácidos grasos plasmáticos de la madre y el niño y el desarrollo de enfermedades atópicas como el eczema atópico, y que además las variantes genéticas de ambos, madre/hijo, juegan un papel crucial en la evolución de la enfermedad.

INTERÉS

II. INTERÉS

La motivación de esta tesis surgió por el insuficiente conocimiento científico actual del efecto de los ácidos grasos, durante la vida fetal y postnatal, sobre el desarrollo de enfermedades atópicas en la primera etapa de la vida, y el Proyecto INMA-Sabadell por su singularidad, ha brindado el contexto perfecto para ello, al ser un estudio prospectivo de cohorte de madres-hijos que fueron controladas desde el inicio del embarazo hasta el parto, y a sus hijos desde el nacimiento hasta los cuatro años de vida.

En los países occidentales se han constatado desde la segunda mitad del Siglo XX cambios en la dieta, siendo la ingesta de grasas la más modificada, como una consecuencia de las medidas de salud pública dirigidas a reducir las enfermedades cardiovasculares, de forma que ha disminuido el consumo de grasas lácteas, fuente de AGT como el **ácido ruménico** y **ácido t-vaccénico**, y ha aumentado el consumo de aceites vegetales parcialmente hidrogenados de origen industrial, fuente de AGT como el **ácido elaídico** y **ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie n-6**. Asimismo, se ha producido un descenso en el consumo de pescados grasos y productos derivados, ricos en **AGPI de cadena larga (AGPI-CL) de la serie n-3**, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) [1-3]. Hoy día, en la dieta occidental, el aporte de ácidos grasos de la serie n-3 suele ser insuficiente, y la ingesta de ácidos grasos de la serie n-6 es mayor de lo aconsejable. Estos cambios en la dieta han producido una modificación en la composición de ácidos grasos en las células de los tejidos humanos a favor de los ácidos grasos de la serie n-6, dando como resultado una mayor capacidad de sintetizar mediadores lipídicos de características proinflamatorias que participan en el proceso alérgico [1, 2]. Estudios epidemiológicos, observacionales y casos-control han investigado la asociación entre el consumo y/o estatus de los AGPI-CL en mujeres gestantes y niños y la incidencia de las enfermedades atópicas, con resultados todavía no concluyentes.

Es importante tener en cuenta que además de la dieta, los niveles de AGPI-CL en los tejidos humanos están influidos por la síntesis *de novo* de los mismos, siendo este proceso controlado por diversas enzimas **desaturasas y elongasas**. Una alteración de cualquiera de estas enzimas, como cambios en la expresión génica, presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), podría provocar modificaciones en la biosíntesis de los AGPI-CL y

consecuentemente tener efectos sobre la composición y el metabolismo de los AG, por tanto, podría tener efectos sobre la salud [4-7].

Por otro lado, poco se conoce sobre la relación o el efecto que pudieran tener otros tipos de ácidos grasos sobre el desarrollo de las enfermedades atópicas ya sea durante el embarazo como en la vida temprana de los niños, tal es el caso de los **AGT**. Se tiene evidencia científica que los AGT pueden tener efectos adversos en diferentes patologías tales como el cáncer, el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular y procesos que cursan con inflamación [8-10]. La mayoría de resultados encontrados han sido establecidos con la suma total de los AGT (principalmente la suma de los isómeros *trans* del ácido oleico y el ácido linoleico), estos estudios no han discriminado entre los AGT procedentes de la producción industrial y los AGT procedentes de fuentes naturales, esta decisión de no discriminar está basada en la asunción de que los AGT de las dos fuentes tienen los mismos efectos biológicos y nutricionales. Sin embargo, en los últimos años, se ha especulado que serían los AGT procedentes de fuentes industriales y no los de fuentes naturales, los que causarían efectos adversos [11-13].

A pesar de los trabajos existentes y debido a la controversia en cuanto a los resultados encontrados, en muchos de ellos se concluye que se requieren más estudios para conocer el papel de los ácidos grasos durante la vida fetal y postnatal en la prevención del desarrollo de las enfermedades atópicas, para posteriormente poder establecer recomendaciones nutricionales a embarazadas y a madres durante la infancia de sus hijos.

En este contexto, la presente tesis parte de la idea de que la composición de AG (AGT y AGPI) así como las variantes genéticas de las enzimas que participan en la biosíntesis de AGPI-CL, tanto en la madre como en el niño, juegan un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades atópicas.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

III. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. Epidemiología de las enfermedades atópicas en la infancia

1.1. Atopía, alergia y enfermedades atópicas

Las definiciones de atopía, alergia y enfermedades atópicas han ido cambiando a lo largo de los años, por eso en 2004 la Organización Mundial de Alergia (WAO, del inglés *World Allergy Organization*) realizó una revisión de los conceptos presentados en 2001 por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EACCI, del inglés *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Organisation*) y estableció una nomenclatura que hoy en día está globalmente aceptada, así la WAO define como **alergia** a “una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos. La alergia puede ser mediada por anticuerpos o células. En la mayoría de los casos, el anticuerpo responsable característico de una reacción alérgica pertenece al isotipo Inmunoglobulina E (IgE), pudiendo decirse que estos pacientes padecen una alergia mediada por IgE”. Por otro lado, **atopía** se define como “la predisposición genética personal y/o familiar, generalmente en la niñez o adolescencia, a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a dosis bajas de alergenos comunes, generalmente proteínas (polen, mohos, caspa animal, ácaros del polvo doméstico, alergenos alimentarios). Como consecuencia, estos sujetos pueden desarrollar síntomas típicos como eczema, asma o rinoconjuntivitis”. Se entiende entonces que la alergia es la expresión clínica de la atopía [14].

Las **enfermedades atópicas** como la alergia alimentaria, eczema atópico (dermatitis atópica), asma y rinitis alérgica se definen entonces como afecciones alérgicas que se asocian con la producción de anticuerpos específicos IgE a alergenos ambientales comunes. El proceso puede o no estar asociado con la inducción de síntomas clínicos, que por sí mismos se caracterizan por la inflamación, que corresponde a la hiperactividad de la piel o de las membranas de las mucosas [15, 16].

Cuando existe la exposición a los alergenos, el sistema inmune responde liberando anticuerpos IgE en la mayoría de los casos, para luchar contra las sustancias que lo

invaden. La IgE regula la liberación de mediadores químicos por los mastocitos y basófilos, dando como resultado trastornos alérgicos. En el proceso se liberan a los tejidos y a la sangre mediadores químicos de naturaleza irritante e inflamatoria (p.ej. histamina, prostaglandinas y leucotrienos). La liberación de estos compuestos puede provocar un aumento de la permeabilidad vascular, la secreción de moco, e inflamación (hinchazón y picazón), y como consecuencia aparecen los síntomas que pueden afectar a diferentes órganos. Así, cuando la piel es el órgano afectado pueden aparecer reacciones de eczema ó dermatitis. Cuando las mucosas de la nariz y/o los ojos se ven afectadas aparecen los síntomas de la rinitis alérgica. Si los pulmones se ven afectados, se desencadenan los síntomas de sibilancias y asma [17].

1.2. Prevalencia de las enfermedades atópicas

El aumento constante en la prevalencia de las enfermedades atópicas se ha ido produciendo a nivel mundial y se ha convertido en un problema de salud pública en los países desarrollados, entre el 30 y el 40 % de la población mundial está afectada por una o más enfermedades atópicas. Este aumento es especialmente importante en los niños, en quienes se observa la mayor tendencia en las últimas tres décadas [18]. Los resultados obtenidos del Estudio Internacional de Asma y Alergia en niños (ISAAC, del inglés *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) realizado en 56 países y con la participación de 463.801 adolescentes de entre 13 y 14 años, indican que la prevalencia de síntomas de, al menos dos de las tres enfermedades, eczema, asma o rinitis varía entre el 0.3 al 18.5% con mayor incidencia en los países occidentales [19].

Las enfermedades atópicas tienen diferentes picos de incidencia en las diferentes edades durante la infancia. El eczema atópico y las alergias alimentarias tienen la incidencia más alta en los 2 primeros años de vida. La sensibilización a alergenios alimentarios es muy frecuente mientras que la sensibilización a los aeroalergenios es poco frecuente en esa época de la vida. En la infancia tardía, la prevalencia de asma, rinitis alérgica y la sensibilización a los aeroalergenios se elevan y disminuyen la dermatitis atópica y las alergias alimentarias (**Figura 1**) [20, 21].

El eczema atópico (EA) es la primera patología en la infancia y comienza a manifestarse en los primeros 6 meses de vida en un 45% de los casos, el 60% en el primer año y el 85%

antes de los primeros 5 años. Sólo un 10% inician la enfermedad después de los 7 años de vida [22-24]. La prevalencia de esta condición varía entre el 7 y el 30% en los niños y entre el 2 y el 10% en adultos en los países industrializados [21, 25]. Se ha estimado que el 30% de los niños con EA desarrollan asma y hasta un 35% desarrollan rinitis alérgica [25].

En España, de acuerdo a los datos presentados por la Academia Española de Dermatología y Venereología (AEDV) se estima que en los últimos 30 años se ha triplicado la incidencia de EA, llegando a afectar hasta un 15% de la población española y más del 90% de los casos se da en los niños [26]. Los resultados obtenidos del Estudio ISAAC en su Fase I indican una incidencia de hasta un 10.3% en los adolescentes españoles de entre 13 y 14 años [27].

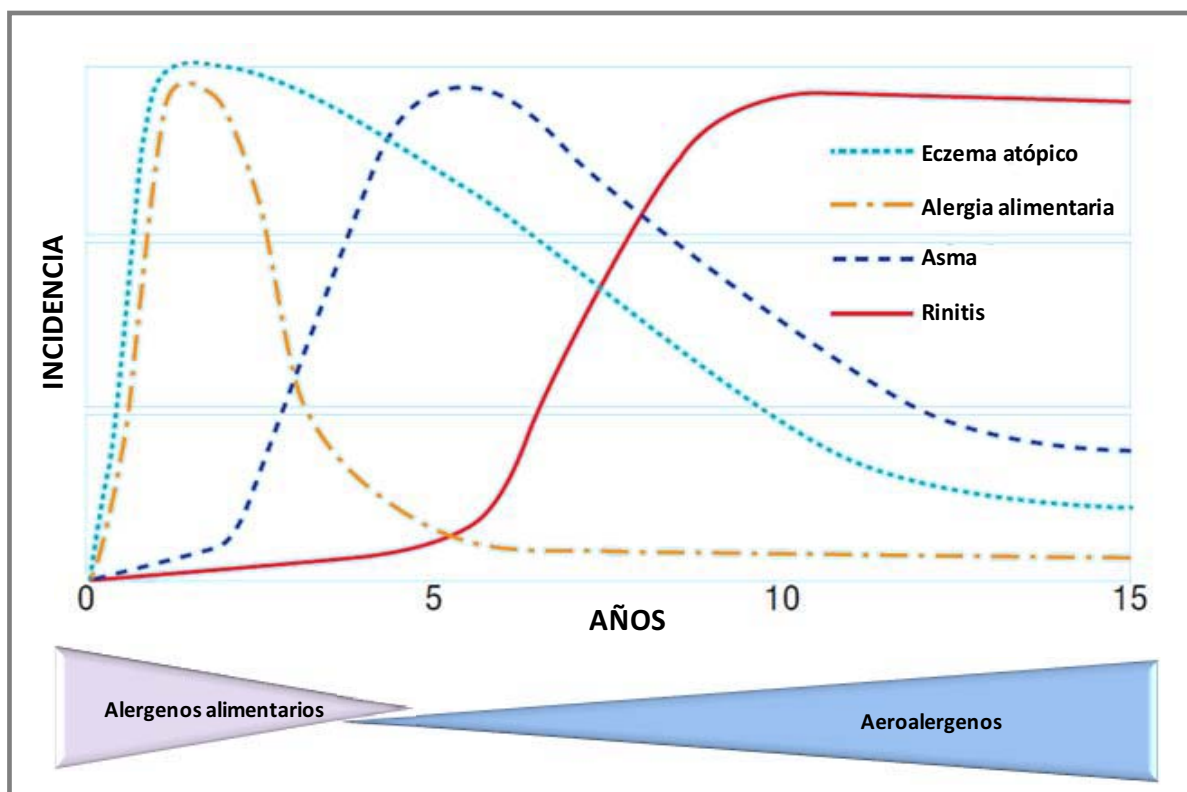


Figura 1. Incidencia de las enfermedades atópicas en la infancia. Adaptada de [20].

Por otro lado, la investigación ISAAC en su Fase III, específicamente desarrollada en diferentes áreas de España presentó los resultados en 2005 sobre la prevalencia de uno de los principales síntomas del asma, las sibilancias, así los datos revelaron que los niños

entre 6 y 7 años mostraron una prevalencia de sibilancias entre el 7.1 y el 12.9% y en los adolescentes entre 13 y 14 años una prevalencia entre el 7.1 y el 15.3% [28, 29].

En conjunto, estos datos muestran que la prevalencia de uno o más síntomas de las enfermedades atópicas es más alta en los niños en la infancia, por tanto, se requieren medidas de prevención para controlar el aumento de estas patologías que se han convertido en una de las primeras causas de consulta de atención primaria.

1.3. Factores que influyen en el desarrollo de las enfermedades atópicas

El eczema, el asma y la rinitis son enfermedades que afectan a la salud pública, pero el conocimiento sobre su historia natural y la interrelación entre estas enfermedades todavía no está claro. Estas patologías constituyen un grupo de enfermedades complejas que resultan del efecto de múltiples **factores genéticos y ambientales** que interactúan en su fisiopatología [30, 31]. Durante los últimos años se ha constatado un progreso considerable en el descubrimiento de la contribución de estos factores a la susceptibilidad de un individuo al desarrollo ulterior y a la severidad de la enfermedad.

Se considera como principal factor de riesgo la **predisposición genética**, que se manifiesta de las líneas hereditarias familiares [30, 32, 33]. Consecuentemente, en los últimos años varios estudios han demostrado que niños con historia familiar de atopía son más propensos a desarrollar cualquier enfermedad atópica [33-37]. También un gran número de estudios genéticos se han llevado a cabo para determinar los componentes genéticos de estas enfermedades y muchos genes han sido identificados [30, 31, 38]. Sin embargo, estudios epidemiológicos y modelos animales sugieren que, además de factores genéticos, la exposición ambiental a principios de la vida son determinantes importantes de la enfermedad en el futuro.

Las modificaciones en la dieta podrían ser un factor crucial dentro de la cadena medioambiental. En los países occidentales se han constatado en las últimas décadas **cambios en la dieta** que han coincidido paralelamente con un incremento de enfermedades atópicas. Uno de los cambios más significativos ha sido en relación a la **ingesta de grasas**. Así se considera que un consumo elevado de alimentos fuente de

ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie n-6 y un bajo consumo de AGPI de la serie n-3 puede provocar una respuesta inmune a favor de la respuesta alérgica y producción de anticuerpos IgE [6, 35, 39, 40].

También se ha planteado que la incidencia de la atopía está relacionada con la ausencia de la exposición durante el embarazo y en la primera infancia a los agentes infecciosos aumentando la susceptibilidad a las enfermedades atópicas, describiéndose como la **“hipótesis de la higiene”** [22, 35].

Las últimas investigaciones justifican la elevada prevalencia de estas patologías también desde el punto de vista epigenético, concretamente descrito por la **“hipótesis epigenética”**, ésta se basa fundamentalmente en el hecho de que durante el embarazo y durante la infancia existe una exposición a factores externos (p.ej. la dieta, alérgenos, contaminantes ambientales) que pueden provocar metilaciones del ADN y modificaciones de las histonas (acetilación y metilación), cambios en la expresión de los genes, que a su vez, pueden ser transgeneracionales [41, 42]. Por tanto, las modificaciones ambientales durante las etapas temprana de la vida pueden ser decisivas en el desarrollo de fenotipo alérgico con un impacto a largo plazo [42, 43].

2. Ácidos grasos y enfermedades atópicas en la infancia

Los ácidos grasos son esenciales para la vida humana y se les ha asociado con diferentes patologías tales como, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular, cáncer y en las últimas décadas también con las enfermedades atópicas, pero todavía con resultados no concluyentes siendo necesarias más investigaciones en este campo.

2.1. Ácidos grasos: estructura, nomenclatura, fuentes y biosíntesis

2.1.1. Estructura y nomenclatura

Químicamente los ácidos grasos (AG) son cadenas hidrocarbonadas de longitud variable que tienen un grupo metílico y uno carboxílico en sus extremos (**Figura 2**) [44]. La longitud de la cadena hidrocarbonada puede variar entre 2 a 30 o más y puede contener dobles enlaces. Así, los AG pueden clasificarse en base a dos criterios principales [44, 45]:

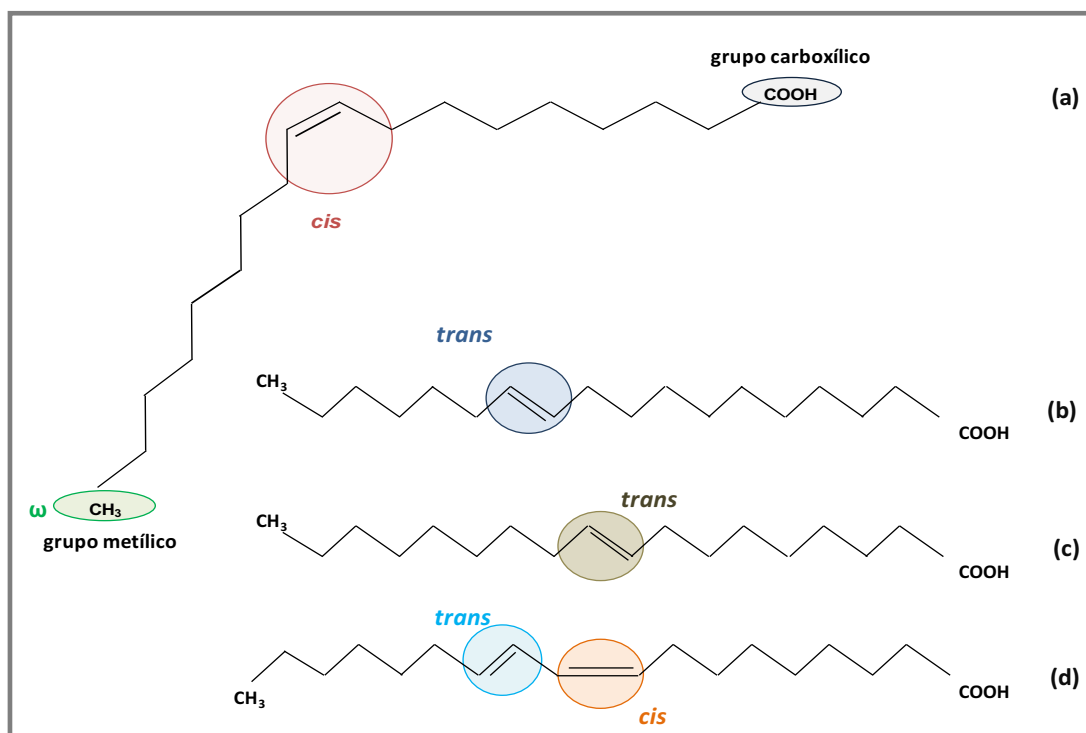


Figura 2. Estructura y nomenclatura de los ácidos grasos **(a)** Oléico (C18:1 n-9; c9-C18:1), **(b)** *t*-vaccénico (*t*11-C18:1), **(c)** Elaídico (*t*9-C18:1) y **(d)** Ruménico (*c*9,*t*11-CLA).

- a.** *En función del número de átomos de carbono que constituyen su cadena:* se clasifican como ácidos grasos de cadena corta (2-4 carbonos), de cadena media (6-12 carbonos), de cadena larga (14-22 carbonos) y de cadena muy larga (24 o más carbonos).
- b.** *En función de su grado de insaturación:* Se distinguen los ácidos grasos saturados (AGS), moléculas que no contienen dobles enlaces, los ácidos monoinsaturados (AGMI) con uno doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que tienen dos o más dobles enlaces.

La presencia de los dobles enlaces en los AG insaturados permite la isomería en torno al doble enlace, indicada como *cis* o *trans*. En la mayoría de AG la orientación de los dobles enlaces es usualmente *cis* (los dos átomos de hidrógeno en los átomos de carbono adyacentes al doble enlace están situados al mismo lado de la cadena de carbono, lo que da como resultado en una forma curvada y en un estado líquido a temperatura ambiente), respecto a la configuración *trans* (los átomos de hidrógeno en los átomos de carbono adyacentes al doble enlace están en lado opuestos, lo que da como resultado en una forma

lineal y un estado sólido a temperatura ambiente). Esta orientación es importante respecto a la libre rotación y flexibilidad de la molécula. Se distinguen también ácidos grasos insaturados *trans* (AGT), que pueden presentar más de un doble enlace en configuración *trans* [44, 46].

La nomenclatura planteada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*) para nombrar a los AG es precisa y técnicamente clara; sin embargo, resulta ser bastante compleja y difícil de recordar [47]. Por ejemplo, el ácido oleico con este sistema se llamaría *cis*-9-octadecenoico, por tener 18 carbonos, un doble enlace en la posición 9 a partir del extremo carboxílico y en configuración *cis*. Por eso, hoy en día se utiliza ampliamente una nomenclatura más corta para su identificación (**Tabla 1**). Ésta se basa en dar el número de átomos de carbono seguido de dos puntos y el número de dobles enlaces, la localización de los dobles enlaces se designa con la letra ω ó n (“ ω ” ó “ n ” se refiere a la posición del primer doble enlace en la cadena principal de carbonos del ácido graso desde el extremo metilo de la molécula). Así, los ácidos grasos insaturados se clasifican en familias o series en función de la posición del primer doble enlace: los ω -9 ó n -9, ω -7 ó n -7, ω -6 ó n -6 y ω -3 ó n -3. Con este sistema el ácido oleico se describe como C18:1 n -9 (ó ω -9).

Además de estas dos nomenclaturas, frecuentemente los AG se identifican por sus nombres comunes, identificación que no responde a un criterio químico sino que puede hacer referencia a su origen o a alguna característica del mismo; por ejemplo el ácido oleico proviene de la palabra del latín *oleic* (oleico, oliva).

2.1.2. Fuentes alimentarias y biosíntesis endógena

La mayoría de ácidos grasos provienen principalmente de la dieta; sin embargo, algunos pueden sintetizarse también *de novo* en el organismo humano. El hígado es el principal órgano de síntesis seguido de la glándula mamaria y el tejido adiposo [48, 49].

2.1.2.1. Ácidos grasos poliinsaturados

Los **AGS** se sintetizan en el citoplasma celular a partir del Acetil-CoA, metabolito procedente principalmente de la degradación de la glucosa así como de algunos aminoácidos.

Tabla 1. Nombres de los principales ácidos grasos analizados en muestras biológicas.

Ácido graso	Serie	Nombre común	Nombre sistemático (IUPAC)
AGS			
C14:0		Mirístico	Tetradecanoico
C16:0		Palmítico	Hexadecanoico
C18:0		Estearico	Octadecanoico
C20:0		Aráquico	Eicosanoico
C22:0		Behénico	Docosanoico
C24:0		Lignocérico	Tetracosanoico
AGMI			
C16:1	n-7	Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecaenoico
C16:1	n-7	Palmitelaídico	<i>trans</i> -9-hexadecaenoico
C18:1	n-9	Oleico	<i>cis</i> -9-octadecaenoico
C18:1	n-9	Elaídico	<i>trans</i> -9-octadecaenoico
C18:1	n-7	<i>t</i> -vaccénico	<i>trans</i> -11-octadecaenoico
C20:1	n-11	Gadoleico	<i>cis</i> -9-eicosaenoico
C20:1	n-9	Gondoico	<i>cis</i> -11-eicosaenoico
C22:1	n-9	Erúcido	<i>cis</i> -13-docosaenoico
C24:1	n-9	Nervónico	<i>cis</i> -9-tetracosanoico
AGPI			
C18:2	n-6	Linoleico (LA)	<i>cis</i> -9, 12-octadecadienoico
C18:2	n-6	Ruménico (RA/ CLA)	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-octadecadienoico
C18:3	n-3	α -linolénico (ALA)	<i>cis</i> -,12,15-octadecatrienoico
C18:3	n-6	γ -linolénico (GLA)	<i>cis</i> -6, 9,12-octadecatrienoico
C18:4	n-3	Estearidónico (SA)	<i>cis</i> -6, 9,12,15-octadecatetraenoico
C20:2	n-6	Eicosadienoico (EDA)	<i>cis</i> -11,14-eicosadienoico
C20:3	n-6	Dihomo- γ -linolénico (DGLA)	<i>cis</i> -8, 11,14-eicosatrienoico
C20:3	n-9	"Mead"	<i>cis</i> -5, 8,11-eicosatrienoico
C20:4	n-6	Araquidónico (AA)	<i>cis</i> -5, 8,11,14-eicosatetraenoico
C20:4	n-3	Eicosatetraenoico (ETA)	<i>cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoico
C20:5	n-3	Eicosapentaenoico (EPA)	<i>cis</i> -5, 8,11,14,17-eicosapentaenoico
C22:4	n-6	Adrénico (A/DTA)	<i>cis</i> -7, 10,13,16-docosatetraenoico
C22:5	n-6	"Osbond"	<i>cis</i> -5, 8,11,14-eicosatetraenoico
C22:5	n-3	Clupanodónico (DPA)	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico
C22:6	n-3	Cervónico (DHA)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico

AGS (Ácidos Grasos saturados). AGMI (Ácidos Grasos Monoinsaturados). AGPI (Ácidos Grasos Poliinsaturados) LA (del inglés *Linoleic Acid*). RA (del inglés *Rumenic Acid*). ALA (del inglés *Alpha-linolenic Acid*). GLA (del inglés *Gamma Linolenic Acid*). SA (del inglés *Stearidonic Acid*). EDA (del inglés *Eicosadienoic Acid*). DGLA (del inglés *Dihomo-Gamma-linolenic*). AA (del inglés *Arachidonic Acid*). ETA (del inglés *EicosaTetraenoic Acid*). EPA (del inglés *EicosaPentaenoic Acid*). A (del inglés *Adrenic Acid*). DPA (del inglés *DocosaPentaenoic Acid*). DHA (del inglés *DocosaHexaenoic Acid*). Adaptada de [47, 49, 50].

El principal AG producido es el ácido palmítico (C16:0). A partir de él y a través de rutas metabólicas en las que participan diferentes enzimas desaturadas y elongadas se sintetizan los AGS de mayor longitud de cadena y los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-7 y n-9. Las principales fuentes de AGS son los productos de origen animal tales como, la carne, la leche, queso y mantequilla. Algunos **AGMI** como el ácido oleico pueden ser sintetizados a partir los AGS, tal como se explicó anteriormente o suministrarse a través de la dieta, siendo su principal fuente el aceite oliva [48].

Por otra parte, los humanos no podemos insertar dobles enlaces en los carbonos anteriores al carbono 7 (contando desde el carbono metilo terminal), porque carecemos de las enzimas $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturadas, enzimas que facilitan la inserción de los dobles enlaces en las posiciones n-3 y n-6, por tanto, no somos capaces de sintetizar AGPI de las series n-3 y n-6. Por eso, el ácido graso linoleico (C18:2 n-6, LA) y α -linolénico (C18:3 n-3, ALA) son considerados ácidos grasos esenciales (**AGE**) para los humanos y debemos ingerirlos a través de la dieta. LA se encuentra principalmente en los aceites vegetales, como el aceite de girasol, de maíz y de soja y productos derivados de estos aceites como las margarinas; mientras que ALA se encuentra primordialmente en el aceite de soja y colza, en algunos frutos secos y en la linaza. El consumo de estos dos AG contribuye hasta el 95 % de la ingesta de AGPI en las dietas occidentales, siendo más alto el consumo de LA respecto a ALA [44, 45].

A partir de los AGE se pueden sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) de las series n-3 y n-6. Esta síntesis ocurre en las membranas del retículo endoplasmático e incluye etapas de desaturación y elongación. En una primera etapa LA es metabolizado hasta ácido γ -linolénico (18:3n-6, GLA), la enzima **$\Delta 6$ -desaturasa (D6D)** cataliza esta primera conversión. En una segunda etapa la enzima **Elongasa 5**, inserta en la cadena carbonada un par de carbonos y se sintetiza el ácido dihomo- γ -linolénico (C20:3 n-6, DGLA), éste a su vez por acción de la enzima **$\Delta 5$ -desaturasa (D5D)** se convierte en ácido araquidónico (C20.4 n-6, AA) hasta finalmente llegar a formar el ácido adrenico (C22:4 n-6, A) por acción de la Elongasa-5 (puede actuar también la Elongasa-2 dependiendo del órgano donde se realice la síntesis). Por etapas análogas catalizadas por las mismas enzimas el ALA puede llegar a formar el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y el ácido clupanodónico (C22:5 n-3, DPA).

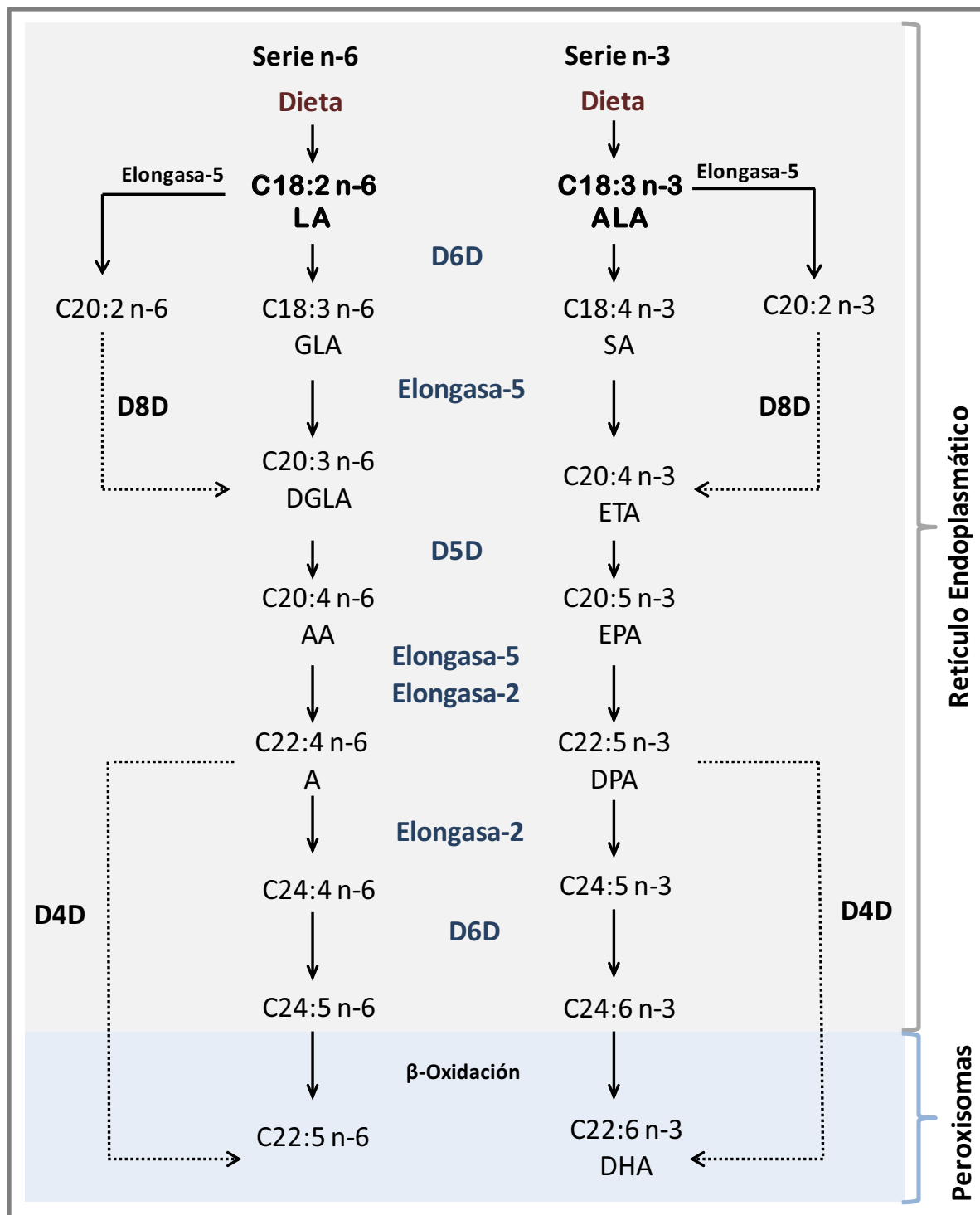


Figura 3. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) de las series n-6 y n-3. Las líneas discontinuas representan vías no conocidas en humanos. D6D ($\Delta 6$ -desaturasa); D5D ($\Delta 5$ -desaturasa). D4D ($\Delta 4$ -desaturasa), D8D ($\Delta 8$ -desaturasa). LA (ácido linoleico). GLA (ácido γ -linolénico). DGLA (ácido dihomo- γ -linolénico). AA (ácido araquidónico). A (ácido adrenico). ALA (ácido α -linolénico). SA (ácido estearidónico). ETA (ácido eicosatetraenoico). EPA (ácido eicosapentanoico). DPA (ácido docosapentaenoico). DHA (ácido docosaheptaenoico).

Ambos α -linoléico y clupanodónico sufren finalmente un proceso de elongación, desaturación, y β -oxidación (en los Peroxisomas) para acabar formando el ácido eicosapentaenoico (C22:5 n-6) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) (**Figura 3**) [7, 44, 51]. Dado que las elongasas y desaturasas pueden actuar indistintamente sobre los ácidos grasos de cualquiera de las series en las etapas correspondientes, se establece una competencia entre series. La enzima D6D tiene una mayor afinidad por el ALA respecto a LA; sin embargo, la ingesta elevada de LA resulta en concentraciones altas de LA y concentraciones bajas de ALA en los lípidos de los tejidos y se produce una conversión preferencial por los AGPI-CL n-6 [2, 45].

Algunos AGPI-CL también pueden ser ingeridos a través de la dieta; sin embargo, es mucho menor que la ingesta de LA y ALA. EL GLA y DGLA se encuentran en algunos aceites vegetales, sin embargo la ingesta de éstos a partir de la dieta es inferior a 10 mg/días. El AA, se encuentra fundamentalmente en la mayoría de tipos de carne y huevos, y su ingesta aproximada es de 50-5000 mg/día. Por otro lado, EPA, DPA y DHA se obtienen de los productos marinos, especialmente pescado azul (atún, salmón, caballa, arenque y sardina). Una comida a base de pescado aporta entre 1.5 y 3.5 gramos de estos AGPI n-3. En ausencia de consumo de pescado, la ingesta de estos AG es inferior a 100 mg/día [45, 49].

Debe existir un balance entre el consumo de los ácidos grasos n-3 y n-6, ya que un exceso en cualquiera de estos ácidos grasos afecta el metabolismo del otro, reduciendo su incorporación a los tejidos y alterando sus efectos biológicos.

Lo ideal para conseguir efectos beneficiosos para la salud sería mantener una relación n-6:n-3 en la dieta de 5-10:1; sin embargo, en la actualidad la dieta es muy alta en ácidos grasos n-6, llegando a registrarse ratios de hasta 20-30:1 en algunos países occidentales. Esta relación está dada por una baja ingesta de pescado y otros alimentos ricos en AGPI n-3 y por un elevado consumo de alimentos ricos en ácidos grasos n-6 [44, 51].

2.1.2.2. Ácidos grasos *trans*

Los humanos tampoco somos capaces de introducir dobles enlaces en configuración *trans* en la cadena carbonada del AG, por eso los AGT sólo pueden ser incorporados a nuestro organismo a través de la dieta [52, 53]. Se distinguen dos fuentes principales de AGT:

- a. Derivados de **fuentes industriales**, donde se incluyen aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVO, del inglés *Partial Hydrogenation Vegetables Oils*) y los productos en cuya composición se incluyen estos aceites (p. ej. mantecas, margarinas, productos de bollería).
- b. Derivados de **fuentes naturales**, se distinguen los AG presentes de forma natural en animales rumiantes y sus derivados (carne y productos lácteos). Los AGT se forman en el rumen de los animales por hidrogenación microbiana a partir de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces en configuración *cis*.

Las grasas industriales y las de origen natural contienen los mismos AGT, pero en proporciones diferentes, así el contenido de AGT en grasas hidrogenadas puede representar hasta el 60% del contenido de ácidos grasos, mientras que el contenido de AGT en grasas de rumiantes es considerablemente menor, entre el 2 y el 5% del total de ácidos grasos. El grupo más abundante de AGT en la dieta humana es el grupo de isómeros *trans* del ácido oleico. En la grasa de fuente industrial el **ácido elaídico** (*t9*-C18:1) y el *trans*-10-octadecenoico son los AG predominantes, mientras que en la grasa de fuente natural es el **ácido t-vaccénico** (*t11*-C18:1) [10, 54].

En los alimentos derivados de los rumiantes aparece un tipo de AGT especial, denominado ácido linoleico conjugado (CLA, del inglés *Conjugated Linolenic Acid*). El término CLA se utiliza para designar al conjunto de isómeros de posición y geométricos del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados y que están situados en carbonos adyacentes. Se han detectado más de 20 isómeros distintos del CLA en grasas de rumiantes siendo el **c9t11-CLA** ó **ácido ruménico** (RA, del inglés *Rumenic Acid*) el isómero más abundante (representa hasta el 80% del total de CLA en los alimentos, **Figura 2**) [55-57].

Los isómeros del CLA son producidos de forma natural como productos intermediarios de la biohidrogenación del LA y/o ALA en el rumen de los rumiantes, principalmente por acción de dos grupos de bacterias: *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Megasphaera elsdenii*; lo que da lugar de forma mayoritaria al isómero **c9t11-CLA** y, en menor proporción, a un amplio espectro de isómeros geométricos y posicionales del CLA [58]. La posterior hidrogenación de este isómero produce *trans*11-C18:1 o ácido *t*-vaccénico. A partir del

ácido *t*-vaccénico, una serie de transformaciones adicionales por reductasas microbianas eliminan los dobles enlaces hasta producir una cadena completamente saturada, lo que conduce a la acumulación del ácido esteárico en el contenido intestinal de los rumiantes. El proceso de biohidrogenación se lleva a cabo de forma incompleta, ya que de otra forma sólo se acumularían AGS. La elevada proporción de ácido ruménico en la leche de rumiantes no proviene únicamente de la producción en el rumen.

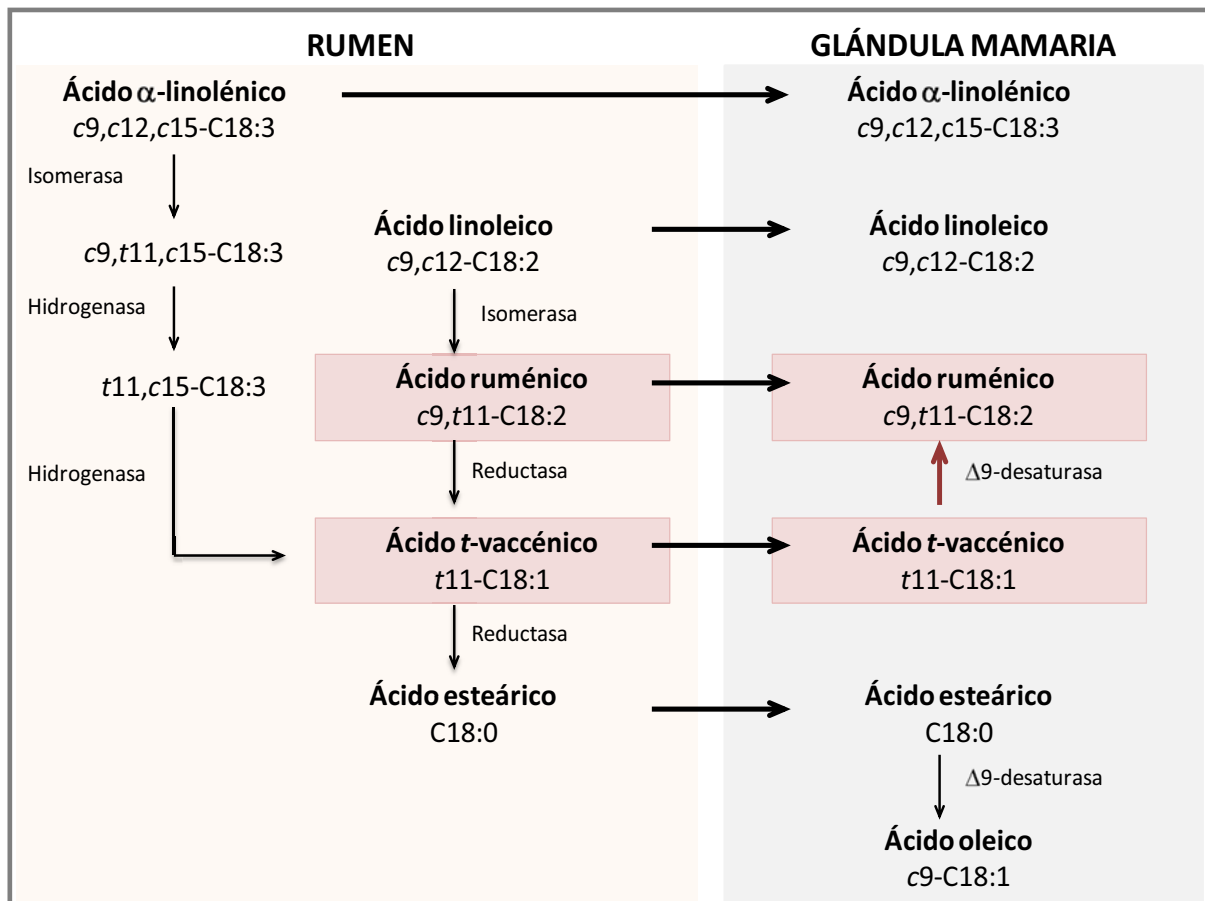


Figura 4. Ruta de síntesis del ácido ruménico (*c9t11*-CLA) en el rumen y en la glándula mamaria de rumiantes. Adaptada de [57].

Se ha demostrado que tanto en animales rumiantes como en el organismo humano, principalmente en la glándula mamaria, el ácido *t*-vaccénico puede convertirse en ácido ruménico por acción de la enzima Δ 9-desaturasa. (Figura 4) [55-57, 59]. Sin embargo, en los humanos, el ácido ruménico presente en el plasma, tejidos y leche proviene mayoritariamente de la dieta [58]. Ambos, ácido *t*-vaccénico y el ácido ruménico constituyen los AGT predominantes en la grasa natural, y son considerados como marcadores de la ingesta de la grasas de fuentes naturales.

Modelos animales y estudios *in vitro* han demostrado que varios metabolitos pueden ser sintetizados a partir del CLA, manteniendo siempre la misma estructura conjugada (CD, del inglés *Conjugated Diene*), así se han detectado metabolitos como el ácido octadecatrienoico conjugado (CD 18:3), el ácido eicosatrienoico conjugado (CD 20:3) y el ácido eicosatetraenoico conjugado (CD 20:4). Estos AG son sintetizados también mediante la acción de las mismas enzimas que participan en la biosíntesis de AGPI-CL (D5D, D6D y Elongasas) [60-62].

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

Durante el embarazo el feto puede sintetizar *de novo* algunos AGS y AGMI utilizando la glucosa como sustrato. Teniendo en cuenta que la placenta carece de actividad D5D y D6D para la conversión de los AGE a AGPI-CL y que el feto solo presenta una limitada actividad desaturasa, la mayor parte de los AGPI son suministrados desde la madre hacia el feto vía transferencia placentaria [63, 64]. Es por eso que se considera a los AGPI-CL como nutrientes condicionalmente esenciales en la vida fetal.

Los ácidos grasos atraviesan la placenta en forma de ácidos grasos libres (AGL) y éstos pueden ser obtenidos de forma directa del torrente sanguíneo de la madre o mediante la acción de algunas enzimas lipasas que los liberan de los triglicéridos (lipoproteinlipasa (LPL, del inglés *Lipoprotein Lipase*)) y de los fosfolípidos (lipasa endotelial (EL, del inglés *Endothelial Lipase*)) de las lipoproteínas maternas. Una vez que los ácidos grasos han sido liberados por las lipasas y se encuentran en sus formas libres pueden atravesar el tejido placentario mediante difusión pasiva o bien a través de un mecanismo más complejo mediado por proteínas transportadoras que se encuentran ubicadas en las microvellosidades o en las membranas de las células trofoblásticas y en las membranas endoteliales de los capilares fetales (**Figura 5**) [63-65].

Las proteínas más importantes envueltas en el transporte de los AGL son la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36, del inglés *Fatty Acid Translocase*), proteína transportadora de ácidos grasos con actividad Acyl-CoA-sintetasa (FATP, del inglés *Fatty Acid Transport Protein*) y la proteína de unión de ácidos grasos de la membrana placentaria (p-FABPpm, del inglés *Placental Membrane Fatty Acid-binding Protein*) [63-65]. También el tejido placentario expresa receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *Low*

Density Lipoproteins) y de alta densidad (HDL, del inglés *High Density Lipoproteins*), que permiten su transporte hacia el feto y por acción de lipasas intracelulares como la Fosfolipasa A₂ (PLA₂, del inglés *Phospholipase A₂*) liberar AGL [64].

Las lipasas de lipoproteínas se expresan también en el feto, por tanto, los AGL pueden volver a ser re-esterificados y depositarse como triglicéridos para su posterior liberación y transporte en la circulación fetal [66].

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la absorción y transferencia preferencial de la placenta por AGPI-CL con respecto a otros AG, especialmente el DHA (el orden de preferencia DHA>AA>ALA>LA) [67-70]. Además de su papel en la transferencia de ácidos grasos al feto, se cree que la placenta es capaz de modular su aporte en función de las demandas del feto. (p.ej. las demandas de DHA y AA son altas en el último trimestre del embarazo).

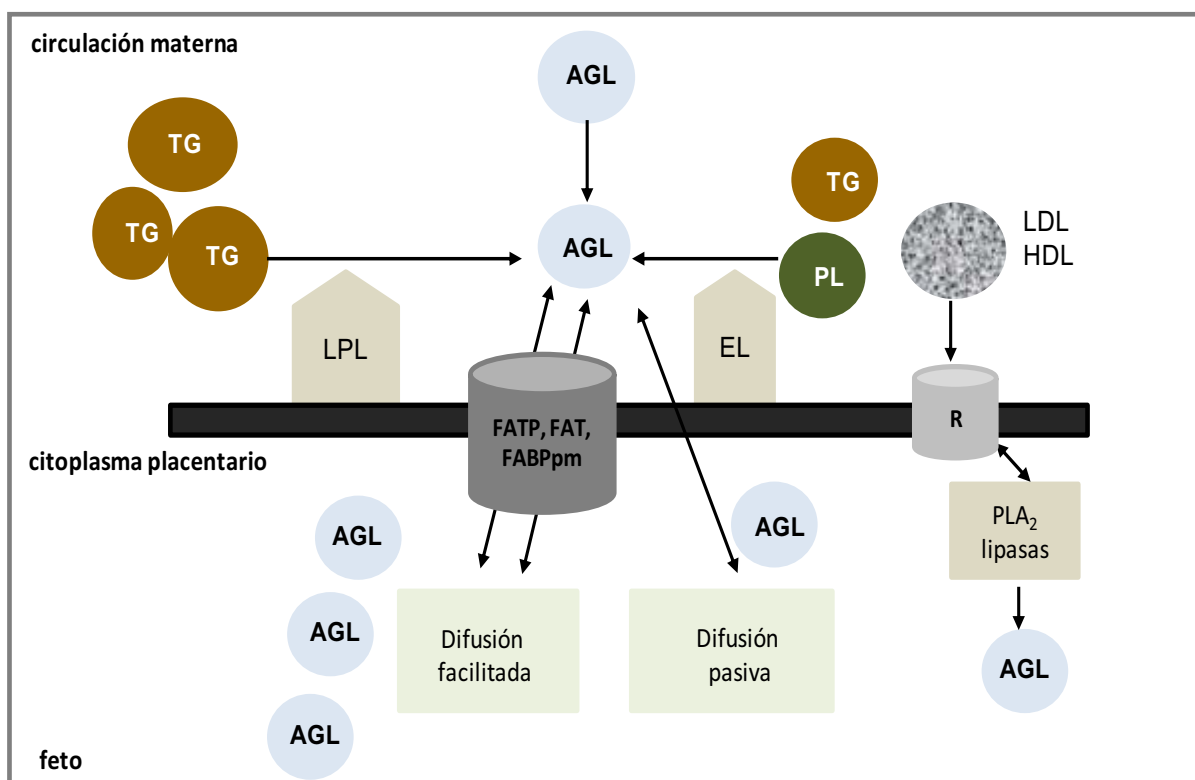


Figura 5. Transporte de los ácidos grasos a través de la placenta de la madre hacia el feto. TG (Triglicéridos). PL (Fosfolípidos). AGL (Ácidos grasos libres). LPL (Lipoproteinlipasa). EL (Lipasa endotelial). R (Receptores). PLA₂ (Fosfolipasa A₂). FATP (Proteína transportadora de ácidos grasos con actividad Acyl-CoA-sintetasa). FAT (Translocasa de ácidos grasos). FABPpm (Proteína de unión de ácidos grasos de la membrana placentaria). Adaptada de [64].

Los AGE y sus AGPI-CL son de importancia crítica en el crecimiento y desarrollo fetal y éstos dependen casi exclusivamente de la ingesta dietética de la madre durante el embarazo. El AA y DHA son esenciales para el desarrollo de muchos órganos y células durante la vida fetal, son constituyentes esenciales de los fosfolípidos las membranas celulares, son particularmente importantes para el desarrollo del cerebro y la retina (el DHA representa entre un 3 y un 5% del peso en seco del cerebro y la retina) y son componentes estructurales del sistema nervioso [65, 71, 72].

El crecimiento del cerebro humano alcanza su velocidad máxima en los últimos tres meses de la gestación y los primeros meses después del nacimiento, lo que lleva al concepto de que el tercer trimestre del feto y el recién nacido son particularmente vulnerables a los déficits de desarrollo si el DHA es limitante [72]. Una deficiencia dietética en estos ácidos grasos en momentos críticos de la organogénesis embrionaria puede ser devastadora, especialmente en el desarrollo neurológico. Además, el AA es precursor de mediadores lipídicos bioactivos (p.ej. prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) que pueden modular la respuesta inmunológica del feto antes del parto y consecuentemente producir trastornos alérgicos [70].

A pesar de que se ha comprobado la preferencia del transporte de los AGPI-CL, se conoce que **el feto está expuesto también a AGT** y que éstos atraviesan la placenta hacia la circulación sanguínea fetal [73-75]. El efecto potencial de que los AGT puedan alterar el metabolismo de los AGE, tiene gran importancia en el periodo perinatal de mayor crecimiento neuronal y diferenciación del organismo. Durante este periodo, el organismo en crecimiento necesita grandes cantidades de AA y DHA, como se indicó anteriormente, para la construcción de los tejidos y en primer lugar para la construcción de los tejidos neuronales. Modelos animales, han demostrado que a diferencia de la sangre y el hígado, el cerebro parece estar protegido de la acumulación de AGT, pero todavía no existen datos para recién nacidos humanos [73, 74].

Por otro lado, estudios con mujeres sanas embarazadas han demostrado que las concentraciones de AGT (incluido el CLA), así como de LA, ALA, AA y DHA en los lípidos del plasma materno están positivamente correlacionadas con los niveles de los mismos ácidos grasos en el plasma del niño y del cordón umbilical en el momento del parto [76-78], sugiriendo así que el transporte materno-fetal, y por tanto la exposición fetal es

dependiente de la concentración de estos ácidos grasos en el plasma materno y por tanto de la ingesta dietética.

Se desconoce todavía los mecanismos por los que los AGT atraviesan el tejido placentario, lo que sugiere la ausencia de mecanismos de regulación para proteger al bebé en el desarrollo de los efectos adversos de una ingesta materna elevada de AGT. Se conoce que el periodo de embarazo es relativamente más corto cuando la madre tiene un alto consumo de AGT en comparación a un embarazo a término que se registra cuando las madres tienen un alto consumo de AG n-3 [10].

Se necesitan más investigaciones en seres humanos para establecer definitivamente las posibles consecuencias fisiológicas de la ingesta de AGT en el periodo fetal, especialmente estudios en los que se diferencie la ingesta de los AGT de las fuentes naturales e industriales ya que hasta el momento los estudios realizados son mínimos.

2.2. Ácidos grasos: proceso inflamatorio y atopía

La ingesta de AG en la dieta comporta la incorporación de éstos en todas las células del organismo, por lo que intervienen en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre ellos los del sistema inmunitario y, por tanto, influyen en la respuesta inmunitaria. Los efectos biológicos los AGPI están determinados principalmente por la disponibilidad de los **AGPI-CL**, tales como el AA, EPA y DHA. Estos ácidos grasos han demostrado tener importantes funciones en el metabolismo humano, tales como: son importantes como fuente de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares (regulan la integridad y fluidez de la membrana), como moléculas de señalización y como reguladores de la expresión génica (**Figura 6**). A través de esta variedad de mecanismos, los AG pueden modificar la funcionalidad de las células del cuerpo humano [79-81].

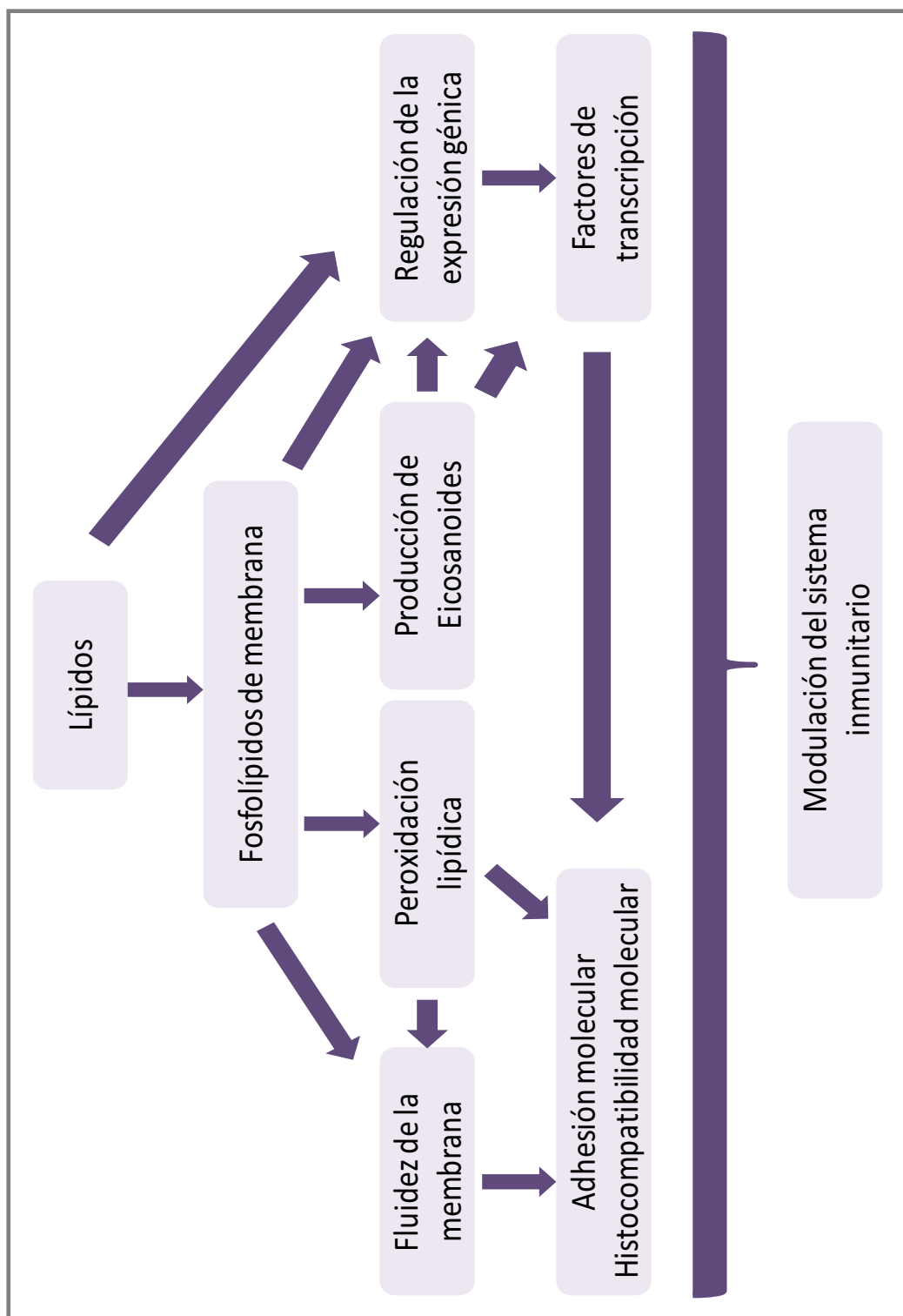


Figura 6. Mecanismos de acción implicados en el efecto de los AGPI sobre la respuesta inmunitaria. Adaptada de [81]

2.2.1. Efectos sobre la síntesis de mediadores lipídicos

Los **AGPI-CL** son precursores en la formación de mediadores bioactivos denominados eicosanoides y docosanoides; estos compuestos están implicados en la modulación de la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria, y hasta el momento se conoce que este es el enlace directo entre los AGPI y los procesos inmunológicos relacionados con la atopía [7, 51, 80, 82]. Existe evidencia de que los AGPI-CL tienen un rol muy importante en la programación del sistema inmune y el desarrollo de las enfermedades atópicas en los niños, aunque el mecanismo biológico no está del todo claro [51, 83].

Los eicosanoides son una familia de derivados oxigenados generados principalmente a partir de DGLA, AA y EPA que incluyen prostaglandinas (PGs), Prostaciclina (PCs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE), hidroxieicosatetraenoicos (HETE) y Lipoxinas (LX), mientras que las resolvinas y protectinas son generados del EPA y DHA [82]. Estos mediadores lipídicos son producidos por la acción de las enzimas: Fosfolipasa A₂ (PLA₂), ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y lipooxigenasas (LOX-5 y LOX-15) (**Figura 6**)[84, 85]. Las PGs se producen en prácticamente en todas las células del cuerpo humano; sin embargo, los LTs son sintetizados principalmente en las células del sistema inmunitario (p.ej. macrófagos, leucocitos, mastocitos). Tras la activación celular de mastocitos o macrófagos por la IgE, se produce la biosíntesis de LTs [82].

Los fosfolípidos de membrana de las células contienen altas proporciones de AGPI de la serie n-6, especialmente AA y bajas concentraciones de otros AGPI (esta distribución de AG se encuentra especialmente en las células del sistema inmunitario). Por tanto, el AA es usualmente el mayor sustrato en la síntesis de los eicosanoides [51, 86]. El AA es el principal sustrato para la síntesis de las PGs y TXs de la serie 2 (vía enzimas COX), LTs de la serie 4 (vía LOX-5) y HETE y HEPTE de la serie 5, y LX de la serie 4 [86, 87]. Los eicosanoides, principalmente PGE₂ y LTB₄, modulan la intensidad y duración de los procesos inflamatorios. La PGE₂ posee efectos proinflamatorios, ya que induce la fiebre, aumenta la permeabilidad vascular y causa vasodilatación, además es uno de los principales eicosanoides producidos por las células inmunitarias, participa promoviendo la formación de IgE por los linfocitos B y, por tanto, aumentando la respuesta inflamatoria [88, 89].

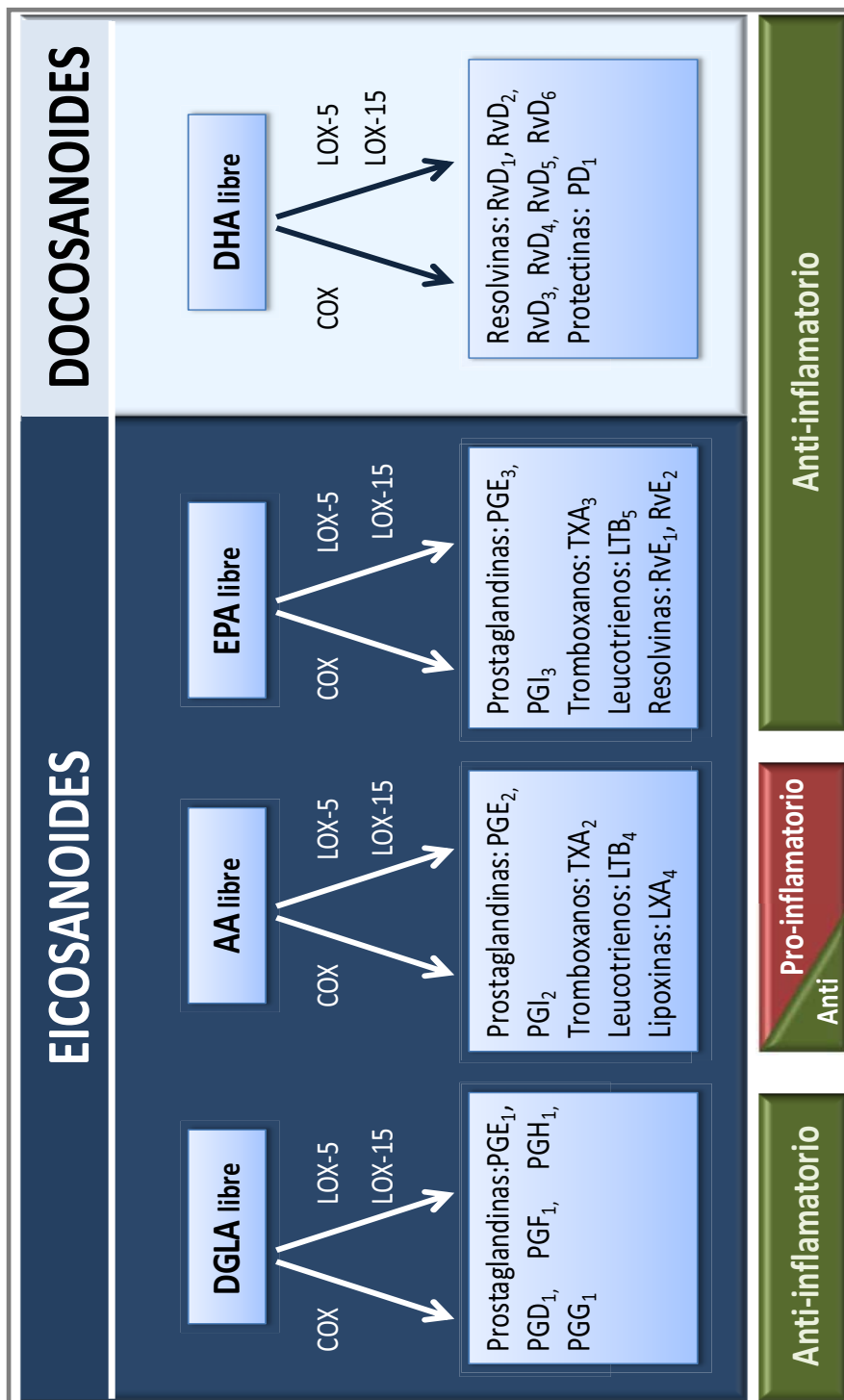


Figura 7. Biosíntesis de los mediadores lipídicos: Eicosanoides y Docosanoides a partir de AGPI-CL. Adaptada de [7].

La PGE₂ produce también en las células cutáneas (queratocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos) y está íntimamente relacionada con la inflamación de la piel, además está involucrada con la proliferación y diferenciación de los queratocitos, teniendo consecuencias en la función de barrera de la epidermis [90, 91]. Sin embargo, se ha encontrado que la PGE₂ puede también tener efectos antiinflamatorios, ya que se ha demostrado en estudios *in vitro* que puede inhibir la producción de dos clásicas citocinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1(IL-1) producidas por los monocitos y macrófagos, además puede actuar inhibiendo a la enzima LOX-5 disminuyendo la producción de leucotrienos de la serie 4 y activando a la LOX-15 promoviendo la formación de lipoxinas que tienen efectos antiinflamatorios [80, 89].

Por otro lado, los LTs de la serie 4 (LTB₄, LTC₄ y LTE₄) son producidos por las células que median la inflamación pulmonar en el asma (p.ej. mastocitos) y se cree que son los principales mediadores de la broncoconstricción asmática [89]. El LTB₄ es un agente quimotáctico de leucocitos, que induce la liberación de enzimas lisosomales, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a diferencia de la PGE₂, estimula la producción de citocinas proinflamatorias [80, 82, 89].

En general, los eicosanoides derivados del AA presentan efectos proinflamatorios, como se describe en la **Tabla 2**, por lo que se ha llegado a sugerir que existe un nexo causal entre el aumento de la ingesta de los AGPI n-6 y la incidencia y prevalencia de las manifestaciones clínicas de la atopía, y este vínculo está medido por la síntesis del AA y el potencial para producir eicosanoides proinflamatorios (**Figura 7**). Diferentes estudios epidemiológicos han confirmado y apoyado esta hipótesis [1, 35, 92-94].

Se ha observado que algunos eicosanoides derivados del DGLA poseen propiedades antiinflamatorias que ayudan a reducir la sintomatología en casos de eczema tópico. De manera especial se distingue a la PGE₁, que inhibe la producción de leucotrienos de la serie 4 [95-97]. Una baja síntesis de PGE₁ está relacionada con un incremento de pérdida de agua transepidermal (TEWL, del inglés *Transepidermal water loss*) y un incremento de las reacciones inflamatorias [98, 99]. Además, a la PGE₁ se le atribuyen propiedades de inhibición del crecimiento y diferenciación de células cancerígenas [98, 100].

Tabla 2. Efectos fisiológicos de los principales mediadores lipídicos producidos a partir de los AGPI-CL.-

Mediador lipídico	Efecto
PGE ₁	Antiagregante. Inhibe la liberación de histamina.
PGD ₂	Broncoconstrictor, promueve la permeabilidad vascular, activa los eosinófilos y la respuesta Th2.
PGE ₂	Vasodilatador, incrementa la permeabilidad vascular, promueve la producción IgE por los linfocitos B y la producción de citocinas por los linfocitos Th2.
	Inhibe la producción de citocinas Th1, inhibe la actividad de la LOX-5. Induce la producción de lipoxina A ₄ .
PGI ₂	Suprime la actividad Th2 y el reclutamiento de eosinófilos.
TXA ₂	Broncoconstrictor y estimula la liberación de acetilcolina.
LTB ₄	Quimiotáctico de leucocitos. Incrementa la permeabilidad vascular. Induce la liberación de enzimas lisosomales, ROS y citocinas inflamatorias. Promueve la producción de IgE por los linfocitos B.
LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Vasoconstrictores o vasodilatadores. Causan la contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento de eosinófilos, promueven la secreción de moco.
RvE ₁	Reducción del dolor. Inhibición de la expresión de genes proinflamatorios. Regulación selectiva de plaquetas y leucocitos.
PD ₁	Reduce la inflamación promoviendo la apoptosis de los linfocitos T. Ejerce acciones neuroprotectoras.

PGE₁ (Prostaglandina E₁). PGD₂ (Prostaglandina D₂). PGE₂ (Prostaglandina E₂). PGI₂ (Prostaglandina I₂).TXA₁ (Tromboxano A₁). LTB₄ (Leucotrieno B₄). LTC₄-D₄-E₄ (Leucotrieno C₄, D₄, E₄). RvE₁ (Resolvina E₁). PD₁ (Protectina D₁). Adaptada de [51, 86, 87].

Por otro lado, un incremento en el consumo de AGPI-CL n-3, especialmente EPA y DHA (usualmente como aceite de pescado) se traduce en un aumento de la proporción de estos AG en los fosfolípidos de las membranas celulares de las células inflamatorias (**Figura 8**). La incorporación de EPA y DHA en las células se produce de una manera dosis-respuesta y se debe en parte a expensas del AA [101]. Dado que hay menos sustrato disponible para la síntesis de eicosanoides de AA, se ha demostrado que la administración de suplementos de aceite de pescado de la dieta humana da lugar a una disminución de la producción de eicosanoides derivados del AA por las células inflamatorias [51, 89].

Los AGPI-CL n-3, además de inhibir la actividad de la PLA₂ en macrófagos y la actividad de COX sobre el AA, sirven de sustrato para las enzimas COX y LOX. El EPA da origen a mediadores lipídicos de diferente estructura y menos activos biológicamente comparados con los eicosanoides producidos a partir de AA, por ejemplo el LTB₅ derivado de EPA es de 10 a 100 veces menos potente como quimiotáctico de neutrófilos en comparación con el LTB₄ [89]. Así, a los eicosanoides derivados de EPA (PGs de la serie 3, TXs de la serie 3 y TLs de la serie 5) se les atribuyen propiedades antiinflamatorias. Además, recientes estudios han identificado a un grupo nuevo de mediadores lipídicos formados a partir de EPA y DHA, denominados Resolvinas (de la serie E) y protectinas (de la serie D), estos mediadores parecen tener fuertes efectos en la resolución de la inflamación, ya que actúan regulando el tráfico y la migración de las células inflamatorias y bloquean la migración transendotelial de los leucocitos. También se sugiere que pueden regular los niveles de mediadores de péptidos proinflamatorios mediante la inhibición de la migración de células dendríticas y la liberación de citocinas [102-104].

Estos resultados demuestran el papel funcional que cumplen los AGPI-CL de ambas familias n-3 y n-6. Por un lado, se considera que los AGPI-CL n-3 pueden actuar protegiendo frente a la sensibilización y las manifestaciones clínicas de la atopía; ya que actúan aumentando la producción de mediadores antiinflamatorios, además se ha comprobado que son capaces de regular la expresión de genes inflamatorios [51, 105]. Por otro lado, se comprueba que los AGPI-CL n-6, especialmente DGLA y AA pueden, mediante los mediadores lipídicos inhibir o activar la intensidad de los síntomas en estas patologías.

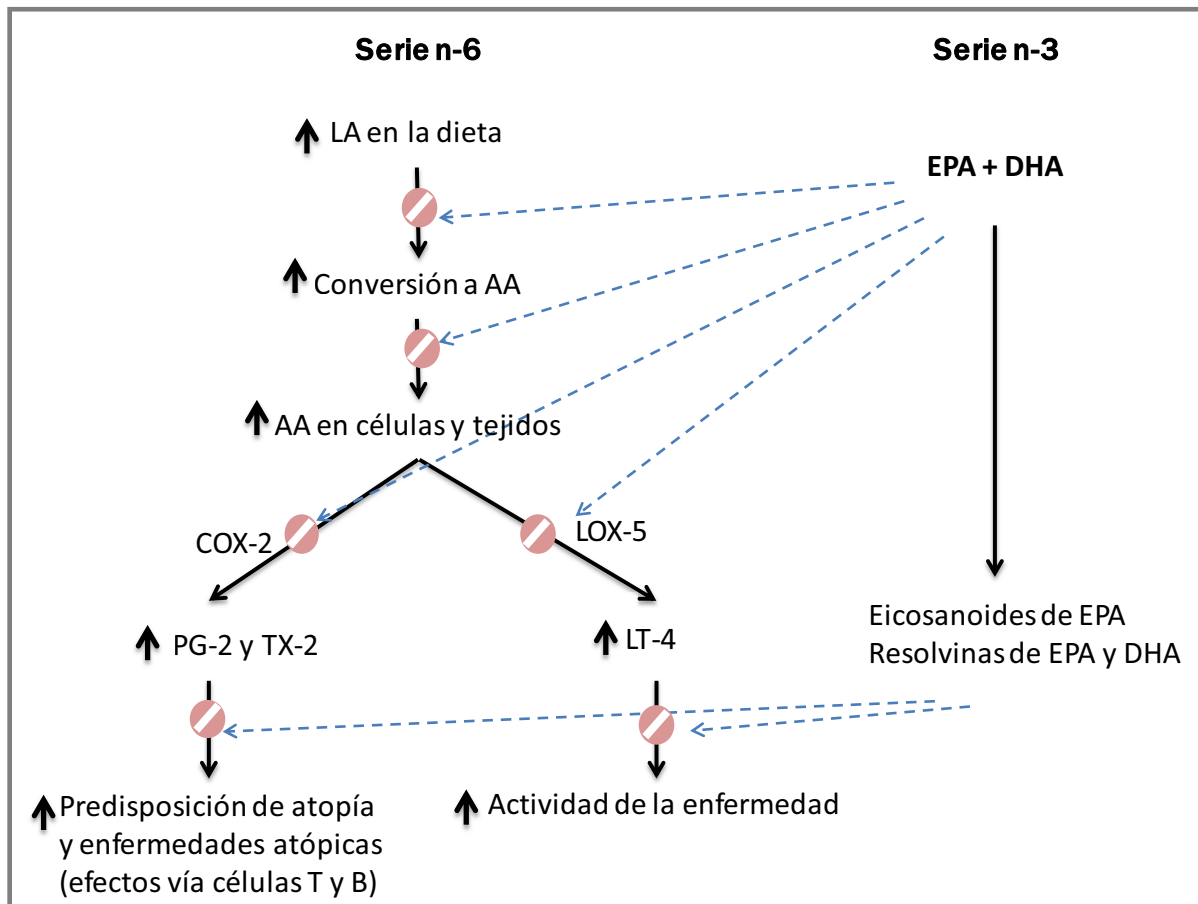


Figura 8. Efecto del aumento de consumo de AGPI n-6 y n-3 sobre las manifestaciones atópicas. Adaptada de [51].

Respecto a los **AGT** y su función en el desarrollo de la atopía, se ha planteado la hipótesis de que el posible nexo que conecte a los AGT y la atopía sea el hecho de que estos AG interfieren en el metabolismo de los AGPI-CL, afectando funciones como el mantenimiento de la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, la producción de eicosanoides y el expresión génica [77, 78, 106-108].

Diferentes estudios realizados *in vitro* e *in vivo* apuntan que los AGT son capaces de inhibir la síntesis de AGPI-CL, especialmente cuando los niveles de AGE son bajos [77, 78, 109]. Lo que sugiere que estos AG podrían regular la respuesta alérgica alterando la producción de los eicosanoides. Por un lado, se conoce que los isómeros *trans* del ácido oleico (especialmente el ácido elaídico) y del ácido linoleico tienen propiedades proinflamatorias; sin embargo, los estudios concluyen que se necesitan más investigaciones para confirmar tales propiedades. El ácido elaídico es un potente

inhibidor de la enzima D6D en comparación con el ácido *t*-vaccénico, lo que sugiere su potencial efecto adverso sobre la biosíntesis de AGPI-CL n-3 y n-6 [73, 110].

Por otro lado, existen pruebas convincentes que demuestran la capacidad del ácido ruménico (9c11t-CLA) para modificar los mediadores de la inmunidad, se ha demostrado en estudios en modelos animales, *in vitro* y en humanos que este AG puede modular la producción de eicosanoides e inmunoglobulinas, específicamente el CLA reduce la concentración de IgE y por lo tanto reduce las reacciones alérgicas [111-114]. Se le atribuyen al ácido ruménico entonces propiedades antiinflamatorias, ya que se ha constatado que este del isómero de CLA reduce la producción de PGE₂ y LTB₄. El mecanismo por el cual el CLA reduce la producción de eicosanoides derivados del AA se puede explicar por diferentes mecanismos de acción [115-117].

1. El CLA desplaza al AA de los fosfolípidos de las membranas celulares, lo que origina una disminución de AA en las membranas. Esta disminución de AA puede deberse a:
 - Disminución de su formación ya que al incorporarse el CLA en las membranas a expensas del LA, hay menos LA disponible para la formación de AA.
 - Disminución de su formación, de manera similar a los AGPI n-3 el CLA se incorpora en las membranas, y éste compite con el LA por las desaturasas y elongasas para la biosíntesis de AGPI-CL
 - Disminución de su incorporación en la membrana, tal vez por incorporación de los derivados del CLA (por ejemplo el AA-conjugado, **Figura 9**).
 - El CLA o sus metabolitos pueden actuar como sustratos o antagonistas para las enzimas que participan en el proceso de producción de los eicosanoides (PLA₂, COX y LOX). Se ha sugerido por ejemplo que el AA-conjugado podría actuar como sustrato pero más probablemente como antagonista de la COX.
 - Los derivados eicosanoides de CLA en sí mismos pueden tener propiedades antiinflamatorias. La **Figura 10** muestra en resumen los posibles mecanismos de acción del CLA sobre la producción de eicosanoides.

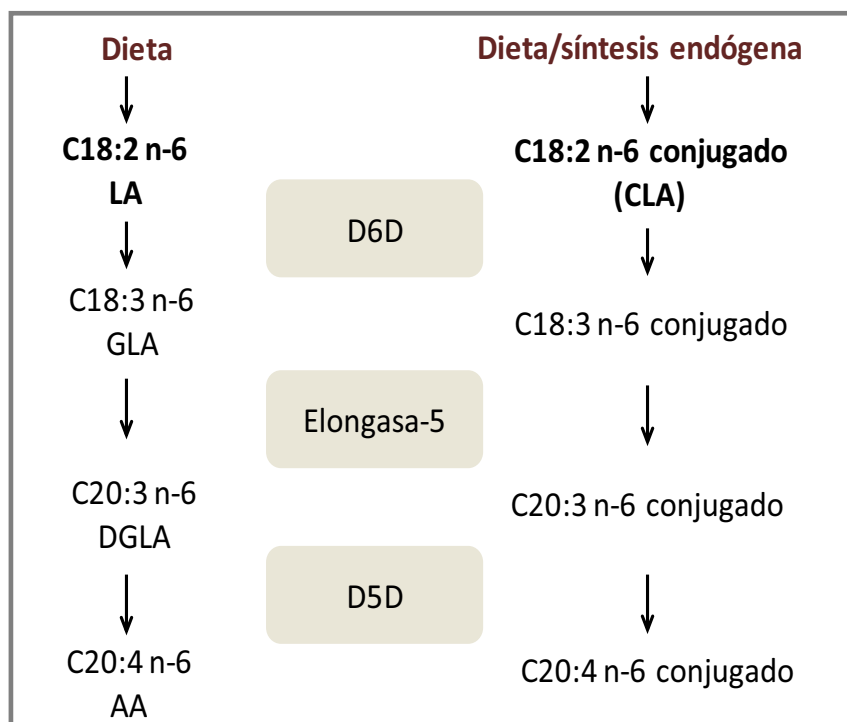


Figura 9. Posible ruta metabólica seguida por el CLA. Adaptada de [116, 117].

La IgE se forma durante la respuesta inmune específica mediada por los linfocitos Th2 frente a alérgenos del aire y alimentos y regula la liberación de una serie de importantes mediadores químicos de la respuesta alérgica incluyendo histamina y LTs. Estudios en modelos animales han demostrado que la ingesta dietética de 9*c*,11*t*-CLA (ácido ruménico) puede incrementar la producción de IgG e IgM cuando los niveles de IgE son reducidos [114], por tanto, se reducen la producción de los mediadores químicos que causan los síntomas de las enfermedades atópicas.

Además de sus acciones reguladoras en la producción de eicosanoides, el CLA ha sido sujeto de múltiples estudios en los que se ha demostrado la capacidad anti-cancerígena, anti-aterogénica y anti-diabética principalmente del isómero *c*9,*t*11-CLA [113, 117-119]. Igualmente, parece que el CLA produce alteraciones en el perfil de AG más allá de las series n-3 y n-6. En animales, por ejemplo, se ha observado una disminución del ácido oleico y del palmítoleico que podría ser debida bien a un desplazamiento de estos AG por incorporación del CLA en las mismas fracciones lipídicas que éstos o bien a la inhibición de la D9D que convierte el ácido esteárico y palmítico a oleico y palmítoleico, respectivamente.

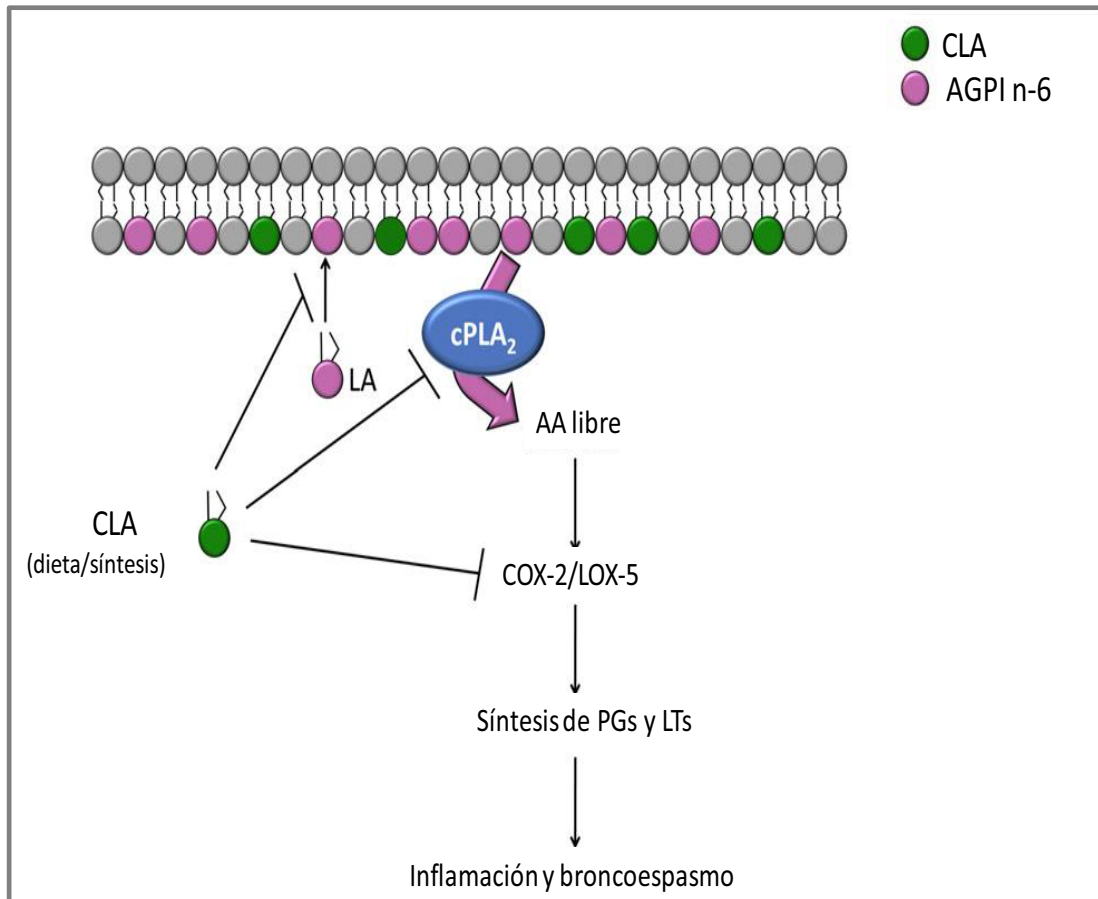


Figura 10. Efectos del CLA (*c9,t11*-CLA) en la síntesis de eicosanoides. Adaptada de [114, 117].

Por otra parte, modelos animales han demostrado que el ácido *t*-vaccénico tiene propiedades antiinflamatorias en diferentes enfermedades atópicas [120, 121], los posibles mecanismos de acción por lo que actuaría son: como sustrato en la síntesis del ácido ruménico por acción de la D9D; o como sustrato en la síntesis de AGPI-CL manteniendo la configuración *trans*, de manera similar a como se sintetizan los AGPI-CL a partir de CLA, sugiriendo entonces que sus metabolitos actuarían también modificando la producción de los eicosanoides del AA. Además al ácido *t*-vaccénico se le atribuyen propiedades anti-aterogénicas mientras que el ácido eláidico es aterogénico [122-125].

2.2.2. Efectos en la expresión génica

Los AG, especialmente los AGPI son capaces de modular la expresión génica, ya sea de forma directa, mediante la interacción con receptores nucleares, o de forma indirecta a través de cascadas de señalización que a su vez alteran la actividad de factores de transcripción. Los AGPI están involucrados en la regulación de genes implicados en la

diferenciación celular y el crecimiento, así como el metabolismo lipídico, de proteínas y de carbohidratos. Esto es posible principalmente a través de la unión a factores de transcripción como las distintas isoformas de los receptores nucleares de los proliferadores peroxisomales o PPARs (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), al receptor nuclear RXR (del inglés *Retinoid X Receptor*), al factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) o a las proteínas que se unen a elementos reguladores de esteroides o SREBPs (del inglés *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) [126, 127].

Un grupo de factores de transcripción de gran importancia, debido a su papel en los procesos inflamatorios son los PPARs. Los PPARs actúan a través de la dimerización con el receptor RXR. Existen cuatro isoformas PPAR- α , β , δ y γ , que aunque tienen funciones distintas están relacionadas entre sí. Por ejemplo, PPAR- γ posee selectividad por los AG insaturados y se ha demostrado que dicha unión regula la transcripción de citocinas, quimiocinas y factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear NF- $\kappa\beta$ [3, 114, 128]. Existen dos isoformas del PPAR- γ , PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2, las cuales difieren entre ellas por 84 nucleótidos. PPAR- γ 1 se expresa en linfocitos T y B, células dendríticas y epiteliales.

Estudios *in vitro* han demostrado que los AGPI-CL n-3 actúan como ligandos de PPAR- α y PPAR- γ , incrementando su expresión. La activación de PPAR- γ disminuye la producción de NF $\kappa\beta$. NF $\kappa\beta$ es un factor de transcripción nuclear que aumenta la expresión de genes que codifican proteínas que favorecen la respuesta inflamatoria como la ciclooxigenasa.2 (COX-2), Interleucina-6 (IL-6) y la oxidonítrico sintetasa. La COX-2 aumenta la conversión del AA a eicosanoides con acción proinflamatoria como se describió anteriormente [79, 127].

El CLA, al igual que los AGPI-CL n-3 actúa como ligando de los PPARs, a través de esta interacción, podría modular la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico (**Figura 11**). Probablemente el receptor a través del cual ejercería sus efectos también sea el PPAR- γ [128, 129]. Los estudios han demostrado que el ácido ruménico (RA) es un potente activador natural de PPAR- γ en el núcleo y a ello se le atribuyen sus propiedades antiinflamatorias [114, 128]. Sin embargo, los estudios en humanos todavía muestran resultados contradictorios.

pautas establecidas en las investigaciones previas detectaron que los recientes cambios en la ingesta de grasas en la dieta habían precedido y luego crecido en paralelo al aumento de las enfermedades atópicas [1]. Como una consecuencia de las medidas de salud pública implantadas en los países industrializados para reducir la incidencia de la enfermedad cardíaca coronaria, la ingesta alimentaria de grasas saturadas (mantequilla y manteca de cerdo) había disminuido, mientras que el consumo de aceites vegetales y margarina se había incrementado (fuentes de ácido linoleico y AGPI de la serie n-6) [1, 2]. Sugirieron también que la disminución de la ingesta de pescado azul o productos derivados del pescado (fuentes de AGPI de la serie n-3, especialmente EPA y DHA) pudieron haber contribuido notablemente al aumento de la atopía.

Estas observaciones llevaron al planteamiento de la hipótesis que hasta el momento es la más estudiada, esta hipótesis propone que un mayor consumo de los ácidos grasos n-6 y un menor consumo de ácidos grasos n-3 en la dieta juega un papel causal en el aumento de la incidencia de las enfermedades atópicas [1, 44]. La esencia de esta hipótesis radica en que el aumento del consumo de ácido linoleico en la segunda mitad del siglo XX, ha dado como resultado una mayor capacidad de sintetizar AA y que, a través de las acciones de la PGE₂ favorece la balanza hacia el fenotipo Th₂ y hacia la producción de IgE por los linfocitos B.

Se conoce que la sensibilización a los alérgenos que desencadenan las enfermedades atópicas sucede en los primeros periodos de la vida, y se puede producir incluso en el útero, por lo tanto, es probable que la dieta de las embarazadas influya en el riesgo de desarrollar enfermedades atópicas en los niños. A pesar del período relativamente corto de exposición ambiental durante el embarazo y tras el nacimiento, las influencias epigenéticas en estas etapas pueden ser decisivas en el desarrollo de fenotipo alérgico con un impacto a largo plazo, por eso en los últimos años numerosos estudios han centrado sus investigaciones en estudiar si las modificaciones de la fracción grasa de la dieta durante el embarazo pueden influir sobre la aparición o no de las enfermedades atópicas en los niños. Así, se ha valorado el efecto tanto de la **ingesta de alimentos fuentes de AGPI-CL** cómo el efecto de los **niveles plasmáticos de AGPI-CL** durante el embarazo y el recién nacido sobre el desarrollo de estas enfermedades.

Aunque el efecto de la dieta materna así como el de la composición plasmática de AG durante el embarazo y el recién nacido (cordón umbilical) sobre el desarrollo de las enfermedades atópicas se ha examinado usando otros diseños de estudios epidemiológicos observacionales, tales como casos/control, transversales y los estudios ecológicos, sólo estudios prospectivos de cohortes de nacimientos (madre/hijos) son revisados en esta memoria, teniendo en cuenta sus ventajas respecto a otros estudios observacionales en el establecimiento de las relaciones causales potenciales y porque permiten una mejor comparación con nuestros resultados.

En los estudios analizados, la ingesta de la dieta materna durante el embarazo se ha considerado principalmente en dos niveles: como **alimentos** y como **nutrientes (AG)** de la dieta total. El resumen de los estudios se muestra en la **Tabla 3** (estudios indicados en orden descendiente de año de publicación). En la mayoría de los estudios revisados, la ingesta dietética fue establecida en diferentes semanas durante el embarazo, haciendo que sea difícil la comparación de resultados.

Entre los **alimentos** se destaca que el aumento del consumo materno de pescado, verduras y productos lácteos está asociado con un menor riesgo de enfermedades atópicas en los niños. Por otra parte, el alto consumo materno de nueces, aceites vegetales, está asociado con un mayor riesgo de estas enfermedades. Las pruebas aportadas por estos estudios indican que la asociación entre el consumo materno de pescado y el riesgo de las enfermedades atópicas en los hijos sigue siendo la más consistente entre los alimentos. Esto está de acuerdo con la hipótesis de que los pescados, particularmente el pescado graso (azul) que es una fuente rica de AGPI-CL n-3, puede conferir un efecto beneficioso sobre el riesgo de la atopía. El papel de otros alimentos sigue siendo débil e inconsistente.

La evidencia del rol que cumple el consumo de **AG** durante el embarazo es muy limitada hasta el momento (**Tabla 3, ácidos grasos**); sin embargo, los resultados muestran que el consumo de los AG n-3 (ALA y EPA) disminuye el riesgo de sibilancias y asma; mientras que el consumo de AG n-6 (LA y AA) incrementan el riesgo de eczema y asma en los primeros 5 años de vida.

Tabla 3. Papel del consumo de alimentos y ácidos grasos durante el embarazo en relación en el desarrollo de enfermedades atópicas: resumen de estudios prospectivos de cohortes de nacimientos.

Año	Sujetos (m/h)	Duración del seguimiento	Método de medición	Enfermedad atópica	Resultados	Ref.
ALIMENTOS						
2013	2516	14 meses	FFQ a las 12 semanas de embarazo	Eczema y sibilancias	Consumo de productos lácteos disminuye el riesgo de sibilancias.	[131]
2012	45593	7 años	FFQ a las 25 semanas de embarazo	Sibilancias Asma Rinitis alérgica	Bajo consumo de yogur bajo en grasa incrementa el riesgo de asma y rinitis alérgica.	[132]
2012	2441	5 años	FFQ al 8 ^{vo} mes de embarazo	*Asma, sibilancias, rinitis alérgica y eczema atópico	Bajo consumo de verduras de hojas, frutas y chocolate están asociados con el riesgo de sibilancias.	[133]
2010	763	2 años	DHQ	*Sibilancias y eczema	Consumo de productos lácteos, leche y queso están inversamente asociados con el eczema.	[134]
2008	2832	8 años	FFQ	*Sibilancias y asma	Consumo diario de nueces está asociado con un mayor riesgo de sibilancias y síntomas de asma.	[135]
2007	2641	2 años	FFQ a 8 ^{va} semana de embarazo	Eczema y sensibilización alérgica (SPT)	Consumo de margarinas y aceites vegetales incrementa el riesgo, mientras que el consumo de pescado disminuye el riesgo de eczema atópico.	[136]

m/h (pares de madres e hijos analizados en el estudio). FFQ (Cuestionario de frecuencia de consumo). DHQ (Cuestionario semicuantitativo de la historia dietética). SPT (*skin prick test*). *(Aplicación del cuestionario desarrollado en el Estudio Internacional de Asma y Alergia en niños, ISSAC).

Tabla 3. Continuación.

Año	Sujetos (m/h)	Duración del seguimiento	Método de medición	Enfermedad atópica	Resultados	Ref.
2007	1253	5 años	FFQ	*Sibilancias, asma, eczema y rinitis	Consumo de manzanas está asociado con un menor riesgo de sibilancias y asma. El consumo de pescado está asociado un menor riesgo de eczema.	[137]
2007	462	6.5 años	FFQ en cualquier tiempo del embarazo	Eczema y sibilancias Sensibilización alérgica (SPT)	Consumo de pescado está asociado inversamente con el eczema, sibilancias y la sensibilización alérgica.	[138]
2007	631	3 años	FFQ	Asma	Consumo de frutas, verduras y pescado azul están asociados con un menor riesgo de asma.	[139]
ÁCIDOS GRASOS						
2012	2441	5 años	FFQ al 8 ^{vo} mes de embarazo	*Asma, sibilancias, rinitis alérgica y eczema atópico	Consumo de mantequilla, de AGPI y ALA, así como el ratio n-6:n-3 durante el embarazo pueden ser potenciales determinantes de la rinitis alérgica en los niños.	[140]
2011	2908	5 años	FFQ	*Asma	Consumo de ALA, la suma de AGPI n-3 disminuye el riesgo, mientras que el consumo de AA incrementa el riesgo de asma.	[141]
2009	763	2 años	DHQ	*Sibilancias y eczema	Consumo de ALA y EPA durante el embarazo disminuye el riesgo de sibilancias mientras que el consumo de AGPI n-6, especialmente LA incrementa el riesgo de eczema.	[142]

m/h (pares de madres e hijos analizados en el estudio). FFQ (Cuestionario de frecuencia de consumo). DHQ (Cuestionario semicuantitativo de la historia dietética). SPT (*skin prick test*). *(Aplicación del cuestionario desarrollado en el Estudio Internacional de Asma y Alergia en niños, ISSAC).

Por otro lado, sólo pocos estudios han evaluado el efecto de la **composición de los AG** (sangre total, plasma, suero o fracciones lipídicas específicas) en las mujeres embarazadas así como el estatus de AG en el recién nacido (cordón umbilical) sobre el desarrollo de las enfermedades atópicas, y los resultados se describen en la **Tabla 4** (estudios indicados en orden descendiente de año de publicación). Las concentraciones medidas en el plasma reflejan la ingesta dietética y el metabolismo de los AG [44, 143]. La composición de AG del cordón umbilical es indicativa de la exposición del feto a los AG, y está influida por la dieta y el metabolismo materno, por el transporte a través de la placenta y por el metabolismo de la placenta y el feto [44]. Por lo tanto, se propone que un análisis directo de los niveles plasmáticos de los AG ofrece una mejor información de su potencial efecto sobre la enfermedad.

Hasta el momento los resultados son controvertidos, por un lado el estudio ALSPAC (del inglés *The Longitudinal Study of Parents and Children*) investigó las asociaciones entre composición de AG y enfermedad en una cohorte prospectiva al nacimiento (madres/hijos), en este estudio se analizaron la composición de los fosfolípidos de los glóbulos rojos circulantes en las madres y en el cordón umbilical de sus hijos [144]. Los resultados obtenidos mostraron que la composición de AG de la madre no tiene ningún efecto sobre el desarrollo del eczema atópico ni en la presencia de sibilancias persistentes en los primeros 42 meses de vida, concluyendo que es poco probable que una exposición fetal a los AG de la serie n-3 y n-6 sea un factor determinante en el desarrollo temprano de las enfermedades atópicas. Por otro lado, los resultados presentados por el estudio prospectivo KOALA (del holandés *Kind, Ouders en gezondheid: Aandacht voor Leefstijl en Aenleg*) indicaron que una exposición temprana del feto especialmente a niveles altos de AA de la madre podrían ayudar a disminuir el riesgo de eczema en el primer año de vida [145]. Finalmente, los resultados del estudio *Southampton Women's Survey*, sugieren que niveles plasmáticos elevados de AGPI n-3, especialmente EPA y DHA durante el embarazo disminuyen el riesgo de sufrir sibilancias los primeros 6 años de vida [146].

En vista de la discrepancia de los resultados, resulta de gran interés la replicación de los análisis de nuevas cohortes de estudio utilizando matrices de análisis que reflejen la composición de AG circulantes en las madres e hijos y que permitan compararse con los estudios previos.

Tabla 4. Papel del estatus de AG de la madre y del recién nacido (cordón umbilical) en el desarrollo de enfermedades atópicas: resumen de los estudios prospectivos de cohortes de nacimientos.

Año	Sujetos	Duración del seguimiento	Muestra	Enfermedad atópica	Resultados	Ref.
Madre						
2012	865 (m/h)	6 años	PC del plasma (34 semanas)	Atopía, Sibilancias	Niveles altos de EPA, DHA y el total de AG n-3 están asociados con un bajo riesgo de sibilancias.	[146]
2011	1275 (m/h)	6-7 años	PL del plasma (36 semanas)	Sibilancias, asma, rinoconjuntivitis alérgica, eczema	Niveles altos de AA en el plasma materno están asociados con un menor riesgo de eczema en los primeros 7 meses de vida.	[145]
Madre - hijo (cordón umbilical)						
2004	4202 m 1762 h	30-42 meses	PL de RBC (34 semanas)	Sibilancias y eczema	No existe asociación entre los niveles de AG n-3 y n-6 de la madre y del cordón umbilical con la enfermedad.	[144]

m/h (pares de madres e hijos analizados en el estudio). PC (Fosfatidilcolina). PL(Fosfolípidos). RBC (Glóbulos rojos de la sangre).

2.4. Ácidos grasos *trans* y enfermedades atópicas en la infancia

Numerosos estudios han evaluado en mujeres embarazadas y recién nacidos las relaciones entre los niveles de AGT y AGPI-CL en diferentes fluidos (p.ej. plasma, suero) [106, 107, 147-149], encontrando que estos AG están inversamente relacionados; estos resultados permitieron proponer que el posible punto de conexión entre la respuesta alérgica y los AGT, sería que estos AG modifican el estatus de los AGPI-CL, actuando por un lado, inhibiendo la desaturación de los AGE hasta sus metabolitos (AA, EPA y DHA) lo que se traduce en una alterada producción de eicosanoides, y por otro lado impedirían la incorporación de los AGPI-CL dentro de las membranas celulares [149]. Dada la importancia de los AGPI-CL, especialmente AA y DHA, durante el embarazo y el crecimiento fetal, resulta de gran interés conocer los isómeros *trans* específicos que interfieren en su biosíntesis. Los resultados indican que son principalmente los isómeros *trans* del ácido oleico los que tendrían estos efectos tanto en los niveles plasmáticos de la madre como en el recién nacido; sin embargo, sólo un estudio ha analizado la diferencia entre los isómeros *trans* de origen natural (ácido *t*-vaccénico y ruménico) y los AGT de origen industrial (ácido elaídico) y su efecto sobre el metabolismo de los AGPI-CL [13]. En este estudio se confirma que sólo el ácido elaídico se relaciona inversamente con los AGPI-CL n-3 (especialmente EPA y DHA) principalmente en los niveles plasmáticos del feto. Hasta la fecha, todavía no existen datos concluyentes sobre el impacto del ácido *t*-vaccénico durante el embarazo en el sistema inmunológico del feto.

Al investigar el efecto de la dieta materna **durante el embarazo** sobre el desarrollo de las enfermedades atópicas en los niños, diferentes estudios han incluido en su análisis, alimentos ricos en AGT, tanto de origen industrial como de origen natural, así como se describe en la **Tabla 3**. De los estudios que encontraron asociación entre el consumo de productos lácteos y un bajo riesgo de enfermedad en los niños, éstos atribuyen que tales asociaciones se deben a los altos contenidos de los AG *t*-vaccénico y ruménico en su composición y, que actuarían modulando la respuesta inflamatoria, por los mecanismos de acción ya descritos (sección 2.2.).

Recientemente, el estudio DIPP (del inglés *Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention*) evaluó el efecto de la composición de AG durante el embarazo y el riesgo de asma en niños de 5 años de edad, encontrando asociaciones entre el consumo de CLA y el

riesgo de asma, sugiriendo que un consumo alto de CLA medido principalmente por su isómero mayoritario el ácido ruménico podría estar asociado con un menor riesgo de asma en los primeros 5 años de vida [133].

Estudios de intervención en humanos y modelos animales han podido comprobar que el CLA y/o el ácido *t*-vaccénico tienen efectos antiinflamatorios en enfermedades como el asma, la inflamación de las vías respiratorias y el eczema atópico [120, 121, 150]. Del mismo modo, se ha podido demostrar que un alto contenido de estos dos AG en la leche materna tiene efectos protectores frente a las manifestaciones atópicas en los 2 primeros años de vida [151].

Por otra parte, el estudio ISSAC fue el primer estudio que investigó la posible asociación del consumo de AGT con la prevalencia del asma, rinoconjuntivitis alérgica y el eczema atópico en niños de entre 13 y 14 años de edad en 155 centros alrededor del mundo [108]. Los resultados mostraron una asociación positiva entre el consumo de AGT y la prevalencia de los síntomas de estas enfermedades en los adolescentes. Siendo la asociación más fuerte cuando los análisis se restringieron al consumo de AGT de alimentos que contenían principalmente aceites parcialmente hidrogenados (p.ej. bizcochos, galletas y chips), no se registraron tales asociaciones con los AGT de alimentos de fuentes naturales (productos lácteos, leche, yogur, queso). Estos resultados sugirieron el posible efecto adverso sobre la atopía para los AGT de fuentes industriales y no para los AGT de fuentes naturales, tal como sucede en otras patologías.

En base a estos resultados, algunos estudios han evaluado el efecto del consumo principalmente de margarina (como principal fuente de AGT de origen industrial) y consumo de alimentos de procedencia rumiante (leche, mantequilla) sobre las manifestaciones atópicas [93, 94, 152]. Se destacan principalmente los resultados obtenidos en el estudio ISSAC en su fase III, desarrollado en España, en niños de entre 6 y 7 años de edad, en él se destaca la asociación negativa entre el consumo de leche y mantequilla (tres o más veces a la semana) y la prevalencia de eczema atópico [152]. Sin embargo, recientemente el estudio LISA (del inglés, *Influences of lifestyle-related factors on the immune system and the development of allergies in childhood*) donde se analizaron 2582 niños alemanes a los 2 años de vida, se pudo evidenciar que los niños que tienen un consumo predominante de margarina tienen un mayor riesgo de desarrollo de eczema

atópico y sensibilización alérgica (IgE), mientras que el consumo de mantequilla no muestra ningún efecto. Los autores indican que no se pudo determinar si la margarina es un factor de riesgo causal o si otros factores de estilo de vida han influido en esta asociación [93].

Los AGT han sido una parte de la dieta típica "occidental" y la hipótesis de que puedan desempeñar un papel en el desarrollo de las enfermedades atópicas influyendo incluso desde la formación del feto en el útero es de gran interés y, por tanto, se requieren más estudios.

3. Desaturasas y elongasas y enfermedades atópicas en la infancia

Los niveles de AGPI-CL en los fluidos y tejidos humanos dependen de la ingesta dietética y de la biosíntesis endógena y de ello depende que estos AG puedan realizar las funciones descritas en el proceso inflamatorio (sección 2.3). Numerosos estudios especialmente casos/control han venido registrando en las últimas décadas anomalías en la composición de los AG en los niños que sufren alguna enfermedad atópica [6, 39, 44, 95, 99, 153, 154]. Los resultados son inconsistentes, ya que algunos estudios encontraron altas concentraciones de LA; sin embargo, bajas concentraciones de GLA, DGLA, AA incluso bajas concentraciones de EPA y DHA en niños atópicos, mientras que otros estudios no muestran diferencias entre sano y atópico (**Tabla 5**), siendo los AGPI-CL de la serie n-6 los que más variabilidad mostraron entre individuos. Los resultados de diversos estudios muestran que los niveles de AGPI-CL de la serie n-6 son más dependientes de la síntesis *de novo* en comparación a los niveles de AGPI-CL de la serie n-3 (EPA y DHA) que son más dependientes de la ingesta dietética [151, 155].

Observaciones como las descritas hicieron pensar que debían existir **factores genéticos** responsables de modular la capacidad de síntesis endógena de los AGPI-CL, y es aquí donde se planteó la hipótesis de que una alteración a nivel genético de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa (esta enzima es la responsable de la conversión del LA a GLA y de ALA a SA) podría ser la causa de las anomalías en el metabolismo de los AGPI-CL n-6 en casos de niños atópicos [6, 95, 98, 156, 157]. Sin embargo, en la biosíntesis también participan las elongasas y la D5D, por tanto, se puede considerar que una alteración en cualquiera de estas enzimas podría influir en la composición de AG en los niños y

personas que padecen enfermedades atópicas, tal como se ha descrito para otras patologías.

Dentro de los factores genéticos se conoce que las variantes genéticas de los genes, de manera especial los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *Single Polymorphism Nucleotide*) son en parte los responsables de los cambios en la composición de AG. Los SNPs son las variaciones genéticas más comunes entre la población, y consisten en la sustitución de una base púrica o pirimidínica (llamada nucleótido) por otra, en una secuencia de ADN.

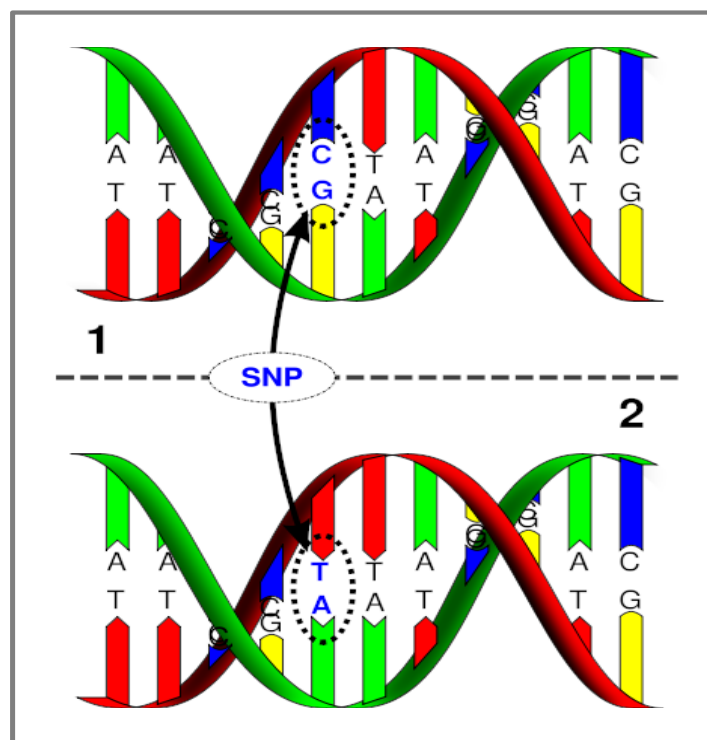


Figura 12. Esquema de un Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP, del inglés *Single Polymorphism Nucleotide*). Obtenida de [158].

En la **Figura 12** se muestran dos fragmentos secuenciados de ADN (GGAT en el panel 1 y GAAT en el panel 2); se observa que la guanina ha sido sustituida por una adenina, por lo que diremos que para este SNP hay dos alelos, el G y el A. A cada SNP se le puede asignar, en una población, una frecuencia del alelo minoritario o MAF (del inglés, *minor allele frequency*), que es la frecuencia más baja de un alelo en un "locus" observada en una población particular.

Tabla 5. Concentraciones de AGPI y AGPI-CL en el suero ó plasma de niños atópicos comparados con los no-atópicos.

Año	Casos	Controles	Muestra	Enfermedad atópica	Diferencias de AG*	Ref.
2008	35(2-17 a)	31	Suero total	Eczema atópico	↓GLA y DGLA	[99]
2007	90 (4-6 a)	218	RBC	Atopia	↓ EPA y DHA ↑AA	[159]
2006	6 (< 6m)	19	PL del suero	Eczema atópico	↓GLA, ↑EPA	[154]
2005	8 (< 7a)	6	Suero total	Asma y rinitis alérgica	↓GLA	[160]
2005	15 (< 7a)	6	Suero total	Eczema atópico	↓GLA	[160]
2001	20 (3 m)	20	PL, TG y CE del suero	Eczema atópico	↓ DHA en CE, ↓ GLA en PL y ↑LA en TG	[153]
2001	126 (3 -18 a)	126	CE del suero	Eczema atópico	↓EPA y DHA	[39]
2001	145 (3 -18 a)	145	CE del suero	Rinitis alérgica	No diferencias	[39]
2001	47 (3 -18 a)	47	CE del suero	Asma	No diferencias	[39]
1995	17 (< 9 a)	10	PL y CE del plasma	Atopia	↑LA ↓AA	[161]
1994	13 (<1a)	44	PL del suero	Atopia	↓DGLA y AA	[162]

PL (Fosfolípidos). TG (Triglicéridos). CE (Esteres de colesterol). a (años). m (meses). * (Concentración de AG en los niños atópicos).

Conviene tener en cuenta que hay diferencias entre poblaciones, de manera que un alelo en un SNP puede ser muy común en una área geográfica o en un grupo étnico (y tener por tanto una MAF elevada) y muy poco común en otros (y tener una MAF baja). En el ADN de cualquier individuo pueden existir hasta 10 millones de SNPs, teniendo en cuenta que nuestro genoma contiene hasta 3000 millones de pares de bases y que los SNPs pueden ocurrir aproximadamente una vez cada 300 nucleótidos, aproximadamente.

Cuando se localizan en un gen o en una región reguladora cercana a un gen, pueden afectar la función del mismo. A pesar de que la mayoría de SNPs no tienen ningún efecto en la salud o el desarrollo, cada vez son más los que se están relacionando con una diferente susceptibilidad de los individuos a factores ambientales, fármacos, toxinas o nutrientes, o con un riesgo particular a desarrollar ciertas enfermedades [163-165].

Es importante conocer también el concepto de **haplotipo**. Un haplotipo se refiere a un conjunto de variaciones genéticas (por ejemplo SNPs) que tienden a heredarse conjuntamente. El hecho de que existan haplotipos implica que puede predecirse la existencia de ciertos SNPs determinando sólo la presencia de otro. En el terreno de la investigación para la salud, esto se traduce en que detectando un solo SNP se podría predecir la aparición de un determinado fenotipo causado por múltiples SNPs. El proyecto internacional llamado HapMap [166] está actualmente recogiendo información sobre todos los haplotipos conocidos en humanos para investigar su influencia en la expresión de ciertos fenotipos (es decir, en la aparición por ejemplo de ciertas enfermedades).

Recientes estudios en humanos han demostrado que polimorfismos de un sólo nucleótido y haplotipos en el clúster genético *FADS1 FADS2* se relacionan con diferencias en las proporciones de AGPI séricos, plasmáticos, en los de los fosfolípidos plasmáticos o eritrocitarios, en los AGPI del tejido adiposo e incluso en los de la leche materna (ver **Sección 3.2**). Así, la genética particular de cada mujer también va a condicionar las proporciones de AG que pueda transportar hacia el feto durante el embarazo y en el caso del recién nacido la capacidad de sintetizar AGPI estará también condicionada por su genética y no sólo por el aporte de la madre.

3.1. Desaturasas y Elongasas: estructura y función

3.1.1. $\Delta 5$ -desaturasa (D5D) y $\Delta 6$ -desaturasa (D6D): genes *FADS1* y *FADS2*

La conversión de los ácidos grasos esenciales, LA y ALA, hacia sus metabolitos de cadena larga está regulada por las enzimas D5D y D6D, codificadas por los genes *FADS1* y *FADS2*, respectivamente [167, 168]. Estas enzimas son proteínas que están unidas a las membranas y que constan de 444 aminoácidos con dominios amino-terminal del citocromo B5, dos regiones que abarcan la membrana y tres motivos “His-box” comparten el 61% de identidad de aminoácidos y 75% de similitud.

Los niveles de expresión de ambas enzimas son más altos en el hígado, seguido por el cerebro, corazón y pulmón, mientras los AGPI de la dieta reducen significativamente la abundancia hepática de D5D y D6D como se ha demostrado en modelos animales [168].

En el año 2000 estos genes fueron localizados en el genoma humano en el Cromosoma 11 (11q12-q13.1), y ambos *FADS1* y *FADS2* contienen 12 exones y 11 intrones [169]. Estos genes están dispuestos en una orientación cabeza a cabeza y construyen un clúster con un tercer gen *FADS3* (**Figura 13**).

Mientras que la función de *FADS1* y *FADS2* se ha descrito, la función de la proteína que codifica el gen *FADS3* no está totalmente clara. Los resultados de un reciente estudio mostraron que algún SNP del gen *FADS3* está relacionado con bajos niveles de DHA sugiriendo entonces que este gen también puede tener actividad desaturasa [170].

Se ha constatado que existe una vinculación entre o cerca de la región cromosómica humana 11q12-13.1 y enfermedades complejas como la diabetes tipo 1, la artrosis y los trastornos bipolares, así como el asma, la atopía y caracteres cuantitativos relacionados con la alergia, tales como los niveles de IgE específica y total [171].

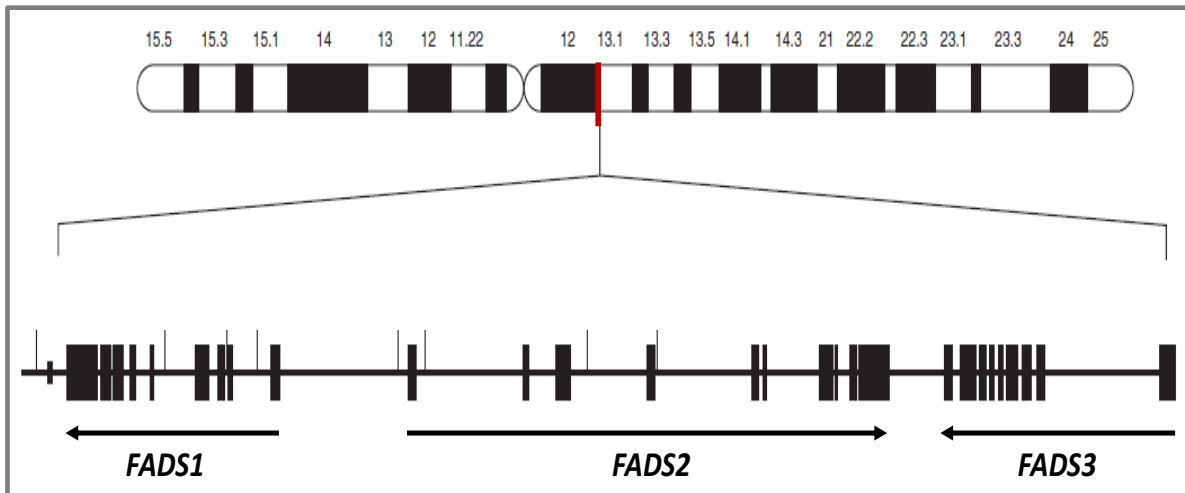


Figura 13. Localización de los genes *FADS1* y *FADS2* en el clúster *FADS* del Cromosoma 11 del Genoma Humano.

3.1.2. Elongasa-2 y Elongasa-5: genes *ELOVL2* y *ELOVL5*

Ambas Elongasa-2 y -5 participan en la síntesis de los AGPI-CL y son las responsables de insertar dos átomos de carbono en cada etapa de elongación. Estas enzimas están codificadas por los genes *ELOVL2* y *ELOVL5*, respectivamente. La Elongasa-5 participa en la elongación de los AG de 18 a 20 carbonos, mientras que la Elongasa-2 cataliza la síntesis de de AGPI-CL de 20 a 22 carbonos, aunque se ha observado en modelos animales que ambas enzimas pueden elongar el AA y EPA hasta sus derivados próximos A y DPA, respectivamente. Son proteínas de membrana “multi-pass”, *ELOVL5* tiene en su composición 299 aminoácidos mientras que *ELOVL2* tiene 296 aminoácidos. Ambas enzimas se expresan más en el cerebro seguido de los testículos [172]. Ambos genes están ubicados en el Cromosoma 6, *ELOVL5* (6p21.1-p12.1) y *ELOVL2* (6p24.2) pero en diferentes posiciones (**Figura 14**).

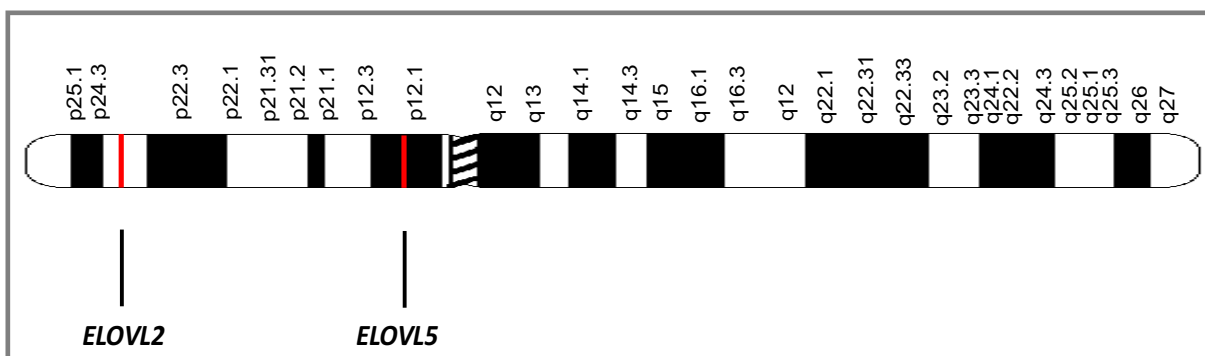


Figura 14. Localización de los genes *ELOVL2* y *ELOVL5* en el Cromosoma 6 del Genoma Humano.

3.1.3. Actividad enzimática de desaturasas y elongasas

La relación entre las concentraciones de producto:precursor de las reacciones catalizadas por las desaturasas y elongasas se han venido utilizando como fuertes indicadores de la eficacia de los enzimas y como una aproximación para la actividad enzimática. De esta manera se ha establecido que la relación DGLA:LA representa de mejor manera la actividad de la D6D, aunque es el GLA el producto inmediato de D6D, éste se metaboliza muy rápido hasta DGLA obteniéndose concentraciones muy bajas a nivel plasmático. La D5D se mide con la relación AA:DGLA. En el caso de las elongasas, todavía existen muy pocos estudios que han valorado su actividad enzimática, así para Elongasa-5 la relación DGLA:GLA es la más utilizada seguida de la relación DPA:EPA y A:AA, siendo este último ratio utilizado también para medir la actividad de la Elongasa-2 [173-175] (**Figura 15**).

3.2. Variantes genéticas de *FADS1* y *FADS2* y su relación con los niveles de AGPI-CL en los tejidos humanos

La importante función de la D5D y D6D en la síntesis de AGPI-CL hizo que los genes que codifican a estas enzimas, genes candidatos perfectos para estudios de asociación de polimorfismos genéticos con los niveles de AGPI y AGPI-CL en los fluidos y tejidos humanos. Todos los estudios de asociación con los niveles de ácidos grasos que se han publicado hasta el momento muestran asociaciones significativas entre los genotipos planteados y los niveles de AGPI y AGPI-CL [168, 176].

En el año 2006, el primer estudio de asociación genética en la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos del suero realizado por Schaeffer y colaboradores [171], reveló asociaciones significativas de SNPs en los genes *FADS* con varios AGPI n-3 y n-6. Se realizó el estudio de 18 SNPs en 727 adultos de raza blanca (Estudio ECRHS, Alemania), de donde se obtuvieron resultados altamente significativos para 11 SNPs, los cuales están ubicados en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento, y todos los ácidos grasos analizados (valores de $p < 1.0 \times 10^{-13}$) a excepción de docosapentaenoico (C22:5 n-6) y el DHA (C22:6 n-3). Se observó que los portadores de alelos minoritarios de los 11 SNPs mostraron concentraciones más altas de los sustratos (LA y ALA) y concentraciones más bajas de los productos (AA y EPA) de la desaturasa, comparados con los portadores de los alelos mayoritarios. No se encontraron asociaciones entre las variantes genéticas y los niveles

de DHA, lo que apoyaría la idea que endógenamente se sintetiza poco DHA y que las concentraciones séricas de DHA son determinadas principalmente por el aporte dietético de DHA preformado obtenido del consumo de pescado y otras fuentes alimenticias.

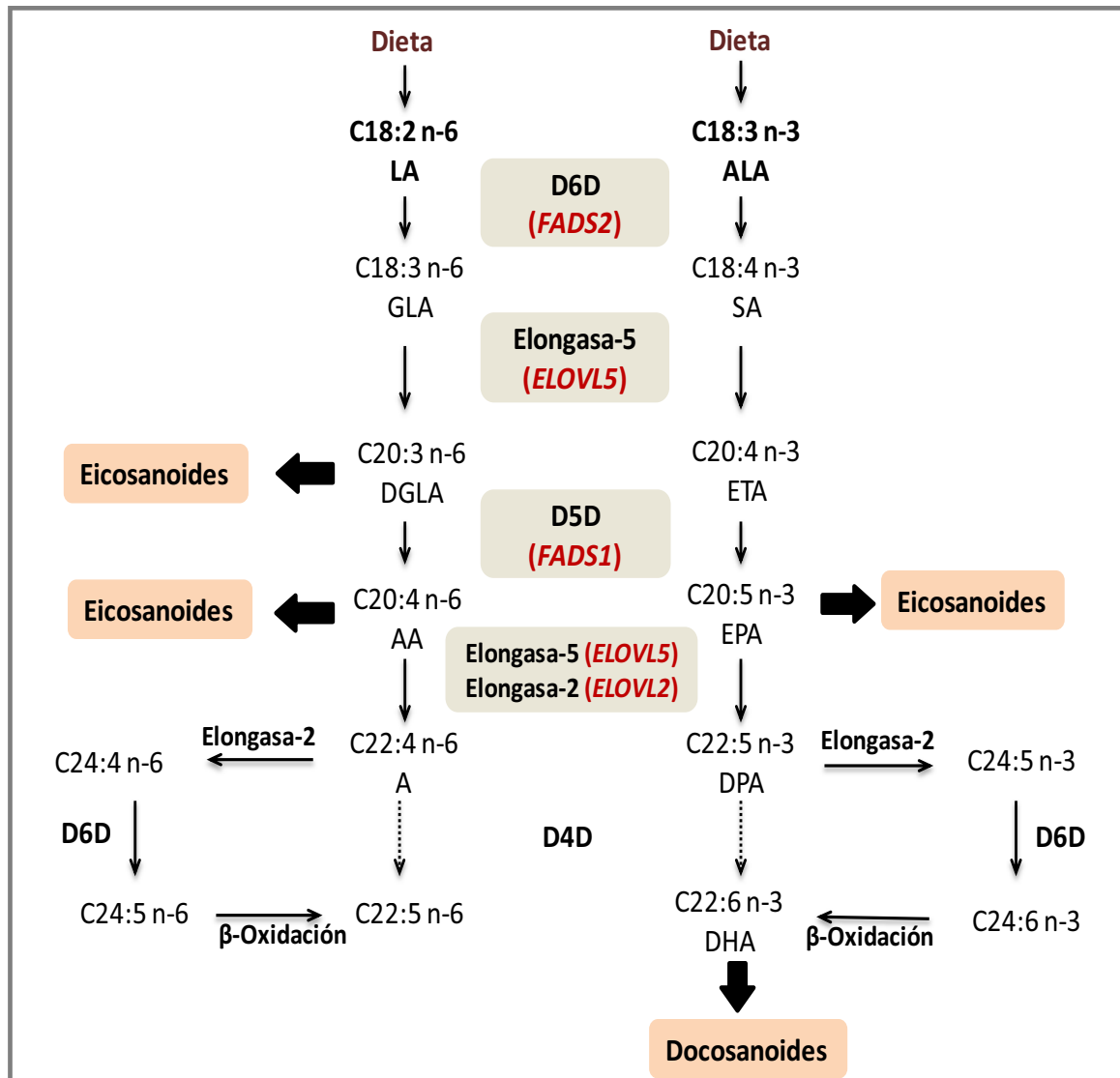


Figura 15. Desaturasas y Elongasas que participan en la biosíntesis de AGPI-CL. D6D (codificada por el gen *FADS2*). D5D (codificada por el gen *FADS1*). Elongasa-5 (codificada por el gen *ELOVL5*). Elongasa-2 (codificada por el gen *ELOVL2*).

Esto llevó plantear la hipótesis de que los portadores de **alelos minoritarios** tienen una menor habilidad para convertir endógenamente los ácidos grasos precursores en sus productos de cadena más larga [171]. El análisis de haplotipos también indicó asociaciones altamente significativas entre los haplotipos y los niveles de AG, manteniéndose esta asociación incluso después de aplicar tests de corrección múltiple y fueron concordante con el análisis inicial de SNPs. La variabilidad en los niveles de ácidos

grasos explicada por las variantes genéticas de los 11 SNPs analizados fue alta para el ácido araquidónico (28,5%), seguida de sus precursores EDA (C20:2 n-6) (12%) y el DGLA (10%), y fue baja para C22:5n-6 y C22:6n-3 (DHA) entre el 1 y 3%. Esta variabilidad tan alta explicada genéticamente en el caso del ácido araquidónico es muy poco común y casi no se ha visto en cualquier estudio de asociación genética. Normalmente, los polimorfismos genéticos explican aproximadamente el 1% del riesgo de una enfermedad compleja, y una de las variaciones más altas observadas hasta el momento explicada genéticamente de un metabolito ha llegado sólo hasta el 6% para el ácido úrico y polimorfismos de SLC2A9. Esto pone de manifiesto el papel esencial de las desaturasas en la síntesis endógena del ácido araquidónico, mientras que en el caso del DHA es más dependiente de la ingesta dietética [168, 171].

En vista de los resultados obtenidos, esta asociación fue replicada en otros estudios (gen candidato y de todo el genoma), involucrando a poblaciones de ascendencia europea, asiática y africana, mujeres embarazadas, niños y adultos, incluyendo también otros tejidos, como fosfolípidos de membrana de eritrocito, fosfolípidos del plasma del cordón umbilical, tejido adiposo y leche humana. La **Tabla 6** muestra en resumen los resultados más relevantes obtenidos en estudios prospectivos de cohortes al nacimiento, y en la **Tabla 7** resultados de estudios de replicación en la población adulta con las asociaciones más significativas, en ellos se confirman los resultados obtenidos por Schaeffer, los portadores de los alelos minoritarios de los SNPs estudiados del clúster *FADS* están asociados con una baja capacidad de sintetizar principalmente AA.

Además, algunos estudios encontraron una asociación fuerte entre las variantes genéticas de *FADS1* y *FADS2* en mujeres embarazadas y los niveles de DHA en el recién nacido (cordón umbilical)[4, 170, 175, 177-179]. Se conoce la importancia particular del DHA durante el embarazo y la infancia temprana por su función como componente estructural del cerebro y la retina. Los resultados indican que los genotipos tanto de la madre como del niño influyen en los niveles de DHA plasmáticos y que los genotipos de la madre podrían afectar el suministro de DHA al niño durante el embarazo y la lactancia, ya que se han registrado que los portadores de los alelos minoritarios de los SNPs estudiados están asociados también con una baja capacidad de sintetizar DHA.

Tabla 6. Asociación entre las variantes genéticas de *FADS1* y *FADS2* de la madre y el niño con las concentraciones de ácidos grasos en diferentes fluidos corporales*.

Año	Casos	SNPs	Ubicación-SNPs	Muestra	p (AG más significativo)	Ref.
2012	2000 (m/h)	rs174576, rs174579, rs174448, rs2727271, rs174634, rs1744449, rs968567, rs526126, rs174455, rs174602, rs174570, rs174556, rs174561, rs3834458, rs174548, rs174574, rs174578	<i>FADS1</i> /2/3	Plasma de Cordon umbilical	Análisis simple: 1.0×10^{-3} (\uparrow LA, EDA, DGLA y \downarrow AA, A) en las madres y 5.0×10^{-2} en los hijos. Aplotipos: 1.0×10^{-3} (\downarrow AA).	[180]
2012	4342 (ME) 3343 (CU) 5240(N)	rs1535, rs174575	<i>FADS2</i>	RBC. Plasma del cordón umbilical	Análisis simple: 1.0×10^{-9} (\uparrow LA, ALA y \downarrow AA, EPA, DHA) en ME y N.	[177]
2011	4136 (ME)	rs174556, rs174561, rs3834458, rs174548, rs174574, rs174578	<i>FADS1</i> /2/3	PL de RBC	Análisis simple: 1.0×10^{-3} (\downarrow AA y DHA).	[170]
2011	772 (ML)	rs174547, rs174556, rs174626, rs1000778, rs174455	<i>FADS1</i> /2/3	Leche humana	Análisis simple: 1.0×10^{-3} (\downarrow AA y DHA).	[178]
2011	270 (ME)	rs174537, rs174570, rs2072114, rs174602, rs174464	<i>FADS1</i> /2/3	Leche humana (calostro)	Análisis simple: 1.0×10^{-2} (\downarrow AA, y DHA).	[175]

*Los resultados representan las asociaciones entre los alelos minoritarios de los SNPs estudiados y los niveles de AG. LA (ácido linoleico). GLA (ácido γ -linolénico). EDA (ácido eicosadienoico). DGLA (ácido dihomo- γ -linolénico). AA (ácido araquidónico). ALA (ácido α -linolénico). EPA (ácido eicosapentaenoico). DHA (ácido docosahexaenoico). m/h (pares de madres e hijos analizados en el estudio). Ad (adolescentes). N (niños). CU (cordón umbilical). ME (mujeres embarazadas). ML (mujeres lactantes). P (plasma). E (eritrocitos). LM (leche materna). TA (tejido adiposo). PL (fosfolípidos). RBC (glóbulos rojos de la sangre). A-D5D (actividad enzimática de la $\Delta 5$ -desaturasa).

Tabla 6. Continuación.

Año	Casos	SNPs	Ubicación-SNPs	Muestra	p (AG más significativo)	Ref.
2010	309 (ME)	rs174561, s174575, rs3834458	<i>FADS1/2</i>	PL del plasma Leche humana	Plasma: $<1.0 \times 10^{-3}$ (\uparrow LA, GLA, DGLA y \downarrow AA). Leche humana: $<1.0 \times 10^{-3}$ (\uparrow LA, DGLA y \downarrow AA).	[179]
2010	1144 (Ad)	rs968567, s174546, rs174602	<i>FADS1/2</i>	PL del suero	Análisis simple: $<6.1 \times 10^{-5}$ (\uparrow LA y \downarrow AA, A-D5D). Aplotipos: $<1.0 \times 10^{-5}$ (\downarrow AA, A-D5D).	[174]
2010	879 (N)	rs174545, s174546, rs174556, s174561, rs3834458	<i>FADS1/2</i>	Suero y PL del plasma	Análisis simple: $<2.0 \times 10^{-3}$ (\uparrow LA y \downarrow GLA, AA y DHA).	[181]
2008	69 (P/E) 54 (LM) (ME)	rs174553	<i>FADS1</i>	Plasma, PL de eritrocitos Leche humana	Plasma: $<1.0 \times 10^{-3}$ (\uparrow LA, EDA y \downarrow AA). Eritrocitos: $<1.0 \times 10^{-3}$ (\uparrow DGLA, \downarrow AA). Leche humana: $<1.0 \times 10^{-2}$ (\downarrow AA, EPA, DHA).	[4]

*Los resultados representan las asociaciones entre los alelos minoritarios de los SNPs estudiados y los niveles de AG. LA (ácido linoleico). GLA (ácido γ -linolénico). EDA (ácido eicosadienoico). DGLA (ácido dihomo- γ -linolénico). AA (ácido araquidónico). ALA (ácido α -linolénico). EPA (ácido eicosapentaenoico). DHA (ácido docosahexaenoico). m/h (pares de madres e hijos analizados en el estudio). Ad (adolescentes). N (niños). CU (cordón umbilical). ME (mujeres embarazadas). ML (mujeres lactantes). P (plasma). E (eritrocitos). LM (leche materna). TA (tejido adiposo). PL (fosfolípidos). RBC (glóbulos rojos de la sangre). A-D5D (actividad enzimática de la $\Delta 5$ -desaturasa).

Tabla 7. Asociación entre las variantes genéticas de *FADS1* y *FADS2* en la población adulta con las concentraciones de ácidos grasos en diferentes fluidos corporales*.

Año	Casos	SNPs	Ubicación-SNPs	Muestra	p (AG más significativo)	Ref.
2009	163 (P) 535 (E)	rs174556, rs174561, rs3834458	<i>FADS1</i> /2	PL del plasma y membranas de eritrocitos	Análisis simple: 7.9×10^{-10} (\uparrow DGLA) en eritrocitos. Aplotipos: 7.8×10^{-11} (\downarrow AA) en plasma y 2.7 $\times 10^{-9}$ (\uparrow DGLA) en eritrocitos.	[182]
2009	1210 1076 (rep)	rs174537	<i>FADS1</i>	Plasma	Estudio inicial: $5.951.0 \times 10^{-46}$ (\downarrow AA) [183] Estudio de replicación: $<1.0 \times 10^{-3}$ (\downarrow AA).	[183]
2008	658	rs174545, rs174556, rs174561, rs3834458, rs174570, rs174583, rs174589, rs174611, rs174627	<i>FADS1</i> /2/3	PL del suero y membranas de eritrocitos	Análisis simple: $<1.0 \times 10^{-4}$ (\downarrow AA) en suero [184] y eritrocitos. Aplotipos: 3.7×10^{-4} (\downarrow AA) en suero y <2.0 $\times 10^{-4}$ (\downarrow AA) en eritrocitos.	[184]
2007	196 (P) 1820 (TA)	rs3834458	<i>FADS1</i> /2	Plasma y tejido adiposo	Plasma: $<1.0 \times 10^{-4}$ (\downarrow AA). [185] Tejido adiposo: $<1.0 \times 10^{-4}$ (\downarrow GCLA, AA, EPA).	[185]
2006	727	rs174544, rs174553, rs174556, rs174561, rs968567, rs99780, rs3834458, rs174570, rs2072114, rs174583, rs174589	<i>FADS1</i> /2	PL del suero	Análisis simple: $<1.0 \times 10^{-13}$ (\downarrow AA). [171] Aplotipos: 3.7×10^{-15} (\downarrow AA).	[171]

*Los resultados representan las asociaciones entre los alelos minoritarios de los SNPs estudiados y los niveles de AG. LA (ácido linoleico). GLA (ácido γ -linolénico). EDA (ácido eicosadienoico). DGLA (ácido dihomo- γ -linolénico). AA (ácido araquidónico). ALA (ácido α -linolénico). EPA (ácido eicosapentaenoico). DHA (ácido docosahexaenoico). P (plasma). E (eritrocitos). TA (tejido adiposo). PL (fosfolípidos).

También hemos considerado aquellos estudios donde se analiza la asociación de las variantes genéticas del niño con sus propios niveles plasmáticos de AGPI, establecidas a diferentes edades (**Tabla 6**), hasta el momento sólo dos estudios han investigado estas asociaciones. Rzehak y colaboradores, en 2010 analizaron las influencias genéticas de 5 SNPs localizados en el cluster *FADS* y los niveles de AG en dos cohortes de niños a los 2 años de vida [181]. Donde se encontraron fuertes asociaciones de los portadores de los alelos minoritarios de todos los SNPs con los niveles de AGPI incluyendo DHA, excepto con ALA y EPA. Recientemente Steer y colaboradores, en 2012 realizaron un estudio de dos SNPs (rs1535 y rs174575) del gen *FADS2*, en 5240 niños a los 7 años de vida [177]. Los resultados obtenidos indicaron que los portadores de los alelos minoritarios de estos SNPs están asociados con una baja capacidad de sintetizar AA y DHA, en este estudio también se analizó las influencias genéticas de la madre sobre los niveles de AG de los recién nacidos y niños (7 años), corroborándose la influencia genética de la madre sólo sobre los niveles del recién nacido y no a largo plazo, es decir, que los niveles de AG de los niños están relacionados únicamente con su propio metabolismo sin influencias duraderas aparentes del medio ambiente en el útero [177].

Finalmente un estudio realizado en una población de adolescentes (14.7 años±1.4) en 2010, mostró que las variantes genéticas de 12 de los 13 SNPs analizados no sólo están asociadas con los niveles de AG sino también están asociadas con la actividad enzimática de las desaturasas, especialmente se encontraron que los portadores de los alelos minoritarios están asociados con una baja actividad enzimática de la D5D, medida como la relación AA:DGLA. Mientras que los portadores de los alelos minoritarios del SNP rs968567 están asociados con una alta actividad D6D [174].

Además, los genotipos de *FADS* no están solamente asociados con las concentraciones de AGPI-CL; varios GWAS (del inglés, *Genome-wide Association Study*) en rasgos de lípidos complejos encontraron asociaciones de los polimorfismos *FADS* con lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol total y triglicéridos (TG), sugiriendo que la ruta de desaturación podría ser muy importante para la homeostasis de lípidos en el cuerpo humano [183, 185-187].

3.3. Variantes genéticas del clúster *FADS* y *ELOVL* y riesgo de enfermedad en la infancia

Un importante campo de interés cuando se habla de ácidos grasos y salud infantil es el de las enfermedades atópicas, ya que afecta a un número creciente de niños y adultos y que es considerado como una de las cargas de salud de los países industrializados. Hasta ahora, no existen resultados consistentes en la asociación directa de los polimorfismos de *FADS* y tampoco existe ninguna información respecto a los polimorfismos de *ELOVL* con las enfermedades atópicas (**Tabla 8**).

El primer estudio que evaluó las posibles asociaciones entre los SNPs de *FADS* y las enfermedades atópicas fue realizado en una cohorte de adultos, Schaeffer y colaboradores en su estudio observaron una menor prevalencia de rinitis alérgica y eczema atópico en los portadores de los alelos minoritarios de varios SNPs (rs174544 y rs2072114 para rinitis alérgica; y rs174556 para eczema atópico); sin embargo, las asociaciones no fueron significativas después de aplicar tests de corrección múltiple [171].

Por otro lado, el primer estudio realizado en una cohorte de niños fue desarrollado por Rzehak y colaboradores, quienes estudiaron asociaciones entre variantes genéticas en el clúster *FADS* y el desarrollo de eczema en niños de 2 años de edad [181]. Se analizaron dos cohortes de nacimiento: una en Holanda (n=546) (KOALA, del holandés *Kind, ouders en gezondheid: Aandacht voor Leefstijl en Aenleg*) y otra en Alemania (n=333) (LISA, del inglés *Influences of Lifestyle-related factors on the immune system and the development of allergies in childhood*). Todos los SNPs analizados mostraron fuertes asociaciones con el eczema en la cohorte del estudio LISA, pero no en la cohorte del estudio KOALA. Dado los resultados inconclusos los autores recomendaron realizar más investigaciones que ayuden a esclarecer los posibles nexos directos con la enfermedad. Posteriormente, Singmann y colaboradores, analizaron las asociaciones entre 5 variantes genéticas del clúster *FADS* y las enfermedades atópicas en niños de 6 años de edad (rinitis alérgica, asma, eczema atópico) de dos cohortes alemanas de nacimiento GINIplus y LISApplus [188]. No se encontraron relaciones directas entre los polimorfismos estudiados y las enfermedades. Diferentes factores influyen en el desarrollo de las enfermedades, lo que sugiere que debe haber una combinación heterogénea entre los factores genéticos y

ambientales en la evolución de la enfermedad, es posible que los genes del clúster *FADS* no sean factores suficientemente fuertes para sobresalir sobre los demás.

Recientes estudios han evaluado la interacción gen-dieta como una manera de establecer las asociaciones donde se conjuga la influencia de la genética como de la dieta sobre la respuesta de la enfermedad. En el primer estudio, se analizó la influencia de los genotipos *FADS* en la asociación entre la ingesta de AG, enfermedades atópicas y sensibilización alérgica en niños de 10 años de edad, en dos estudios prospectivos de cohorte al nacimiento en Alemania [189]. La ingesta de margarina y el cálculo de la ingesta de ácidos grasos fueron analizados utilizando un cuestionario de frecuencia de alimentos, la información de enfermedades atópicas fue recolectada utilizando un cuestionario completado por los padres y se determinó la IgE como parámetro de sensibilización alérgica. En este estudio, no se detectó una asociación directa entre los genotipos *FADS* y las enfermedades atópicas (asma, eczema atópico) o la sensibilización atópica (medida por IgE), y la ingesta dietética de ácidos grasos tampoco estuvo asociada con la alergia en el análisis inicial. Sin embargo, en un análisis adicional, estratificado por genotipos *FADS*, un mayor consumo diario de margarina estuvo asociado significativamente con un mayor riesgo de asma solamente en los individuos portadores de 2 copias del alelo mayoritario. Este resultado podría explicar los resultados parcialmente inconsistentes entre la ingesta de AG y las enfermedades atópicas y resalta la importancia de incluir datos genéticos en dichos estudios. Aunque el estudio tiene varias limitaciones (pequeño tamaño de muestra en el análisis estratificado), parece posible que las personas con cierto fondo genético son más sensibles a influencias nutricionales y más predispuestas al desarrollo de desórdenes atópicos bajo ciertas condiciones de nutrición.

Los mecanismos que hacen de los portadores del alelo mayoritario de *FADS* más susceptibles a desarrollar asma se desconocen; sin embargo, uno podría especular que un mayor porcentaje de procesos inflamatorios en portadores de alelo mayoritario podría jugar un papel en la predisposición a enfermedades atópicas. Esta presunción está basada en una mayor capacidad de los portadores del alelo mayoritario para convertir los AG n-6 (que son muy abundantes en la margarina) en sus productos AGPI-CL n-6, los cuales a su vez son precursores de eicosanoides proinflamatorios [189, 190].

Tabla 8. Asociación entre los polimorfismos del clúster *FADS* y las enfermedades atópicas.

Año	Casos	SNPs	Ubicación-SNPs	Enfermedad	Resultados	Ref.
2010	2718 (6 años)	rs174545, rs174546, rs174556, rs174561, rs3834458	<i>FADS1/2</i>	Asma, bronquitis, eczema, alergia al polen	No asociaciones con las enfermedades atópicas.	[188]
2010	333 (A) 542 (H) (2 años)	rs174545, rs174546, rs174556, rs174561, rs3834458	<i>FADS1/2</i>	Eczema IgE	SNPs están asociados con el eczema en la cohorte de Alemania pero no en la cohorte de Holanda No asociaciones con niveles de IgE.	[181]
2006	727 adultos	rs174544, rs174553, rs174556, rs174561, rs968567, rs99780, rs3834458, rs174570, rs2072114, rs174583, rs174589	<i>FADS1/2</i>	Rinitis alérgica y eczema atópico IgE	Alelos minoritarios de los SNPs están asociados con un menor riesgo de rinitis y eczema atópico en el análisis simple. Después de aplicar tests de corrección múltiple, no se encontraron asociaciones significativas. No asociaciones con IgE.	[171]

SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido). A (Alemania). H (Holanda).

El segundo estudio en la misma cohorte de niños investigó el efecto de la duración de la alimentación exclusiva con leche materna en la presencia de asma hasta los 10 años de edad y la influencia de los genotipos *FADS* en esta asociación [191]. La lactancia materna es ampliamente reconocida como beneficiosa para la reducción del riesgo de asma y atopía, aunque no todos los resultados son concluyentes. Los mecanismos biológicos subyacentes no se comprenden del todo, pero los AGPI-CL que contiene la leche humana, podrían jugar un papel principal. En ese estudio, la prevalencia de asma disminuyó con un incremento en la duración de la alimentación exclusiva de leche materna (1-2 meses, prevalencia de asma del 13%; 3-4 meses, prevalencia de asma del 11%; 5-6 meses, prevalencia de asma del 9%). De nuevo, los genotipos *FADS* no estuvieron directamente asociados con la prevalencia de asma, aunque la prevalencia fue ligeramente menor en los portadores del alelo minoritario. Cuando se evaluó el efecto de la lactancia materna en la prevalencia de asma en un segundo análisis estratificado por genotipo, la prevalencia de asma se redujo significativamente solamente en los niños que habían sido exclusivamente alimentados con leche materna al menos 3 meses y eran portadores de al menos una copia del alelo minoritario de los SNPs investigados. En contraste, los niños homocigotos para el alelo mayoritario no mostraron un beneficio significativo por haber sido alimentados exclusivamente con leche materna [190, 191].

Estos resultados sugieren que ciertos grupos de niños con un fondo genético definido son más sensibles a las influencias nutricionales. Solamente aquellos niños que son menos capaces de convertir los AGPI precursores en sus productos de cadena más larga muestran un beneficio después de al menos 3 meses de alimentación exclusiva con leche materna. En un estudio previo, se demostró que las madres portadoras de los alelos minoritarios de varios SNPs en los genes *FADS* tienen menores niveles de AA en la leche materna durante los 1.5 a los 6 meses de lactancia. Puede pasar que los niños que portan al menos un alelo minoritario tengan una madre que también porte un alelo minoritario que los niños que son homocigotos para el alelo mayoritario, debido a reglas de la herencia. Estos niños podrían, por tanto, ganar una ventaja del bajo abastecimiento de AA por la leche materna y su propia baja capacidad de convertir los AGPI precursores en AA en dicha leche. En contraste, un alto abastecimiento de AA durante la lactancia podría no aportar algún beneficio para los niños alimentados con leche materna, comparados con los niños alimentados con fórmula, en términos de riesgo de asma.

Debido a que los genotipos maternos no estuvieron disponibles en este estudio y los ácidos grasos de la leche materna no fueron incluidos, la influencia del genotipo materno y la composición de ácidos grasos en el riesgo de asma de los niños no pudieron ser determinadas.

Por lo tanto, especialmente en familias con predisposición genética, un suministro óptimo de la dieta de precursores de eicosanoides, tales como DGLA, AA o EPA, podrían ser la clave para la prevención de las enfermedades atópicas.

3.4. Expresión génica de los genes *FADS* y *ELOVL* y riesgo de enfermedad

Es importante comprender si los cambios de los genes que codifican a las desaturasas y elongasas se dan no solo a nivel estructural (presencia de SNPs) sino también a nivel transcripcional (mRNA, del inglés *Messenger RiboNucleic Acid*), es decir, conocer si existe una adecuada formación de la proteína que cumpla con la función de enzima. Hasta el momento, sólo un estudio se ha llevado a cabo en este campo, Saaf y colaboradores investigaron el perfil global de genes implicados en el desarrollo del eczema atópico, tanto del metabolismo lipídico como genes del sistema inmunitario en la piel de adultos que sufren eczema atópico utilizando chips “microarrays” de ADN [38]. Los chips de ADN se usan para analizar la expresión diferencial de genes, y se monitorean de manera simultánea los niveles de miles de ellos. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*), y la molécula diana (*target*), y se indican generalmente mediante fluorescencia y a través de un análisis de imagen, lo cual indica el nivel de expresión del gen [192].

Los autores pudieron comprobar que las personas atópicas tienen una baja expresión de los genes que codifican a D5D (*FADS1*) y D6D (*FADS2*); sin embargo no se registraron cambios de expresión en los genes que codifican a las elongasas (*ELOVL2* y *ELOV5*), estos resultados sugieren que probablemente las alteraciones de los niveles plasmáticos de AGPI n-6 registrados en individuos atópicos se deba a que no existe una suficiente formación estructural de las enzimas, no obstante, son necesarios más estudios ya que no se cuenta con información sobre los cambios de expresión de estos genes en la población infantil, donde la prevalencia de las enfermedades atópicas es más alta.

En resumen los resultados presentados hacen de los genes *FADS* y *ELOVL*, buenos candidatos de estudio y subrayan la importancia de una mayor investigación sobre los efectos de las variantes genéticas de los genes en la asociación con los niveles de AGPI-CL y los fenotipos de las enfermedades alérgicas.

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

General

El objetivo principal de esta tesis fue investigar la posible asociación entre la composición de ácidos grasos plasmáticos *trans* y ácidos grasos poliinsaturados de las madres y sus hijos y el desarrollo de las enfermedades atópicas en la primera etapa de la vida.

Específicos

1. Optimizar y validar un método por cromatografía rápida de gases para la determinación de los ácidos grasos totales, incluyendo los ácidos grasos *trans* en plasma y leche materna.
2. Evaluar la relación entre los niveles plasmáticos de ácidos grasos *trans* (elaídico, *t*-vaccénico y ruménico) durante el embarazo y el desarrollo de manifestaciones atópicas en el primer año de vida.
3. Valorar la asociación entre los niveles de ácidos grasos esenciales (LA y ALA) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AA, EPA y DHA) en el plasma materno y plasma de cordón umbilical y el desarrollo del eczema atópico en el primer año de vida.
4. Estudiar el impacto de las variantes genéticas de los genes *FADS* y *ELOVL* de la madre y del hijo sobre la composición en ácidos grasos del recién nacido.
5. Analizar el impacto de las variantes genéticas de los genes *FADS* y *ELOVL* de la madre y del recién nacido sobre el desarrollo de las manifestaciones atópicas en los primeros 4 años de vida del niño.
6. Investigar como los cambios de expresión de genes envueltos en la biosíntesis de AGPI-CL pueden afectar a la composición en ácidos grasos y estar asociados con el riesgo de desarrollo del eczema atópico en niños de 4 años de edad.

DISEÑO EXPERIMENTAL

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de cumplir los objetivos específicos mencionados en el apartado anterior, se ha elaborado un diseño experimental basado en las tres etapas expuestas a continuación:

1. Metodología analítica

- 1.1. Desarrollo y validación de un método analítico rápido que permita determinar los ácidos grasos *trans* en los fosfolípidos del plasma humano y leche materna, dentro de un perfil de ácidos grasos completo, por cromatografía de gases rápida (**Publicación 1**).

2. Estudios sobre la influencia de la composición plasmática de ácidos grasos en el desarrollo de enfermedades atópicas

- 2.1. Estudio del efecto de la composición de AGT del plasma materno durante el embarazo sobre el desarrollo de eczema atópico y sibilancias en el primer año de vida (**Publicación 2**).
- 2.2. Estudio del efecto de la composición de AGE y AGPI del plasma materno y del plasma del cordón umbilical sobre el desarrollo de eczema atópico en el primer año de vida (**Publicación 3**).

3. Estudios sobre la influencia de factores genéticos sobre la composición de ácidos grasos y enfermedades atópicas

- 3.1. Estudio del efecto de las variantes genéticas de los genes que codifican a las desaturasas (*FADS*) y elongasas (*ELOVL*) de la madre y del niño sobre la composición de ácidos grasos del niño y, exploración de la posible asociación con el eczema atópico y sibilancias en los primeros 4 años de vida (**Publicación 4**).

- 3.2. Estudio del efecto de los cambios de expresión génica de los genes que codifican a las desaturasas y elongasas en niños de 4 años de edad sobre el desarrollo de eczema atópico (**Publicación 5**).

METODOLOGÍA

VI. METODOLOGÍA

La metodología empleada en la presente tesis doctoral se explica con detalle en los apartados correspondientes de materiales y métodos de los cinco trabajos de investigación diseñados. En este apartado únicamente se presenta la información del proyecto del cual se obtuvieron los datos para la realización de esta tesis doctoral. Al final del mismo se incluye un breve comentario de los aspectos éticos relacionados con la investigación clínica.

1. Población de estudio: Proyecto INMA

El proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente) es un estudio epidemiológico de cohorte prospectivo, multicéntrico y multipropósito que se desarrolla en España con el objetivo general de investigar el papel de los contaminantes ambientales y de la dieta sobre el crecimiento y desarrollo fetal y del niño. El estudio INMA se compone de 7 cohortes (**Figura 16**), tres de las cuales existían previamente antes de la configuración definitiva de la red INMA en 2003 (Ribera de l'Ebre, Menorca y Granada) que se completa con la creación de cuatro cohortes nuevas con un protocolo de estudio común (Asturias, Guipúzkoa, Sabadell y Valencia) [193].

Esta tesis doctoral se centra en el tratamiento de datos obtenidos de la Cohorte de INMA-Sabadell. En la ciudad de Sabadell el programa de atención a la gestante se inicia con la primera visita, aproximadamente entre la 4ª y la 6ª semanas de gestación, realizada por la matrona en el "CAP II Sant Félix", único centro de atención primaria especializado de la ciudad. Las mujeres que atendieron al programa entre julio de 2004 y julio de 2006 fueron invitadas a participar al estudio, siempre y cuando cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión: embarazo único, sin enfermedades crónicas previas al embarazo (hipertensión crónica, arterioesclerosis, insuficiencia renal crónica, vasculitis, cánceres, alcoholismo, drogadicción), mayores de 16 años, que no hubieran seguido un programa de reproducción asistida, sin problemas de comunicación y que tuvieran intención de dar a luz en el Hospital de Sabadell (Corporació Sanitària Parc Taulí) [194].



Figura 16. Localización geográfica de las siete cohortes de estudio del Proyecto INMA, distinguiendo entre las cohortes *de novo* y las cohortes preexistentes.

El Hospital de Sabadell cubre toda la población de Sabadell, actuando como consulta especializada y hospital de referencia para el parto. Se incluyeron un total de 657 mujeres, que fueron seguidas en cada trimestre del embarazo hasta el momento del parto. A pesar de que la cohorte inicial reclutó 657 mujeres embarazadas, en cada publicación presentada en esta tesis doctoral se indica el número de participantes incluidos en cada análisis.

2. Recogida de datos

El proyecto engloba estudios observacionales de cohortes que monitorizan mujeres gestantes de la población general desde el primer trimestre hasta el parto y a sus hijos desde el nacimiento hasta los cuatro años. Se han realizado evaluaciones extensas a las mujeres embarazadas y niños. La información se ha recogido de diferentes fuentes: cuestionarios realizados en formato entrevista por entrevistadores entrenados, datos clínicos, exploración física, ecografías, muestras biológicas (sangre, placenta, orina, saliva,

leche materna cabello y uñas), cuestionarios de frecuencia alimentaria (CFA) y medidas ambientales.

En la figura 17 se muestra las generalidades de la información utilizada para la realización de esta tesis doctoral.

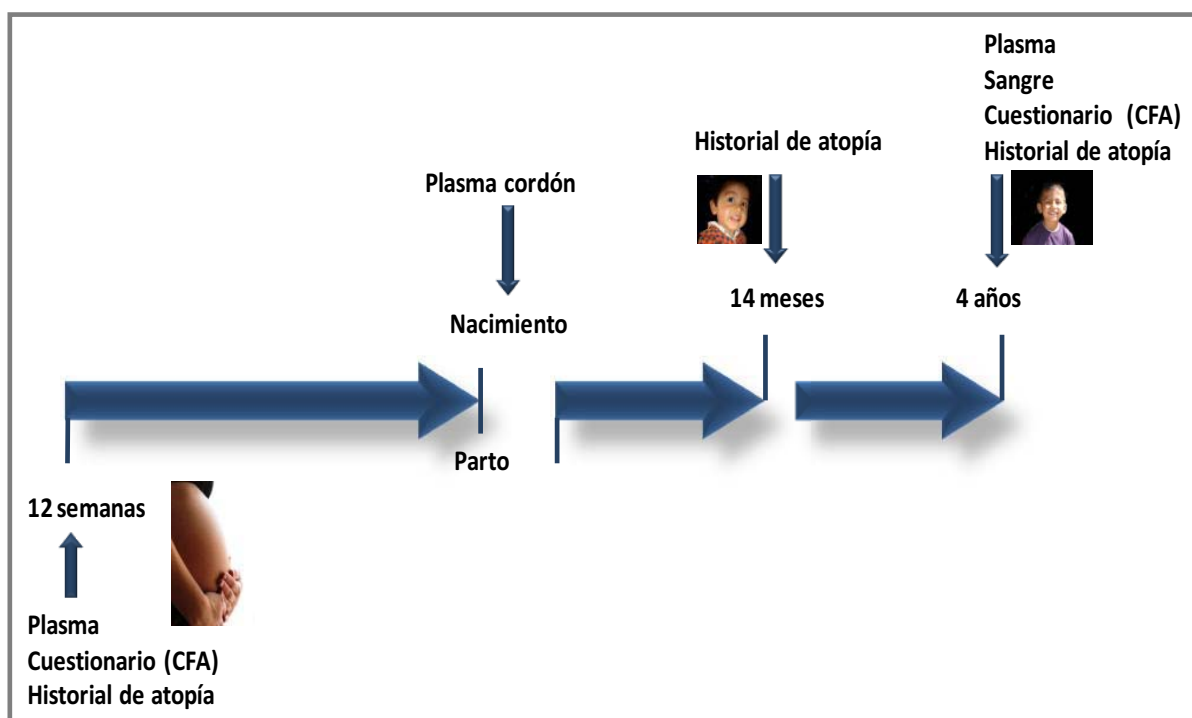


Figura 17. Diseño del estudio aplicado en la tesis doctoral. Recogida de datos y muestras biológicas. Cohorte INMA-Sabadell. CFA (Cuestionario de Frecuencia Alimentaria).

3. Aspectos éticos

El proyecto INMA-Sabadell fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria (CEIC-IMAS). Tras la aprobación del mismo, se procedió a la aprobación y consentimiento del protocolo del estudio por parte de los padres y madres, después de recibir información completa y adecuada. En este proceso se consideraron los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y a la Biomedicina, y de la Legislación Española en el ámbito de la investigación biomédica, y en los aspectos relativos a la protección de datos de carácter personal y la bioética. Las mujeres embarazadas que aceptaron participar en el estudio firmaron un formulario de consentimiento informado.

RESULTADOS

VII. RESULTADOS

Publicación 1

Elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid (c9,t11-CLA) determination in human plasma phospholipids and human milk by fast gas chromatography

.....

Determinación del ácido eláidico, ácido vaccénico y ácido ruménico en los fosfolípidos del plasma humano y en la leche humana por cromatografía de gases rápida

Autores: Aida Maribel Chisaguano, Blanca Lozano, Carolina Moltó-Puigmartí, Ana Isabel Castellote, Magdalena Rafecas y M. Carmen López-Sabater.

Revista: *Analytical Methods*

Año: 2013

Volumen: 5

Páginas: 1264-1272

.....

RESUMEN:

Objetivo: Desarrollar y validar un método por cromatografía de gases rápida para el análisis de los principales ácidos grasos *trans*, en el contexto de un acidograma completo, en fosfolípidos plasmáticos y leche materna.

Metodología: La separación de la fracción de fosfolípidos del plasma se optimizó utilizando placas de extracción en fase sólida (SPE) de 96 pocillos (NH₂, 100 mg). Para la separación cromatográfica se utilizaron dos columnas capilares cromatográficas rápidas, la RTX-2330 y la SP-2560, ambas de elevada polaridad pero de dimensiones distintas (40 m x 0,18 mm i.d. x 0,10 µm y 75 m x 0,18 mm i.d. x 0,14 µm, respectivamente). Utilizando patrones de ácidos grasos, fosfolípidos plasmáticos y leche humana se optimizó la separación cromatográfica en cada una de las dos columnas estudiadas. Posteriormente, se compararon las dos columnas en términos de resolución y tiempo de análisis. El método que proporcionó los mejores resultados fue validado y posteriormente utilizado para el análisis de los dos tipos de muestras biológicas.

Resultados: Para los patrones de ácidos grasos y para los fosfolípidos plasmáticos ambas columnas permitieron conseguir una separación adecuada de los ácidos grasos en tan sólo 14,2 minutos (RTX-2330) ó 32.2 minutos (SP-2560). Sin embargo, para la leche humana, la columna de 75 m fue la que proporcionó una mejor separación. Por tanto, la validación del método se realizó con la columna SP-2560 en términos de recuperación y precisión, obteniéndose unos porcentajes de recuperación entre el 95.8 y 103.7% y una precisión medida en términos de coeficientes de variación de los porcentajes de ácidos grasos entre el 0,76 y el 8.87%. La aplicación del método a distintas muestras de plasma y leche humana confirmó la sencillez, precisión y rapidez del mismo.

Conclusión: El método desarrollado y validado permite, en el contexto de un acidograma completo, la separación y cuantificación rápida, simple y precisa de los principales ácidos grasos *trans* de los fosfolípidos plasmáticos y de la leche materna.

Elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid (*c9,t11*-CLA) determination in human plasma phospholipids and human milk by fast gas chromatography

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, **5**, 1264

Aida Maribel Chisaguano, Blanca Lozano, Carolina Moltó-Puigmartí,
Ana Isabel Castellote, Magdalena Rafecas and M. Carmen López-Sabater*

An efficient fast gas chromatographic method for simultaneous determination of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid contents in human plasma phospholipids and human milk was optimized and validated. Two capillary columns, RTX-2330 and SP-2560, both of high polarity but with different dimensions (40 m × 0.18 mm I.D. and 0.10 μm film thickness, and 75 m × 0.18 mm I.D. and 0.14 μm film thickness, respectively), were compared for the separation of these fatty acids within a complete fatty acid profile. Separation with the SP-2560 column gave the best results. In comparison with the commonly used 100 m × 0.25 mm × 0.20 μm columns, this new type of fast column allowed the separation of fatty acid methyl esters with the same resolution but in less time, 32.2 min. In addition, separation of the phospholipid fraction in human plasma samples was optimized by using 96-well extraction plates filled with an aminopropyl phase. Recoveries ranged between 95.8% and 103.7%. Intra-assay and inter-assay precision ranged between 0.76% and 8.87%. Application of this method showed that it is a rapid and reliable method for quick and correct identification and quantification of these fatty acids in routine analysis.

Received 19th October 2012
Accepted 17th December 2012

DOI: 10.1039/c2ay26236c

www.rsc.org/methods

Introduction

Trans fatty acids (TFAs) are unsaturated fatty acids with at least one double bond in the *trans* configuration. Most of the TFAs in our diet are created by industrial hydrogenation and deodorization or come from natural ruminant sources, and have a different isomeric distribution depending on their origin. The most abundant group of TFAs in the human diet consists of the *trans*-C18:1 isomers. Elaidic acid (*t9*-C18:1) and *trans*-10-octadecenoic acid (*t10*-C18:1) are important markers for industrial fats, especially those formed by the partial hydrogenation of vegetable and fish oils. On the other hand, TFAs from natural sources come from dairy products and meat from ruminant animals and contain mostly vaccenic acid (*t11*-C18:1), which is generated by rumen bacteria *via* the biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids.¹ In turn, conjugated linoleic acid (CLA) includes the positional and geometrical isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. CLA isomers are found mainly in dairy fats and meat from ruminant animals as products of their ruminal activity; among the several isomers identified to date in these fats, the *c9,t11*-CLA isomer or commonly called rumenic acid is the main and supposedly most active one.² Recent research has shown that *trans*-vaccenic acid is involved in the synthesis of *c9,t11*-CLA in animals and humans.^{3,4} The

human anti-carcinogenic, anti-inflammatory and potentially anti-atherogenic effects of dietary *c9,t11*-CLA have been widely reported.^{5,6} The minor isomer *t10,c12*-CLA is also of interest because of its controversial biological effects found both in animals and in cell culture studies.^{7,8}

With regard to the impact on human health, high intake of TFAs has been suggested to interfere with essential fatty acid metabolism⁹ and has been demonstrated to increase some risk factors for developing cardiovascular and atopic diseases.^{10–13} Nevertheless, some observational studies suggest that TFAs from natural sources may be more weakly associated with these diseases than those from industrial sources.^{14–16}

Due to the potentially different effects of TFAs of industrial and natural origin, together with the singular effects of CLA on human health, the quantification of these fatty acids in biological samples is acquiring a great importance. In addition, since intake of TFA and CLA is reflected in the fatty acid composition of plasma phospholipids and human milk,^{17,18} it would be useful to use proportions of these components as biomarkers of intake. Therefore, adequate analytical techniques are required for the correct separation and identification of these fatty acids in biological samples due to the variety of bonds involving fatty acids and because of the nature of the matrix.

Traditionally, separation of TFAs and CLA isomers was carried out by gas chromatography (GC), both conventional and two-dimensional modalities.^{19–22} Highly polar cyanosilicone capillary columns (100 m × 0.25 mm I.D.) with 0.2 μm film thickness, available under different commercial names (CP

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: mclopez@ub.edu; Fax: +34 934035931; Tel: +34 934024512

Sil-88, HP-88 and SP-2560), are the most frequently used. With this approach, several isomers can still be separated, but the chromatographic run can last about 100 min (with variations depending on the column used, the temperature programme and, therefore, the number of isomers identified),^{23–26} and this represents a problem when the purpose is routine analysis of a large number of samples, as in the case of epidemiological studies.

Nowadays, fast gas chromatographic techniques have been gaining importance since new columns are available with a lower particle size and lower diameters, allowing a considerable reduction in the analysis time compared to traditional columns. Faster separation can be achieved by increasing the carrier gas flow rate and the temperature programme heating rates, using a faster carrier gas (*e.g.*, H₂), reducing the length and internal diameter of the column and the film thickness of the stationary phase or by using a detector that operates at a lower outlet pressure.²⁷

In this study a fast GC method for the separation and quantification of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid in biological matrices (human plasma and human milk) was developed and validated. To achieve this, we compared two fast capillary columns of high polarity but with different dimensions.

Materials and methods

Reagents and standards

Methanol (HPLC grade) and anhydrous sodium sulphate were purchased from Scharlab (Sentmenat, Spain). Sodium chloride, diethyl ether, 2-propanol, acetic acid, dichloromethane and chloroform were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). *n*-Hexane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). A 14% boron trifluoride methanol solution (BF₃/MeOH) and sodium methylate in methanol 0.5 M (NaOCH₃/MeOH) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sep-Pack vac 1 mL (100 mg) aminopropyl silica cartridges were purchased from Waters (Milford, USA). Discovery DSC-NH₂ SPE 96-well plates (NH₂, 100 mg per well) were purchased from Supelco (Bellefonte, USA).

Supelco 37-component fatty acid methyl ester (FAME) mix, polyunsaturated fatty acid (PUFA) methyl ester mix (animal source), linoleic acid methyl ester isomer (*t*9,*t*12-C18:2; *c*9,*t*12-C18:2; *t*9,*c*12-C18:2; *c*9,*c*12-C18:2) mix, individual reference standards of *trans*-9-elaidic acid (*t*9-C18:1), *trans*-11-vaccenic acid (*t*11-C18:1), *trans*-6-octadecenoic acid (*t*6-C18:1) and *cis*-6-octadecenoic acid (*c*6-C18:1) methyl esters, used for peak identification, and tridecanoic acid methyl ester (C13:0) and 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC-C15:0), used as the internal standards (IS), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Palmitelaidate acid methyl ester (*t*9-C16:1) and standards of the *c*9,*t*11-CLA and *t*10,*c*12-CLA isomers (>98% purity), used for peak identification, were purchased from Larodan (Malmö, Sweden).

Stock standard solutions were prepared by dissolving FAME standards in *n*-hexane at appropriate concentrations (200 to 1000 µg mL⁻¹) and were stored at -20 °C until use.

Sample collection

Human plasma samples were obtained from blood collections of healthy adults volunteers (*n* = 20). After centrifugation (1500 × *g*; 20 min at 4 °C) EDTA plasma was collected. Then, 10 samples were used to obtain a plasma pool for the method validation and another 10 different samples were used for analysis of real samples. These samples were immediately frozen and stored at -80 °C prior to analysis.

On the other hand, 15 human milk samples were obtained from healthy Spanish women volunteers after the fourth week of lactation (mature milk). Milk samples were obtained in sterile polypropylene bottles, by mechanical expression of both breasts using an Ameda breast pump (Ameda, Zug, Switzerland). Milk was transported to the laboratory at 4 °C in less than 2 h. Milk samples were homogenized by sonication in an ice bath using a Vibra Cell 75185 sonicator equipped with a 3 mm tip and set to 80% of amplitude. In this case, 5 samples were used to obtain a milk pool for the method validation. The other 10 samples were used for the method application. All samples were immediately stored at -80 °C prior to analysis.

Sample preparation

Human plasma. Sample preparation for human plasma, lipid extraction and phospholipid isolation were performed according to a modified version of the method described by Bondia-Pons *et al.*,²⁸ incorporating significant improvements and adaptations.

Lipid extraction. Prior to lipid extraction, 40 µL of internal standard solution (PC-C15:0) at a concentration of 0.4 µg µL⁻¹ was added to 300 µL of plasma. The IS solution consisted of 10 mg 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and 10 mg butylated hydroxytoluene dissolved in 25 mL dichloromethane/methanol (2 : 1). Then, lipids were subsequently extracted with 3 mL of dichloromethane/methanol 2 : 1 (*v/v*). After shaking vigorously for 5 min, 500 µL of a saturated sodium chloride solution in water was added to the tube, vortexed, and centrifuged for 7 min at 3000 rpm and 25 °C. After centrifugation, the organic phase was collected by aspiration and transferred into a conic-shaped tube and dried under a stream of N₂.

Solid-phase extraction (SPE) of phospholipids. The dry lipid extracts were dissolved in 400 µL of chloroform and loaded into a previously activated solid phase extraction SPE 96-well plate. Each well was activated with 2 × 1 mL of hexane and then washed with 2 mL of chloroform/2-propanol (2 : 1) to remove neutral lipids, followed by 1 mL of 2% acetic acid in diethyl ether to remove the free fatty acids and finally with 1.5 mL of methanol to collect the phospholipid fraction in the 96-well collection plate.

After this, methylation was performed according to Bondia-Pons *et al.*,²⁹ again incorporating slight modifications; 2 mL of sodium methylate in methanol 0.5 M was added to the phospholipid fraction obtained from SPE. The mixture was vortexed for 30 seconds and heated at 80 °C for 10 min. After subsequent cooling in an ice bath, 2 mL of boron trifluoride methanol solution (14% *v/v*) was added, vortexed, and the mixture was heated at 80 °C for 3 min. After that, the tubes were cooled down

again. Fatty acid methyl esters (FAMES) were then extracted by adding 500 μL of *n*-hexane, vortexing, adding 2 mL of a saturated sodium chloride solution in water and centrifuging for 10 min at 3000 rpm. After this, the clear hexane top layer was transferred into another tube and dried over anhydrous sodium sulphate. Finally, 300 μL of the hexane extract was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter. The aliquot was evaporated to dryness under a stream of N_2 and re-diluted with 50 μL of *n*-hexane.

Human milk. Human milk samples were analyzed according to Moltó-Puigmartí *et al.*,³⁰ with slight modifications. 50 μL of the sample was transferred into a culture tube equipped with a Teflon-lined screw cap and containing 10 μL of internal standard (C13:0) at a concentration of 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. The IS solution consisted of 20 mg of tridecanoic acid methyl ester and 20 mg of butylated hydroxytoluene dissolved in 20 mL of hexane. 500 μL of sodium methylate in methanol (0.5 M) was added, and the mixture was then vortexed and heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 10 min in an electric heater. After subsequent cooling in an ice bath, 750 μL of boron trifluoride methanol solution (14% v/v) was added to the tube, vortexed, and the mixture was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 3 min, after which the tubes were cooled again in an ice bath. FAMES were then extracted by adding 500 μL of *n*-hexane, vortexing, adding 2 mL of a saturated sodium chloride solution in water, and centrifuging for 10 min at 3000 rpm and 25 $^\circ\text{C}$. After this, the clear hexane top layer was transferred into another tube and dried over anhydrous sodium sulphate. Finally, this extract was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter. The samples were stored at -20 $^\circ\text{C}$ prior to fast gas chromatography analysis.

Fast-gas chromatographic analysis

FAMES were separated by fast gas chromatography. In order to determine the best conditions for our analysis, two different chromatographic systems, each equipped with a different type of capillary column, were used for comparison.

System A: this consisted of an HP-6890 Series GC System (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a split/splitless injector, an HP-7683B Series autoinjector, an electronic pressure control unit, a flame ionization detector (FID), and a fused-silica capillary column RTX-2330 (40 m \times 0.18 mm internal diameter, 0.10 μm film thickness) coated with a 10% cyanopropyl phenyl-90% bis-cyanopropyl polysiloxane non-bonded stationary phase from Restek (Souderton, UK). The chromatographic conditions used were: helium as the carrier gas at a constant pressure of 37.97 psi (equivalent to a linear velocity of 28 cm s^{-1} at 60 $^\circ\text{C}$). The detector and injector temperatures were set at 300 $^\circ\text{C}$ and 250 $^\circ\text{C}$, respectively; the split ratio was at 1 : 50 (for phospholipid and standard analyses) and 1 : 100 (for milk analyses). The injection volume was 1 μL . Oven temperatures were programmed as follows: the initial temperature was set at 60 $^\circ\text{C}$, which was held for 0.5 min; then the temperature was increased at a rate of 52 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 195 $^\circ\text{C}$. This temperature was held for 5 min and finally increased to 220 $^\circ\text{C}$ at a rate of 25 $^\circ\text{C min}^{-1}$, and held for 7 min.

System B: this consisted of a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a split/splitless injector, a Shimadzu AOC-20i+s autoinjector, a FID, and a fused-silica SP-2560 capillary column (75 m \times 0.18 mm internal diameter, 0.14 μm film thickness) coated with a 100% bis-cyanopropyl polysiloxane stationary phase. The chromatographic conditions used were: helium as the carrier gas at a constant linear velocity of 18.3 cm s^{-1} (which gave an initial pressure of 53 psi). The detector and injector temperatures were set at 300 $^\circ\text{C}$ and 250 $^\circ\text{C}$, respectively; the split ratio was at 1 : 50 (for phospholipid and standard analyses) and 1 : 100 (for milk analyses). The injection volume was 1 μL . Oven temperatures were programmed as follows: the initial temperature was set at 120 $^\circ\text{C}$, which was increased at a rate of 15 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 180 $^\circ\text{C}$. This temperature was held for 10 min and finally increased to 240 $^\circ\text{C}$ at a rate of 15 $^\circ\text{C min}^{-1}$, and held for 15 min.

FAMES of both biological matrices were identified by comparison of peak retention times of FAME samples with those of the standard FAME mix solutions. FAMES were quantified by standard normalization (% total fatty acids).

Validation parameters

Precision. Intra-assay precision was assessed by the relative standard deviation (RSD), which was determined by analyzing 20 replicates of the plasma pool and 10 replicates of the human milk pool under the same experimental conditions.

Inter-assay precision was also assessed in human plasma by the RSD, which in this case was determined by analyzing 20 replicates for conventional cartridges and 40 replicates for 96-well plates of the plasma pool, both for two consecutive weeks.

Recovery. To assess the recovery of the method, known amounts of 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (10, 50 and 100 μg) were added to human plasma before or after the SPE stage. Although in plasma samples PC-C15:0 was used as the internal standard, in this specific evaluation of recovery it was selected to assess the yield of method and in addition C13:0 was added as IS. Triplicate determinations for each level were performed. All samples were subjected to the complete proposed procedure.

Results and discussion

Sample preparation

Human plasma phospholipids. Sample preparation was performed according to different methods and validated by our group. The initial experiments were based on the method developed using traditional solid-phase extraction (SPE) individual cartridges (100 mg, HN_2).²⁸ To increase throughput of the SPE step for large-scale analyses, for the present study we selected and used Discovery SDC (100 mg, HN_2) 96-well extraction plates.

Nowadays, use of the 96-well SPE plate format has been successfully applied to high-throughput quantification of drugs and metabolites from human body fluids.³¹ In this study, the use of 96-well extraction plates enabled us to optimize the sample processing time. We managed to reduce the analysis

time of this stage by half compared to the time required when using conventional cartridges. Furthermore, the FAME profiles obtained using 96-well plates are identical to those obtained when conventional cartridges were applied, as shown in Tables 1 and 2.

Human milk. In the case of human milk, we were able to further improve the methodology³⁰ through the reduction of reagent volumes: with only 500 μL of sodium methylate in

Table 1 Intra-assay precision values for human plasma phospholipids and human milk

FAME	Plasma phospholipids ^a		Human milk ^b	
	Mean (%) \pm SD	RSD	Mean (%) \pm SD	RSD
C6:0	—	—	0.05 \pm 0.00	7.22
C8:0	—	—	0.15 \pm 0.01	3.44
C10:0	—	—	1.05 \pm 0.02	1.90
C12:0	—	—	3.41 \pm 0.06	1.64
C14:0	0.23 \pm 0.01	3.32	3.93 \pm 0.04	1.03
C14:1	n.d. ^c	n.d.	0.10 \pm 0.00	1.56
C15:0	n.d.	n.d.	0.24 \pm 0.00	0.79
C16:0	29.34 \pm 0.27	0.92	22.36 \pm 0.58	2.59
C16:1 t9	0.13 \pm 0.00	2.48	0.12 \pm 0.00	2.52
C16:1 n-9	0.11 \pm 0.00	2.65	0.31 \pm 0.01	2.93
C16:1 n-7	0.29 \pm 0.01	1.86	1.54 \pm 0.02	1.37
C17:0	0.38 \pm 0.01	2.18	0.29 \pm 0.00	1.55
C17:1	tr. ^d	tr.	0.17 \pm 0.00	1.70
C18:0	13.34 \pm 0.29	2.14	6.81 \pm 0.22	3.18
C18:1 t6-t8	n.d.	n.d.	0.11 \pm 0.01	4.70
C18:1 t9	0.08 \pm 0.00	5.60	0.23 \pm 0.01	5.01
C18:1 t10	n.d.	n.d.	tr.	tr.
C18:1 t11	0.12 \pm 0.01	4.91	0.35 \pm 0.02	4.38
C18:1 t12	0.06 \pm 0.00	5.92	0.07 \pm 0.00	4.32
C18:1 c6-8+t13+t14 ^e	0.09 \pm 0.01	6.34	0.12 \pm 0.01	8.87
C18:1 n-9	9.44 \pm 0.12	1.23	45.04 \pm 0.49	1.10
C18:1 n-7	1.26 \pm 0.03	2.26	1.80 \pm 0.04	2.46
C18:2 c9t12	0.04 \pm 0.00	6.50	0.10 \pm 0.00	4.59
C18:2 t9c12	0.04 \pm 0.00	5.98	0.05 \pm 0.00	4.10
C18:2 n-6	23.78 \pm 0.15	0.63	9.08 \pm 0.11	1.21
C20:0	0.06 \pm 0.00	5.85	0.16 \pm 0.00	2.66
C18:3 n-6	0.08 \pm 0.00	4.98	0.10 \pm 0.00	1.84
C20:1 n-9	0.14 \pm 0.00	2.85	0.39 \pm 0.00	1.20
C18:3 n-3	0.09 \pm 0.01	5.55	0.50 \pm 0.01	1.29
CLA c9t11	0.07 \pm 0.00	4.91	0.15 \pm 0.00	2.15
C21:0	tr.	tr.	tr.	tr.
CLA t10c12	n.d.	n.d.	tr.	tr.
C20:2 n-6	0.29 \pm 0.01	2.02	0.19 \pm 0.00	1.35
C22:0	n.d.	n.d.	0.06 \pm 0.00	1.33
C20:3 n-9	0.18 \pm 0.01	3.46	tr.	tr.
C20:3 n-6	3.08 \pm 0.02	0.81	0.22 \pm 0.00	1.72
C22:1 n-9	n.d.	n.d.	0.06 \pm 0.00	2.54
C22:2 n-6	n.d.	n.d.	0.03 \pm 0.00	2.78
C20:4 n-6	12.00 \pm 0.09	0.73	0.33 \pm 0.00	1.50
C24:0	n.d.	n.d.	0.03 \pm 0.00	4.17
C20:5 n-3	0.54 \pm 0.01	1.50	0.02 \pm 0.00	5.56
C24:1	n.d.	n.d.	0.02 \pm 0.00	7.86
C22:4 n-6	0.33 \pm 0.01	2.35	0.07 \pm 0.00	3.27
C22:5 n-6	0.23 \pm 0.01	2.41	0.03 \pm 0.00	4.74
C22:5 n-3	0.59 \pm 0.03	5.04	0.08 \pm 0.00	4.50
C22:6 n-3	3.55 \pm 0.05	1.47	0.11 \pm 0.00	2.74

^a Human plasma phospholipids, $n = 20$. ^b Human milk, $n = 10$. ^c n.d. – not detected. ^d tr. – traces. ^e FAMES not separated.

Table 2 Inter-assay precision values for human plasma phospholipids

FAME	Cartridges ^a		96-Well plates ^b	
	Mean (%) \pm SD	RSD	Mean (%) \pm SD	RSD
C14:0	0.27 \pm 0.01	3.63	0.23 \pm 0.01	3.54
C16:0	29.41 \pm 0.28	0.96	29.39 \pm 0.25	0.84
C16:1 t9	0.13 \pm 0.01	4.06	0.13 \pm 0.00	2.17
C16:1 n-9	0.11 \pm 0.00	3.06	0.11 \pm 0.00	2.57
C16:1 n-7	0.30 \pm 0.01	3.97	0.29 \pm 0.01	2.22
C17:0	0.39 \pm 0.02	5.12	0.38 \pm 0.01	2.73
C18:0	13.38 \pm 0.34	2.53	13.37 \pm 0.33	2.49
C18:1 t9	0.08 \pm 0.01	6.97	0.08 \pm 0.00	5.32
C18:1 t11	0.11 \pm 0.01	5.05	0.12 \pm 0.00	3.99
C18:1 t12	0.06 \pm 0.00	6.84	0.06 \pm 0.00	5.79
C18:1 c6-8+t13+t14 ^c	0.09 \pm 0.01	6.35	0.09 \pm 0.01	5.99
C18:1 n-9	9.53 \pm 0.19	2.03	9.43 \pm 0.10	1.01
C18:1 n-7	1.26 \pm 0.03	2.12	1.25 \pm 0.03	2.50
C18:2 c9t12	0.04 \pm 0.00	5.29	0.04 \pm 0.00	6.33
C18:2 t9c12	0.04 \pm 0.00	6.77	0.04 \pm 0.00	6.21
C18:2 n-6	23.77 \pm 0.25	1.08	23.71 \pm 0.18	0.76
C20:0	0.06 \pm 0.00	5.71	0.06 \pm 0.00	5.11
C18:3 n-6	0.08 \pm 0.00	4.67	0.08 \pm 0.00	4.34
C20:1 n-9	0.14 \pm 0.01	3.79	0.14 \pm 0.00	2.60
C18:3 n-3	0.09 \pm 0.01	6.04	0.09 \pm 0.00	5.73
CLA c9t11	0.07 \pm 0.00	4.52	0.07 \pm 0.00	4.49
C20:2 n-6	0.28 \pm 0.01	2.23	0.29 \pm 0.01	2.66
C20:3 n-9	0.18 \pm 0.01	3.95	0.18 \pm 0.01	3.59
C20:3 n-6	3.09 \pm 0.05	1.52	3.08 \pm 0.03	0.99
C20:4 n-6	11.82 \pm 0.13	1.12	11.97 \pm 0.10	0.83
C20:5 n-3	0.54 \pm 0.02	3.58	0.54 \pm 0.01	1.62
C22:4 n-6	0.33 \pm 0.01	2.75	0.33 \pm 0.01	2.24
C22:5 n-6	0.23 \pm 0.01	3.82	0.24 \pm 0.01	2.42
C22:5 n-3	0.58 \pm 0.01	2.01	0.59 \pm 0.01	3.77
C22:6 n-3	3.54 \pm 0.02	1.71	3.55 \pm 0.04	1.31

^a Cartridges, $n = 20$. ^b 96-Well plate, $n = 40$. ^c FAMES not separated.

methanol solution (0.5 M) and 750 μL of boron trifluoride methanol solution (14% v/v), we obtained the same results as with 2.5 mL of each of the reactants (data not shown). We were also able to reduce the initial amount of sample needed for the analysis (from 100 μL to only 50 μL). These modifications led to a saving in reagents and, even more importantly, to the possibility of working with as little as 50 μL of milk, which is an important consideration in clinical studies. Thus, the percentages of all fatty acids (C6:0 to C22:6 n-3) obtained with these modifications are in concordance to previous investigations.^{32,33}

Optimization of fast gas chromatographic separation in systems A and B

After optimization of the analytical steps involved in sample preparation, the operational parameters were established for the new fast GC method.

In the present study, the two chromatographic columns tested had a very high polarity and in this respect were therefore suitable for the separation of TFA and CLA isomers. Because of their shorter length (40 and 75 m for systems A and B, respectively), thinner internal diameter and lower particle size (0.18 mm I.D. but 0.10 μm film thickness for system A, and

0.18 mm I.D. but 0.14 μm film thickness for system B), we wanted to test whether they would be capable of achieving a faster separation in comparison to conventional columns (100 m \times 0.25 mm \times 0.20 μm),^{20,25,34} while maintaining resolution. Obviously, it was important that implementation of either of the two chromatographic methods in our routine analyses should permit a fast but also correct separation of all the fatty acids of

interest, including TFA and CLA isomers, since more samples are continually being analyzed on a day to day basis.

First, each of the two chromatographic systems had to be optimized in terms of peak separation and time. After that, they had to be compared to each other in terms of separation efficiency, resolution and time, in order to choose the system that best suited our aims. Optimization of separation and

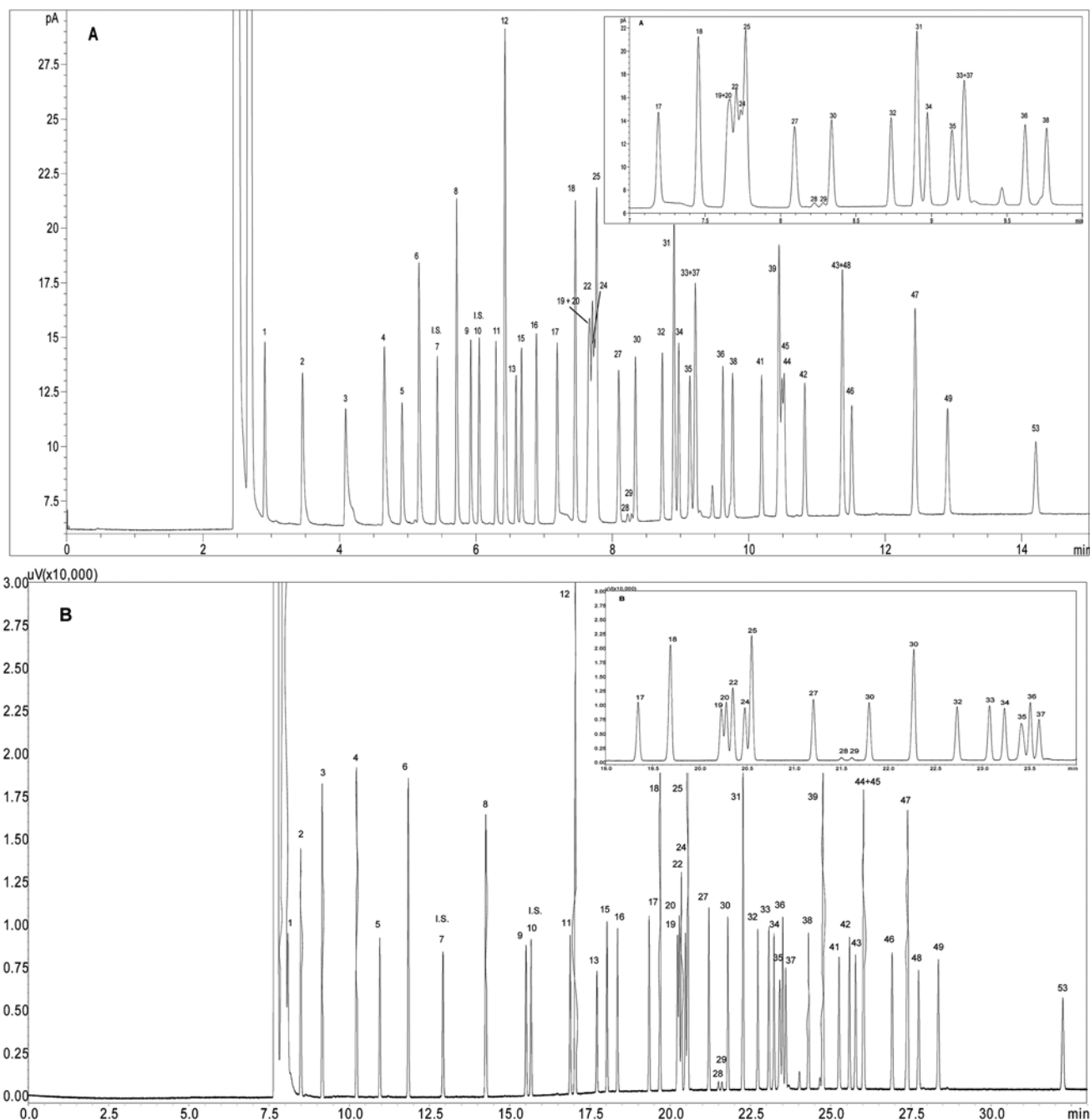


Fig. 1 Gas chromatograms of the FAME mix analyzed with systems A and B (chromatograms A and B, respectively). A zoom of the region of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid is provided. Peak identification: (1) C4:0; (2) C6:0; (3) C8:0; (4) C10:0; (5) C11:0; (6) C12:0; (7) C13:0 (I.S.); (8) C14:0; (9) C14:1; (10) C15:0 (I.S.); (11) C15:1; (12) C16:0; (13) *t*9-C16:1; (15) C16:1 n-7; (16) C17:0; (17) C17:1; (18) C18:0; (19) *t*6-C18:1; (20) *t*9-C18:1, elaidic acid; (22) *t*11-C18:1, vaccenic acid; (24) *c*6-C18:1; (25) C18:1 n-9; (27) *t*9,*t*12-C18:2; (28) *c*9,*t*12-C18:2; (29) *t*9,*c*12-C18:2; (30) C18:2 n-6; (31) C20:0; (32) C18:3 n-6; (33) C20:1 n-9; (34) C18:3 n-3; (35) *c*9,*t*11-CLA, rumenic acid; (36) C21:0; (37) *t*10,*c*12-CLA; (38) C20:2 n-6; (39) C22:0; (41) C20:3 n-6; (42) C22:1 n-9; (43) C22:2 n-6; (44) C20:4 n-6 (AA); (45) C20:3 n-3; (46) C23:0; (47) C24:0; (48) C20:5 n-3 (EPA); (49) C24:1; (53) C22:6 n-3 (DHA).

comparison of systems were performed using: (1) FAME standard mix added to appropriate amounts of palmitelaidate acid methyl ester (*t*9-C16:1), elaidic acid (*t*9-C18:1), vaccenic acid (*t*11-C18:1), *trans*-6-octadecenoic acid (*t*6-C18:1), *cis*-6-octadecenoic acid (*c*6-C18:1) and linoleic acid methyl ester isomers

(*t*9,*t*12-C18:2, *c*9,*t*12-C18:2, *t*9,*c*12-C18:2, *c*9,*c*12-C18:2), rumenic acid (*c*9,*t*11-CLA) and *t*10,*c*12-CLA isomer, (2) PUFA methyl ester mix (animal source), (3) human plasma phospholipids, and (4) human milk. Tentative peak assignment of isomers not available as standards was carried out by a

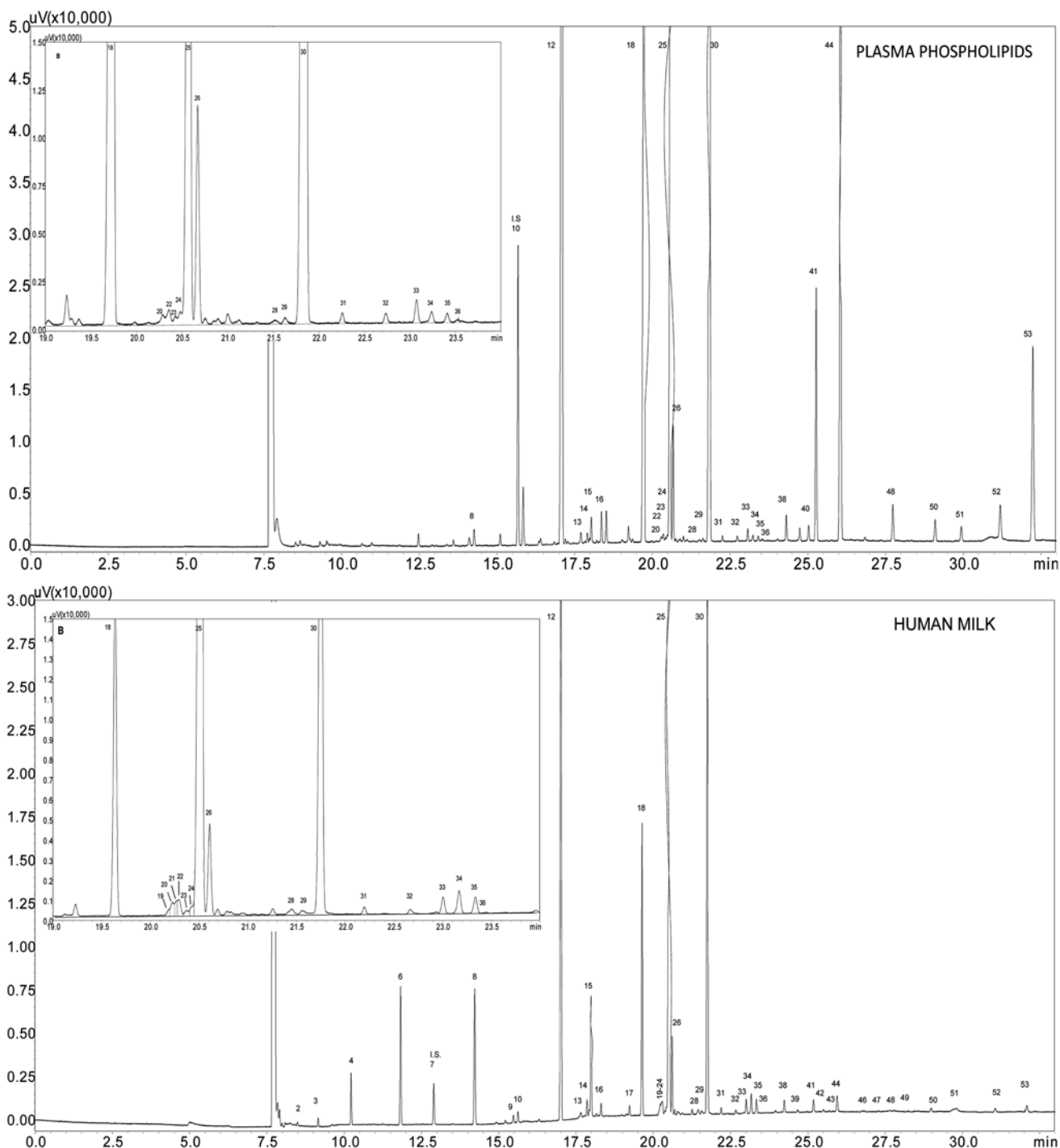


Fig. 2 Gas chromatograms of FAMES of plasma phospholipids and human milk analyzed with system B. A zoom of the region of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid is provided. Peak identification: (2) C6:0; (3) C8:0; (4) C10:0; (6) C12:0; (7) C13:0 (I.S.); (8) C14:0; (9) C14:1; (10) C15:0 (I.S.); (12) C16:0; (13) *t*9-C16:1; (14) C16:1 n-9; (15) C16:1 n-7; (16) C17:0; (17) C17:1; (18) C18:0; (19) *t*6-*t*8^(a)C18:1; (20) *t*9-C18:1, elaidic acid; (21) *t*10-C18:1^(a); (22) *t*11-C18:1, vaccenic acid; (23) *t*12-C18:1^(a); (24) *c*6-8^(a)+*t*13^(a)+*t*14^(a)-C18:1; (25) C18:1 n-9; (26) C18:1 n-7; (28) *c*9,*t*12-C18:2; (29) *t*9,*c*12-C18:2; (30) C18:2 n-6; (31) C20:0; (32) C18:3 n-6; (33) C20:1 n-9; (34) C18:3 n-3; (35) *c*9,*t*11-CLA, rumenic acid; (36) C21:0; (38) C20:2 n-6; (39) C22:0; (40) C20:3 n-9; (41) C20:3 n-6; (42) C22:1 n-9; (43) C22:2 n-6; (44) C20:4 n-6 (AA); (47) C24:0; (48) C20:5 n-3 (EPA); (49) C24:1; (50) C22:4 n-6; (51) C22:5 n-6; (52) C22:5 n-3; (53) C22:6 n-3 (DHA).^(a) Peak tentatively identified according to ref. 19, 20, 35 and 36.

comparison of the fatty acid pattern obtained in other studies.^{19,20,35,36}

Different split ratios ranging from 1 : 30 to 1 : 100 and oven temperatures from 60 °C to 250 °C with different ramps were tested. The chromatographic conditions that provided the best separation of the different isomers whilst maintaining a good resolution for the rest of the fatty acids of interest (from short-chain saturated to long-chain polyunsaturated fatty acids) were those explained in the fast-gas chromatographic analysis. Although hydrogen is known to be the best carrier gas for performing fast GC analyses, we used helium due to safety concerns.

Fig. 1 shows the fast GC chromatograms of the FAME standard mixtures spiked with TFAs and CLA isomers using the definitive chromatographic conditions for both columns (systems A and B). Results for the separation of PUFA were the same (data not shown). The last peak in the chromatograms (docosahexaenoic acid, C22:6 n-3) eluted at minute 14.2 with system A and 32.2 with system B, which represents a noticeable reduction in time when compared to other studies.^{20,24,25,34}

In contrast, when analyzing milk samples, system B gave a better resolution than system A in the C18:1 region. Because human milk is very rich in oleic acid, it was difficult to separate elaidic and vaccenic acids from oleic acid when using the 40 m RTX-2330 column (system A). In the temperature programme for system A we included an isothermal step at 195 °C, which enabled us to improve the separation in that region in comparison to our first attempt with the typical isothermal at 180 °C. Martin *et al.* also achieved a good separation of several C18:1 and C18:2 *cis* and *trans* isomers with temperatures around 197 °C.³⁷ However, separation with system B still showed the best results. The same results were obtained for plasma phospholipid samples.

The fast GC column in 75 m (SP-2560) provides both high resolution and high speed needed to achieve high throughput with detailed *cis/trans* FAME analyses. This column offers the best alternative to the 100 m column for resolving positional geometric isomers in a shorter analysis time. Of the two methods tested, we chose system B (75 m, SP-2560 column) for our routine analysis, which provided a satisfactory separation of individual *trans* 18 : 1 isomers (elaidic acid, vaccenic acid) and ruminic acid (*c9,t11-CLA*) from human plasma phospholipid and human milk samples using only one injection and a suitable split ratio depending on the sample (1 : 50 for the standards and plasma phospholipid samples and 1 : 100 for human milk samples). Fig. 2 shows the GC chromatograms of human plasma phospholipid and human milk samples using system B.

Validation parameters

Precision. Table 1 gives the intra-assay precision for both human plasma phospholipids and human milk; the RSD of fatty acid proportions ranged from 0.63% to 6.50% and 0.79 to 8.87%, respectively, which is an acceptable range for gas chromatographic determination of this type of sample.

Table 2 gives the inter-assay precision values for human plasma. In this case, all RSD values were lower than 10% for both the cartridges and the 96-well-plates.

It can be seen that elaidic acid (*t9-C18:1*), vaccenic acid (*t11-C18:1*) and ruminic acid (*c9,t11-CLA*) presented low relative standard deviation values (<6%). These results meet the acceptable precision standards proposed by Horwitz.³⁸

On the other hand, the Student's test was used for analyzing the differences between both SPE formats. The results ($p > 0.05$) showed no statistical significant differences between the conventional cartridges and 96-well plates for elaidic acid (*t9-C18:1*, $p = 0.06$), vaccenic acid (*t11-C18:1*, $p = 0.28$) and ruminic acid (*c9,t11-CLA*, $p = 0.10$). Additionally, we compared the most important fatty acids in human plasma phospholipids, palmitic acid (C16:0, $p = 0.67$), stearic acid (C18:0, $p = 0.12$), oleic acid (C18:1 n-9, $p = 0.13$), linoleic acid (C12:8 n-6, $p = 0.64$), arachidonic acid (C20:4 n-6, $p = 0.29$) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, $p = 0.12$) and found no statistical differences. Thus, the results using both formats were comparable.

Recovery. Relative recovery values were established (by using internal standardization) and expressed as a ratio of calculated and nominal spiked amount $\times 100$. Calculated recovery values and relative standard deviation (RSD) values are shown in Table 3. The average recoveries obtained were 99.6% for cartridges and 100.5% for the 96-well plates. The results obtained were in agreement with those reported previously by our group.²⁸ Thus, we have considered these results satisfactory, since the use of 96-well plates allowed us to optimize the SPE stage in sample processing time and recovery.

Analysis of real samples

In order to prove the applicability of the method for routine analysis, 10 plasma phospholipids and 10 mature human milk samples were analyzed (Table 4). The results are expressed in relative amounts of FAME (%).

In the case of individual fatty acids in human plasma phospholipids, the mean percentage of the elaidic acid (0.13 ± 0.03) was in concordance with literature data.^{39,40} There are a reduced number of publications in the literature concerning contents of vaccenic and ruminic acids in plasma phospholipids, since the most commonly analyzed matrix is total human plasma. Using the latter as a reference matrix our results are comparable with those reported by Enke *et al.*⁴¹

Regarding human milk analysis, our results for elaidic (0.12 ± 0.04) and vaccenic (0.23 ± 0.09) acids were in agreement with those reported by Luna *et al.*³² in another Spanish study.

Table 3 Recovery of 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in spiked human plasma samples

Amount of PC-C15:0 added ^a (μg)	Cartridges		96-Well plate	
	Mean (%)	RSD	Mean (%)	RSD
10	94.8	1.20	95.8	1.48
50	99.7	0.91	101.9	1.11
100	104.2	0.84	103.7	0.61

^a $n = 3$ replicates.

Table 4 FAME content in 10 different human plasma phospholipids and human milk samples

FAME	Plasma phospholipids ^a		Human milk ^b	
	Mean (%) ± SD	Range (min–max)	Mean (%) ± SD	Range (min–max)
C6:0	—	—	0.05 ± 0.02	0.02–0.08
C8:0	—	—	0.17 ± 0.04	0.11–0.24
C10:0	—	—	1.15 ± 0.28	0.79–1.65
C12:0	—	—	4.68 ± 1.38	2.65–6.94
C14:0	0.30 ± 0.08	0.15–0.38	4.76 ± 1.40	2.59–6.94
C14:1	n.d. ^c	n.d.	0.11 ± 0.05	0.05–0.20
C15:0	n.d.	n.d.	0.21 ± 0.07	0.11–0.31
C16:0	27.76 ± 1.39	24.94–29.79	20.14 ± 2.47	16.29–24.89
C16:1 t9	0.18 ± 0.04	0.12–0.25	0.03 ± 0.03	0.01–0.09
C16:1 n-9	0.14 ± 0.03	0.09–0.19	0.30 ± 0.11	0.07–0.43
C16:1 n-7	0.29 ± 0.08	0.20–0.41	1.46 ± 0.35	0.96–1.99
C17:0	0.48 ± 0.06	0.38–0.60	0.23 ± 0.04	0.18–0.28
C17:1	tr. ^d	tr.	0.12 ± 0.02	0.10–0.17
C18:0	11.80 ± 0.87	10.61–13.07	5.73 ± 0.83	4.68–7.04
C18:1 t6–t8	n.d.	n.d.	0.05 ± 0.03	tr.–0.12
C18:1 t9	0.13 ± 0.03	0.10–0.20	0.12 ± 0.04	0.08–0.22
C18:1 t10	n.d.	n.d.	0.08 ± 0.07	tr.–0.16
C18:1 t11	0.19 ± 0.08	0.12–0.42	0.23 ± 0.09	0.07–0.41
C18:1 t12	0.07 ± 0.02	0.05–0.11	0.05 ± 0.02	tr.–0.09
C18:1 c6–8+t13+t14 ^e	0.09 ± 0.03	0.05–0.15	0.11 ± 0.04	0.07–0.15
C18:1 n-9	9.91 ± 1.24	8.23–11.58	42.72 ± 6.49	37.08–57.91
C18:1 n-7	1.58 ± 0.29	1.27–2.20	1.32 ± 0.18	1.05–1.57
C18:2 c9t12	0.05 ± 0.02	0.03–0.11	0.12 ± 0.03	0.06–0.14
C18:2 t9c12	0.07 ± 0.03	0.05–0.13	0.06 ± 0.03	0.02–0.09
C18:2 n-6	22.79 ± 1.98	20.49–27.47	13.23 ± 4.10	8.89–18.38
C20:0	0.07 ± 0.01	0.06–0.08	0.14 ± 0.01	0.12–0.17
C18:3 n-6	0.05 ± 0.01	0.03–0.07	0.10 ± 0.04	0.06–0.17
C20:1 n-9	0.24 ± 0.04	0.18–0.30	0.34 ± 0.08	0.28–0.53
C18:3 n-3	0.13 ± 0.05	0.07–0.20	0.429 ± 0.10	0.39–0.64
CLA c9t11	0.09 ± 0.02	0.06–0.12	0.12 ± 0.04	0.08–0.18
C21:0	tr.	tr.	0.02 ± 0.01	0.01–0.04
C20:2 n-6	0.48 ± 0.04	0.43–0.55	0.20 ± 0.05	0.13–0.27
C22:0	n.d.	n.d.	0.07 ± 0.01	0.05–0.08
C20:3 n-9	0.22 ± 0.05	0.13–0.29	0.00 ± 0.01	tr.–0.2
C20:3 n-6	3.52 ± 0.67	2.35–4.61	0.27 ± 0.08	0.17–0.42
C22:1 n-9	n.d.	n.d.	0.06 ± 0.01	0.04–0.09
C22:2 n-6	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.01	0.02–0.04
C20:4 n-6	12.03 ± 1.55	9.19–13.67	0.32 ± 0.08	0.21–0.46
C24:0	n.d.	n.d.	0.04 ± 0.01	0.03–0.05
C20:5 n-3	0.46 ± 0.15	0.24–0.71	0.08 ± 0.07	0.03–0.20
C24:1	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.01	0.02–0.05
C22:4 n-6	0.47 ± 0.19	0.27–0.89	0.07 ± 0.01	0.06–0.09
C22:5 n-6	0.48 ± 0.17	0.20–0.73	0.04 ± 0.01	0.02–0.07
C22:5 n-3	0.47 ± 0.11	0.31–0.63	0.14 ± 0.10	0.06–0.37
C22:6 n-3	5.37 ± 0.61	4.16–6.11	0.28 ± 0.41	0.10–0.77

^a Human plasma phospholipids, $n = 10$. ^b Human milk, $n = 10$. ^c n.d. – not detected. ^d tr. – traces. ^e FAMES not separated.

Dreiucker and Vetter³³ found lower percentages of elaidic acid but similar amounts of vaccenic acid in Asiatic woman compared with our results. On the other hand, rumenic acid (0.12 ± 0.04) was within the range described by Moltó-Puigmartí *et al.*³⁰ Finally, we suggest that the wide range of oleic acid, vaccenic acid and rumenic acid contents in these studies would be attributed to differences in diets of the participants involved in each study.

Conclusions

The new fast gas chromatographic method permits faster separation of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid within a complete fatty acid profile in both human plasma and human milk. The use of 96-well plates enabled us to simultaneously process a large number of plasma samples in less time whilst achieving the same results for fatty acid content as when using conventional cartridges. In addition, the initial amount of human milk required was lower than the amount used in existing routine analyses. The fast column SP-2560 (75 m) allows a good separation of these fatty acids in only 32.2 min. This method presents good recoveries and precision. It has been shown to be adequate and useful for application in different kinds of biological samples and we chose this method for our routine analysis.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for the predoctoral grant awarded to Aida Maribel Chisaguano and financial support for the research project AGL2009-09730/ALI. We also thank the “Department d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya” (Spain) for financial support of research project 2009SGR-606 and the Faculty of Pharmacy for the grant to Blanca Lozano. Special thanks to the participants who donated blood or milk samples.

References

- 1 T. G. Albuquerque, H. S. Costa, M. C. Castilho and A. Sanches-Silva, *Trends Food Sci. Technol.*, 2011, **22**, 543–560.
- 2 M. W. Pariza, Y. Park and M. E. Cook, *Prog. Lipid Res.*, 2001, **40**, 283–298.
- 3 A. M. Turpeinen, M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D. L. Palmquist, *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**, 504–510.
- 4 R. P. Jutzeler van Wijlen and P. C. Colombani, *Int. Dairy J.*, 2010, **20**, 433–448.
- 5 I. Churrua, A. Fernández-Quintela and M. P. Portillo, *Biofactors*, 2009, **35**, 105–111.
- 6 Y. Lee, *Nutr. Res. Pract.*, 2008, **2**, 326–330.
- 7 W. Liu, S. C. Degner and D. F. Romagnolo, *J. Nutr.*, 2006, **136**, 2743–2747.
- 8 V. Bissonauth, Y. Chouinard, J. Marin, N. Leblanc, D. Richard and H. Jacques, *J. Nutr. Biochem.*, 2006, **17**, 597–603.
- 9 T. Decsi, I. Burus, S. Molnár, H. Minda and V. Veitl, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **74**, 364–368.
- 10 S. E. Dorfman, D. Laurent, J. S. Gounarides, X. Li, T. L. Mullarkey, E. C. Rocheford, *et al.*, *Obesity*, 2009, **17**, 1200–1207.
- 11 D. J. Baer, J. T. Judd, B. A. Clevidence and R. P. Tracy, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 969–973.
- 12 G. Nagel and J. Linseisen, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2004, **59**, 8–15.
- 13 D. Mozaffarian and W. C. Willett, *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2007, **9**, 486–493.

- 14 S. K. Weiland, E. von Mutius, A. Hijssing and M. I. Asher, *Lancet*, 1999, **353**, 2040–2041.
- 15 J.-M. Chardigny, F. Destailats, C. Malpuech-Brugère, J. Moulin, D. E. Bauman, A. L. Lock, *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **87**, 558–566.
- 16 D. Mozaffarian and R. Clarke, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2009, **63**, S22–S33.
- 17 A. Hasin, J. Griinari, J. Williams, A. Shahin, M. McGuire and M. McGuire, *Lipids*, 2007, **42**, 835–843.
- 18 A. Mueller, C. Thijs, L. Rist, A. Simões-Wüst, M. Huber and H. Steinhardt, *Lipids*, 2010, **45**, 245–251.
- 19 F. Destailats, P.-A. Golay, F. Joffre, M. de Wispelaere, B. Hug, F. Giuffrida, *et al.*, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1145**, 222–228.
- 20 J. Kramer, M. Hernandez, C. Cruz-Hernandez, J. Kraft and M. Dugan, *Lipids*, 2008, **43**, 259–273.
- 21 C. Villegas, Y. Zhao and J. M. Curtis, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 775–784.
- 22 J. Ha, D. Seo and D. Shin, *Talanta*, 2011, **85**, 252–258.
- 23 S. T. Franklin, K. R. Martin, R. J. Baer, D. J. Schingoethe and A. R. Hippen, *J. Nutr.*, 1999, **129**, 2048–2054.
- 24 S. Shirasawa, A. Sasaki, Y. Saida and C. Satoh, *J. Oleo Sci.*, 2007, **56**, 53–58.
- 25 S. P. Alves and R. J. B. Bessa, *J. Chromatogr., A*, 2009, **1216**, 5130–5139.
- 26 M. Magdi and M. Richard, Methods for *trans* fatty acid analysis, in *Food Lipids*, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- 27 M. S. Klee and L. M. Blumberg, *J. Chromatogr. Sci.*, 2002, **40**, 234–247.
- 28 I. Bondia-Pons, S. Morera-Pons, A. I. Castellote and M. C. López-Sabater, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1116**, 204–208.
- 29 I. Bondia-Pons, C. Moltó-Puigmartí, A. I. Castellote and M. C. López-Sabater, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1157**, 422–429.
- 30 C. Moltó-Puigmartí, A. I. Castellote and M. C. López-Sabater, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **602**, 122–130.
- 31 M. S. Odetokun, M. A. Montesano, G. Weerasekera, R. D. Whitehead Jr, L. L. Needham and D. B. Barr, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **878**, 2567–2574.
- 32 P. Luna, M. Juárez and M. A. de la Fuente, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2007, **109**, 1160–1166.
- 33 J. Dreiuicker and W. Vetter, *Food Chem.*, 2011, **126**, 762–771.
- 34 J. K. G. Kramer, C. Cruz-Hernandez, Z. Deng, J. Zhou, G. Jahreis and M. E. R. Dugan, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 1137S–1145S.
- 35 S. Hauff and W. Vetter, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3423–3430.
- 36 P.-A. Golay, F. Giuffrida, F. Dionisi and F. Destailats, *J. AOAC Int.*, 2009, **92**, 1301–1309.
- 37 C. A. Martin, C. C. de Oliveira, J. V. Visentainer, M. Matsushita and N. E. z. de Souza, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1194**, 111–117.
- 38 W. Horwitz, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 67A–76A.
- 39 M. Saadatian-Elahi, N. Slimani, V. Chajès, M. Jenab, J. I. Goudable, C. Biessy, *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, **89**, 331–346.
- 40 V. Chajès, M. Jenab, I. Romieu, P. Ferrari, C. C. Dahm, K. Overvad, *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, **94**, 1304–1313.
- 41 U. Enke, A. Jaudszus, E. Schleussner, L. Seyfarth, G. Jahreis and K. Kuhnt, *Lipids Health Dis.*, 2011, **10**, 247.

Publicación 2

Elaidic, t-vaccenic and rumenic acid status during pregnancy: association with maternal plasmatic LC-PUFAs and atopic manifestations in infants

.....

Estatus de ácido eláidico, ácido t-vaccénico y ácido ruménico durante el embarazo: asociación con los niveles plasmáticos de AGPI-CL de la madre y las manifestaciones atópicas en los niños

Autores: Aida Maribel Chisaguano, Rosa Montes, Ana Isabel Castellote, Eva Morales, Jordi Júlvez, Jesús Vioque, Jordi Sunyer y M. Carmen López-Sabater.

Revista: *Pediatric Research*

Aceptada

.....

RESUMEN:

Antecedentes y Objetivos: Se ha indicado que los ácidos grasos *trans* interfieren en el metabolismo de los AGPI-CL, modulando la síntesis de mediadores químicos que participan en el desarrollo de la sintomatología de las enfermedades atópicas, sin embargo, no existen estudios que hayan explorado los posibles efectos de estos AG en etapas de altos requerimientos nutricionales como es el embarazo. En busca de conocer si AGT procedentes de fuentes industriales y naturales modifican los niveles de AGPI maternos, y tienen efecto a largo plazo en el desarrollo de enfermedades atópicas, el objetivo de este trabajo fue investigar la asociación entre las concentraciones plasmáticas de AGT específicos: ácido elaídico (fuente industrial), ácido *t*-vaccénico y ácido ruménico (fuente natural) durante el embarazo y el desarrollo de eczema atópico y sibilancias en los niños en el primer año de vida.

Metodología: De la cohorte INMA-Sabadell se seleccionaron a las mujeres que contestaron a todas las preguntas del cuestionario de frecuencia alimentaria (CFA), para conocer la ingesta estimada de AG durante el primer trimestre del embarazo. Se seleccionó una submuestra representativa de la Cohorte de 274 madres/hijos para el análisis de los AG de los fosfolípidos del plasma materno. La información del eczema atópico y sibilancias en primeros 14 meses de vida fueron obtenidas mediante un cuestionario en dos periodos de tiempo, a los 6 y 14 meses después del nacimiento. Las asociaciones AGT y AGPI se determinaron mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson. Los ácidos grasos de interés se clasificaron en tres categorías en función de la distribución de terciles dentro de la cohorte total. Las asociaciones entre niveles de AGT y enfermedades atópicas se analizaron por regresión logística ajustada por los diferentes factores de confusión sociodemográficos.

Resultados: Altos niveles de ácido elaídico están asociados inversamente con los niveles de AGPI-CL especialmente de la serie n-3 (suma total AGPI-CL, EPA, DPA y DHA), mientras que el ácido ruménico se correlaciona positivamente con los AGPI-CL de ambas series n-3 y n-6. Niveles altos de ácido *t*-vaccénico están asociados con un menor riesgo de eczema atópico en el primer año vida; sin embargo, no se registraron asociaciones para el ácido elaídico y el ácido ruménico en el desarrollo temprano de eczema y sibilancias.

Conclusión: Parece ser que sólo el ácido elaídico (de origen industrial) interfiere en el metabolismo de los AGPI-CL especialmente en la síntesis de EPA y DHA. Niveles altos circulantes de ácido *t*-vaccénico (de origen natural) durante el embarazo pueden proteger al niño del riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida.

Elaidic, *t*-vaccenic and rumenic acid status during pregnancy: association with maternal plasmatic LC-PUFAs and atopic manifestations in infants

Running title

TFAs and atopic diseases in infancy

Aida Maribel Chisaguano^{1,2}, Rosa Montes^{1,2}, Ana Isabel Castellote^{1,2}, Eva Morales^{3,4,5,6}, Jordi Júlvez^{3,4,5,6}, Jesús Vioque⁸, Jordi Sunyer^{3,4,5,6,7} and M. Carmen López-Sabater^{1,2}

Affiliation

¹Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Government, Madrid, Spain.

³Center for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain.

⁴Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain.

⁵CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Government, Madrid, Spain.

⁶Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

⁷Center for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

⁸Departamento de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

Corresponding author

M. Carmen López-Sabater

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona.

Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

Telephone: (+34) 934024512

Fax: (+34) 934035931

E-mail: mclopez@ub.edu

Statement of financial support

The authors thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the predoctoral grant awarded to Aida Maribel Chisaguano and financial support for the research project AGL2009-09730/ALI. We also thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for a postdoctoral *Juan de la Cierva* fellowship awarded to Rosa Montes.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Category of Study

Clinical Study

Abstract

BACKGROUND: Few studies have explored whether fetal exposure to *trans* fatty acids (TFAs) influences the inception of atopic diseases. The aim of this study was to investigate the relationship between the concentration of specific TFAs (elaidic, *t*-vaccenic and rumenic acid) in maternal plasma and the risk of developing atopic manifestations in the first year of life.

METHODS: A subsample from a population-based pregnancy cohort of the INMA Project was analyzed. Maternal intake of FAs was assessed by a FFQ (75.5% of the cohort). TFAs, n-3 and n-6 LC-PUFAs were measured in samples of plasmatic phospholipids at 12 weeks' pregnancy. Information regarding eczema and wheeze in offspring was obtained through questionnaires at ages 6 and 14 months.

RESULTS: Elaidic acid correlated negatively with n-3 LC-PUFAs (total, EPA and DHA) and rumenic acid positively with both n-3 and n-6 LC-PUFAs in maternal plasma. Neither of these two fatty acids was associated with the risk of atopic eczema or wheeze in offspring in the first year of life. However, a higher *t*-vaccenic acid level was found to be linked to a lower risk of atopic eczema.

CONCLUSION: High *t*-vaccenic acid concentrations in maternal plasma may protect offspring against atopic eczema in infancy.

Introduction

The prevalence of atopic diseases (atopic eczema, allergic rhinoconjunctivitis and asthma) in young children has increased rapidly in recent decades. Currently, a third of children in Western countries have confirmed symptoms of these conditions(1). Epidemiological and clinical studies indicate that changes in fatty acid (FA) intake by expectant mothers may contribute to the development of atopic disorders during infancy and early childhood. Prenatal exposure to n-6 and n-3 essential fatty acids (EFAs; linoleic acid (LA, C18:2 n-6), α -linolenic acid (ALA, C18:3 n-3)) and long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) has been studied extensively. It has been shown that n-3 LC-PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C20:6 n-3) exert protective effects against atopic eczema, while the opposite is true for n-6 LC-PUFAs, such as arachidonic acid (AA, C20:4 n-6) (2-7). Nevertheless, little attention has been devoted to evaluating the effects of maternal intake of *trans* fatty acids (TFAs) on the prevalence of atopic diseases in early infancy. It has been proposed that TFAs contribute to allergic response by altering lipid metabolism and the phospholipid composition of cell membranes. These effects alter membrane permeability, eicosanoid production (by modifications of substrate levels, such as AA and DHA; which are substrates in the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory eicosanoids, respectively) and gene expression (8-10).

TFAs include unsaturated and polyunsaturated fatty acids with at least one double bond in the *trans* configuration. Dietary TFAs come from two sources: those derived from industrial production by partial hydrogenation of vegetable oils (PHVO) (e.g., elaidic acid, *t*9-C18:1); and those from natural sources, such as ruminant-derived foods (e.g., *t*-vaccenic acid (*t*11-C18:1) and rumenic acid (*c*9*t*11-CLA))(11). Clinical evidence indicates that natural TFAs have distinct properties from those of synthetically produced PHVO. The inclusion of *t*-vaccenic and rumenic acids in the diet can have beneficial effects for conditions such as cardiovascular disease, metabolic syndrome, and cancer (12, 13).

Dairy fat is rich in *t*-vaccenic and rumenic acids. Convergent lines of research on dairy product consumption have indirectly evaluated the link between ruminant TFAs and atopic diseases. As an example, dairy products have been found to show a good correlation with blood concentrations of rumenic acid, thus making these concentrations

an appropriate marker of rumenic acid intake (14). Studies addressing the relationship between TFA consumption in pregnant women and the prevalence of atopic diseases in newborns remain controversial. On the one hand, the consumption of organic dairy products has been associated with a lower risk of eczema in a Dutch cohort (15). Moreover, a study in a Danish cohort identified a link between the intake of low-fat yoghurt and an increased risk of asthma and allergic rhinitis, while whole milk appeared protective for early-life outcomes (16). Other studies have revealed that a high intake of dairy products by expectant mothers may decrease the risk of wheeze in the first year of life (17). On the other hand, high maternal intake of butter and butter spreads during pregnancy were associated with an increased risk of allergic rhinitis in offspring at 5 years of age (3). The latter observation is interesting given that previous studies in an Italian cohort did not find an association between the maternal intake of butter or margarine and atopy in offspring (18).

Animal models have been used to evaluate the real influence of the consumption of dairy products, such as fat-enriched milk, on atopy. Those studies revealed that the two major TFAs, *t*-vaccenic acid and rumenic acid, attenuate allergic dermatitis and suppress airway inflammation (19, 20); however, no data about specific TFAs have yet been reported for humans.

To better understand the contribution of individual TFAs during pregnancy to the development of atopic disease in infants, here we studied whether relative concentrations of elaidic, *t*-vaccenic and rumenic FAs in maternal plasma are associated with risk of eczema and wheeze in offspring during the first year of life.

Results

Study population characteristics

The distribution of baseline characteristics of mother–infant pairs participating in the INMA-Sabadell cohort study is given in Table 1. A total of 496 women (75.5%) answered the questions about dietary intake. Most women had an average educational level (42.5%), and the mean maternal age at birth was 31.4 years old. Of the participants, 14.8% reported smoking during pregnancy. The prevalence of maternal allergy and atopic manifestations was 30.2 and 38.5%, respectively. Of the babies born to the

participants, 49.1% were males, and the predominant breastfeeding period lasted between 16 and 24 weeks. The prevalence of atopic eczema and wheezing in the first year of life was 20.8% and 35.8%, respectively.

For the determination of maternal plasma phospholipids composition, a subset of maternal plasma (n=274) was used. This subsample was representative since no statistically significant differences were found with general population for any of the studied characteristics (data not shown).

Maternal fatty acids intake

The FFQ was developed to estimate the intake of fat. Using this information, we determined the FAs most consumed. The intake of the FAs is expressed in gram per day (Table 1). Oleic acid (C18:1 n-9, 42.1 g/day) was the most abundant FA in the diet of pregnant women, followed by the saturated FAs palmitic (C16:0, 16.0 g/day) and stearic (C18:0, 6.38 g/day) acids. The predominant n-6 FA in the diet was linoleic acid (LA, 11.54 g/day), followed by arachidonic acid (AA, 0.16g/day). Within the n-3 series, the main FA was α -linolenic acid (ALA, 1.10 g/day), followed by docosahexaenoic (DHA, 0.27 g/day) and eicosapentaenoic (EPA, 0.15 g/day) acids. The dietary intake of total TFAs and total n-3 and total n-6 PUFAs was 1.32, 1.52 and 11.72 g/day, respectively.

Relationship between maternal fatty acid intake and plasma fatty acid status

The predominant n-6 FA in maternal plasma was linoleic acid (LA, 22.94%) while the dominant n-3 FA was DHA (4.56%). The main saturated FA was palmitic acid (C16:0, 30.34%) followed by stearic acid (C18:0, 12.11%). Higher plasma concentrations of *t*-vaccenic (C18:1 *t*11, 0.18%) acid were found relative to elaidic (C18:1 *t*9, 0.14%) and rumenic (C18.2 *c*9*t*11, 0.08%) acids (Table 2).

Pearson's correlation coefficients between FA intake estimated by the FFQ and maternal FA in plasma phospholipids showed a positive correlation between the intake of stearic acid, LA, EPA and DHA during first trimester of pregnancy and the concentrations of these FAs in maternal plasma ($p < 0.01$) (Table 3). The same behavior was observed for the sum of total n-3 and n-6 FAs ($p < 0.01$).

No association was found between maternal intake of total TFAs and the concentrations of total TFAs ($r=-0.010$, $p=0.865$), elaidic ($r =104$, $p=0.086$) or *t*-vaccenic ($r =-0.065$, $p=0.286$) acids in maternal plasma. However, a negative correlation between maternal intake of total TFAs and rumenic acid concentration in maternal plasma was observed ($r =-0.160$, $p<0.01$).

Relationship between trans fatty acids and long chain polyunsaturated fatty acids in maternal plasma

Negative correlations were found between elaidic acid and n-3 LC-PUFAs (total, EPA and DHA) ($p<0.01$). Nevertheless, rumenic acid was positively correlated with EPA, DPA and n-3 LC-PUFAs. No correlations between *t*-vaccenic acid and either n-6 or n-3 LC-PUFAs were found (Table 4). Within TFAs, rumenic and *t*-vaccenic acid were positively associated in maternal plasma ($r= 0.488$, $p<0.01$) (data not shown).

Maternal plasma trans fatty acids and infant atopic outcomes

Risk of atopic eczema in 1-year-old children decreased with increased *t*-vaccenic acid in maternal plasma (Table 5). The lowest risk was observed in the highest tertile (OR=0.373, IC-95 (0.171 – 0.818), p for trend=0.035). We found no association between elaidic (OR=0.841, IC-95 (0.396 – 1.788), p for trend=0.901) and rumenic (OR=0.963, IC-95 (0.456 – 2.032), p for trend=0.981) acids and atopic eczema in early life.

Furthermore, wheeze in the first year of life was not associated with maternal levels of elaidic, *t*-vaccenic or rumenic acids during pregnancy (Table 6).

Discussion

During pregnancy, the transport of TFAs across the placenta is determined by maternal dietary intake (21). First, we evaluated the FA intake of pregnant women during the first trimester of pregnancy by means of FFQs. The FFQ used in the present study was validated and is suitable for the assessment of dietary intake (22). The dietary intakes of FAs in this cohort were similar to those observed in several other populations in Belgium, Canada, the US and the UK (23-26). In our study, the consumption of LA (11.54 g/day) and ALA (1.10 g/day) was higher than recommended for pregnant women (27). However,

the mean DHA intake in early pregnancy did not differ from the current recommendation of 0.20 to 0.30 g/day for pregnant women (27, 28). The average consumption of total TFAs in pregnant women was 1.32 g/day. This value is lower than that reported in other groups of the Spanish population (2.1 g/day) (29).

In general, the fatty acid profile of plasma phospholipids in our study was similar to those observed in other populations of pregnant women (23, 30). Dietary intake of the most important n-3 LC-PUFAs, such as EPA and DHA, directly correlated with respective FA concentrations in maternal plasma phospholipids. These results are consistent with those reported by other authors and confirm that n-3 LC-PUFA concentrations in plasma depend more on maternal dietary intake than on endogenous conversion (26, 31). However, no correlation between AA intake and AA in plasma phospholipids was found. This observation could be attributed to the endogenous conversion of LA to AA and the high AA nutritional requirements of the fetus.

The total TFAs concentrations in maternal lipids (0.80% of total FAs) are in concordance with the amounts reported in several other studies (range from 0.50 to 2.5 %) (21, 30). We found that the correlation between the FFQ estimates of total TFAs and the total TFA content of maternal plasma was close to zero. The weak correlation may reflect differences in the metabolic pathways of TFAs compared with those of n-3 or n-6 LC-PUFAs. A possible explanation for this finding is that TFA deposition in tissues is selective, thus adipose tissue and liver generally contain higher concentrations of these FAs than blood or other tissues (32). On the other hand, negative correlation between maternal intake of total TFA and rumenic acid concentration in maternal plasma indicates rumenic acid metabolized better than other TFA isomers and may be required more amount during first trimester fetus development compared to *t*-vaccenic acid. The present results are relevant because they provide additional information about the relationships between dietary and plasma measures of TFA status among a relatively large population of women with a modest intake of TFAs.

In this population-based birth cohort study, we analyzed the FA composition of plasma in pregnant women, focusing on specific *trans* C18:1 isomers (elaidic and *t*-vaccenic acid), rumenic acid (*c9t11*-CLA), and total TFAs. To elucidate the potentially different relations of specific TFA isomers with atopic outcomes, the major dietary sources of each isomer in

the population need to be explained. To our knowledge, elaidic acid is a marker of TFAs of industrial origin (PHVOs) while *t*-vaccenic acid and rumenic acid are the major markers of ruminant fat (11, 33). It has been proposed that TFA isomers (e.g. from oleic acid and LA) inhibit the enzymes involved in n-6 and n-3 LC-PUFA synthesis (Δ 5- and Δ 6-desaturase). Thus, these isomers appear to impair the desaturation of LA and ALA to AA and DHA, respectively. These LC-PUFAs play central roles in infant growth, neural development, and immune function (eicosanoid metabolism) (34, 35). Therefore TFAs may produce intra-uterine changes during the normal fetal development.

Many studies have reported negative associations between total TFAs and n-6 and n-3 LC-PUFA concentrations in various compartments (e.g. plasma, erythrocytes) (8, 21, 36). However, no data are available on the relationships between industrial and ruminant TFAs (as separate groups) and LC-PUFAs. In a small study population (55 mother-child pairs) Enke et al. found a negative correlation between elaidic acid and n-3 LC-PUFA (total, DPA and DHA) in fetal but not in maternal plasma, while no correlations between *t*-vaccenic acid and LC-PUFAs in either maternal or fetal plasma were found (37). Our data are in disagreement with those findings as we observed that elaidic acid correlated negatively and vaccenic acid positively with n-6 (total and AA) and n-3 LC-PUFA (total, EPA and DHA) concentrations in the plasma phospholipids of pregnant women; in addition, we detected a direct correlation between rumenic acid and n-3 LC-PUFA in maternal plasma, thereby confirming the various adverse and beneficial effects of industrial and ruminant TFAs on plasmatic LC-PUFA concentrations. Thus, rumenic acid could have protective effect since this FA is positively correlated with n-3 LC-PUFA, which has an antiinflammatory mode of action. The differences between our findings and those of Enke et al. could be attributed to numerous factors, including the sample size, the method of analysis applied, as well as the plasma fractions examined (phospholipids vs. total plasma).

Our results also show that higher maternal *t*-vaccenic acid concentrations at 12 weeks of gestation were associated with a decreased risk of atopic eczema in 1-year-old infants. The anti-inflammatory properties of *t*-vaccenic acid have not been extensively investigated. Thus, only in one recent study, using animal models, has been demonstrated the protective effect of high *t*-vaccenic and rumenic acid on allergic dermatitis. These FAs independently and/or jointly inhibit several facets of dermatitis (including skin

leukocytosis and eosinophilia) and allergen-specific IgE production (19). A Dutch cohort of mother–infant pairs, Thijs et al. found that high concentrations of vaccenic and rumenic acids in human breast milk were associated with a lower risk of atopic eczema and allergic sensitization in children (38). Accordingly, ours is the first study in a Spanish cohort to analyze prenatal exposure to *t*-vaccenic acid and the risk of atopic eczema in infants. The mother’s intake of *t*-vaccenic acid during pregnancy and lactation may protect against the development of atopic eczema in early infancy. In contrast, no associations were confirmed between maternal elaidic and rumenic levels and the development of atopic eczema in 1-year-old infants. Further research involving a larger sample is required in order to confirm our findings.

Regarding to wheeze, we did not find an association with prenatal exposure to elaidic, *t*-vaccenic or rumenic acid concentrations through maternal plasma. In this context, the wheeze phenotype at 1-year-old is complex. Only in a minority of infants are early wheezing episodes related to a predisposition to asthma, and many infants have episodes of wheezing that are linked to viral respiratory illness (17, 39). These considerations may explain why we found no associations. Chatzi et al. suggested that a high intake of dairy products, specially milk, during pregnancy was significantly associated with a decreased risk of wheeze in the first year of life (17). However we did not find evidence of associations between ruminant TFAs and risk of wheeze. Further research involving a larger sample is needed in this field.

Our study has some limitations. We acknowledge the relatively small sample size used and recognize that a large-scale multicenter trial would be appropriate. However, it is important to note that this subsample is representative of general population in regard to FAs levels. Although comprehensive data on diet, lifestyle, and other risk factors allowed us to adjusted our statistical models for potential confounders, we cannot rule out residual confounding. This lack of data may influence relationships of interest.

To our knowledge, no previous studies have evaluated the contribution of early exposure to specific TFAs of distinct origin to the development of atopic diseases. Our findings suggest that high maternal concentrations of *t*-vaccenic acid during first trimester of pregnancy may protect against the development of atopic eczema in 1-year-old infants.

Further analysis will be carried out to assess relations of maternal TFAs exposure with atopic outcomes in early childhood.

Participants and Methods

Study population and design

Data for this study were obtained from a population-based pregnancy cohort set up in Sabadell (Spain) as part of the INMA--Infancia y Medio Ambiente Project (40). This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Municipal Institute of Health Care (CEIC-IMAS) and the Hospital of Sabadell (Spain). Written informed consent was obtained from all the women who participated in the cohort study.

A detailed description of the Sabadell cohort has been provided elsewhere (41, 42). A total of 657 pregnant women were enrolled between July 2004 and July 2006, during their visits to the public health center in the first trimester of pregnancy. In the present study, we included only those women who had completed a food-frequency questionnaire (FFQ) in the first trimester and for whose babies data on atopic outcomes were available (75.5%, n=496). During pregnancy and the first year postpartum, information on maternal characteristics and atopic outcome was obtained through questionnaires administered to the mothers at various time points (12 and 32 weeks of gestation and at 6 and 14 months postpartum).

Maternal blood samples were extracted at 12 weeks of gestation. Plasmatic phospholipid FAs of a subset of 274 samples were analyzed for this study.

Dietary assessment during pregnancy

A detailed description of the dietary assessment has been published elsewhere (17). In the INMA-Sabadell cohort, a FFQ was administered by trained interviewers to assess common food and nutrient intake during the first trimester of pregnancy. That FFQ was previously validated in a group of pregnant women of the INMA Project in Valencia and included 100 food items (22). The response to each food item was converted into the average consumption in grams per day. Thus, nutrient intake was calculated by multiplying the frequency of consumption of each food item by the nutrient composition

of the portion size specified in the FFQ and by summing across all foods to obtain a total nutrient intake per each participant. We used the residual method to estimate calorie-adjusted values for nutrient intake (43).

Atopic manifestations definition

Maternal atopy was defined as a positive response (levels ≥ 0.35 KU/L) to any of the following three allergens: cat dander, dust mite, and mixed grass pollen (*Poaceae* plants), which are the most common allergens in Spain. These criteria were used in previous studies (7, 42).

Information about the outcomes of interest (atopic eczema and wheezing) was obtained from parents through two questionnaires completed when the child was 6 and 14 months old. Wheezing was defined as a positive answer to the question ‘Has ever your child experienced whistling or wheezing from the chest, but not noisy breathing from the nose since birth to six months, and from 7 to 14 months’?.

Atopic eczema was defined as a positive response to the question “Has your child ever experienced atopic eczema since birth to six months, and from 7 to 14 months?”. Thus, children whose parents reported that they had been diagnosed with eczema during both periods (recurrent eczema) were classified as atopic cases

Fatty acid composition of plasma phospholipids in mothers

The blood samples from the pregnant women were centrifuged, and plasma samples were stored at -80°C until analysis.

The FA composition of plasma phospholipids was determined using the method developed in our laboratory and described elsewhere (44). Plasma lipids were extracted using dichloromethane:methanol (2:1), and phospholipids were separated by solid-phase extraction (100 mg aminopropyl, 96-well plates). Phospholipids were converted to FA methyl esters (FAMES) by heating with sodium methylate in methanol 0.5M and boron trifluoride methanol solution (14% v/v). FAMES were separated and quantified by fast gas chromatography with flame ionization detection (FID). The identities of FAME peaks were determined by comparison of their relative retention times with those of standard

FAME mix solutions (Sigma Aldrich). We focused our attention on n-3 and n-6 PUFAs and individual TFAs from C18:1 and C18:2. The results were expressed in relative amounts (% of total FAs).

Statistical analysis

Means and standard deviations (SDs) were used to describe continuous variables. The Kolmogorov-Smirnov test was used to study the normal distribution of data, and non-normally distributed data were naturally log-transformed. Correlations between FA intake and maternal FA status, namely TFAs, and LC-PUFAs, were determined using Pearson's rank correlation coefficient. The FAs of interest were classified into three categories on the basis of the tertile distribution within the total cohort. Multivariable regression models were used to examine the association of specific TFAs in maternal plasma (using the first tertile as a reference) and atopic outcomes in infants after adjusting for potential confounders. These confounders included characteristics that have an established or potential associations with eczema and wheezing in the first year of life and include the following: maternal age; maternal educational level (primary schooling or lower, secondary schooling and higher education); maternal smoking during pregnancy (yes/no); maternal history of atopic manifestations (yes/no); maternal allergy (yes/no); infant gender (male or female); and duration of predominant breast-feeding (weeks).

All statistical analyses were performed on SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL).

Acknowledgements

We thank to Silvia Fochs, Anna Sánchez and Nuria Pey for their assistance in contacting the families and administering the questionnaires. Special thanks go to the participants in the INMA study for their generous donations. The authors thank Mr. Toffa Evans for his help with the English grammar and expression.

References

1. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 2006; 368:733-43.

2. Notenboom ML, Mommers M, Jansen EHJM, Penders J, Thijs C. Maternal fatty acid status in pregnancy and childhood atopic manifestations: KOALA Birth Cohort Study. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:407-16.
3. Nwaru BI, Erkkola M, Lumia M, et al. Maternal intake of fatty acids during pregnancy and allergies in the offspring. *Br J Nutr* 2012; 108:720-32.
4. Dunder T, Kuikka L, Turtinen J, Räsänen L, Uhari M. Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy* 2001; 56:425-8.
5. Miyake Y, Okubo H, Sasaki S, Tanaka K, Hirota Y. Maternal dietary patterns during pregnancy and risk of wheeze and eczema in Japanese infants aged 16–24 months: The Osaka Maternal and Child Health Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:734-41.
6. Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, et al. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:530-7.
7. Montes R, Chisaguano A, Castellote A, Morales E, Sunyer J, López-Sabater M. Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67:658-63.
8. Decsi T, Koletzko B. Do trans Fatty Acids Impair Linoleic Acid Metabolism in Children? *Ann Nutr Metab* 1995; 39:36-41.
9. Innis SM. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. *Atherosclerosis Supp* 2006; 7:17-20.
10. Larque E, Pérez-Llamas F, Puerta V, et al. Dietary Trans Fatty Acids Affect Docosahexaenoic Acid Concentrations in Plasma and Liver but not Brain of Pregnant and Fetal Rats. *Pediatr Res* 2000; 47:278-83.
11. Albuquerque TG, Costa HS, Castilho MC, Sanches-Silva A. Trends in the analytical methods for the determination of *trans* fatty acids content in foods. *Trends Food SciTech* 2011; 22:543-60.
12. Motard-Bélanger A, Charest A, Grenier G, et al. Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:593-9.

13. Wang Y, Jacome-Sosa MM, Vine DF, Proctor SD. Beneficial effects of vaccenic acid on postprandial lipid metabolism and dyslipidemia: Impact of natural trans-fats to improve CVD risk. *Lipid Tech* 2010; 22:103-6.
14. Jiang J, Wolk A, Vessby B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:21-7.
15. Kummeling I, Thijs C, Huber M, et al. Consumption of organic foods and risk of atopic disease during the first 2 years of life in the Netherlands. *Br J Nutr* 2008; 99:598-605.
16. Maslova E, Halldorsson TI, Strøm M, Olsen SF. Low-fat yoghurt intake in pregnancy associated with increased child asthma and allergic rhinitis risk: a prospective cohort study. *J Nutr Sci [online]*, 2012 (doi:10.1017/jns.2012.5).
17. Chatzi L, Garcia R, Roumeliotaki T, et al. Mediterranean diet adherence during pregnancy and risk of wheeze and eczema in the first year of life: INMA (Spain) and RHEA (Greece) mother-child cohort studies. *Br J Nutr* 2013; 110:2058-68.
18. Calvani M, Alessandri C, Sopo SM, et al. Consumption of fish, butter and margarine during pregnancy and development of allergic sensitizations in the offspring: role of maternal atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17:94-102.
19. Sun X, Zhang J, MacGibbon AKH, Black P, Krissansen GW. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic dermatitis in mice. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:729-38.
20. Kanwar RK, MacGibbon AK, Black PN, et al. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:208-18.
21. Decsi T, Boehm G. Trans isomeric fatty acids are inversely related to the availability of long-chain PUFAs in the perinatal period. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:543S-8S.
22. Vioque J, Navarrete-Munoz E-M, Gimenez-Monzo D, et al. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutr J* 2013; 12:26.
23. De Vriese SR, Matthys C, De Henauw S, De Backer G, Dhont M, Christophe AB. Maternal and umbilical fatty acid status in relation to maternal diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 67:389-96.

24. Innis SM, Elias SL. Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:473-8.
25. Thomas B, Ghebremeskel K, Lowy C, Crawford M, Offley-Shore B. Nutrient intake of women with and without gestational diabetes with a specific focus on fatty acids. *Nutrition* 2006; 22:230-6.
26. Donahue SMA, Rifas-Shiman SL, Olsen SF, Gold DR, Gillman MW, Oken E. Associations of maternal prenatal dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids with maternal and umbilical cord blood levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009; 80:289-96.
27. Simopoulos AP, Leaf A, Salem Jr N. Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *Ann Nutr Metab* 1999; 43:127-30.
28. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 2008; 36:5-14.
29. Craig-Schmidt MC. World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis Supp* 2006; 7:1-4.
30. Vlaardingerbroek H, Hornstra G. Essential fatty acids in erythrocyte phospholipids during pregnancy and at delivery in mothers and their neonates: comparison with plasma phospholipids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71:363-74.
31. Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 83:61-8.
32. Garland M, Sacks FM, Colditz GA, et al. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:25-30.
33. Seppänen-Laakso T, Laakso I, Backlund P, Vanhanen H, Viikari J. Elaidic and trans-vaccenic acids in plasma phospholipids as indicators of dietary intake of 18:1 trans-fatty acids. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 687:371-8.
34. Dirix CEH, Kester AD, Hornstra G. Associations between neonatal birth dimensions and maternal essential and trans fatty acid contents during pregnancy and at delivery. *Br J Nutr* 2009; 101:399-407.

35. Duttaroy AK. Transport of fatty acids across the human placenta: A review. *Prog Lipid Res* 2009; 48:52-61.
36. Elias SL, Innis SM. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:807-14.
37. Enke U, Jaudszus A, Schleussner E, Seyfarth L, Jahreis G, Kuhnt K. Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: special focus on individual *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids. *Lipids Health Dis* 2011; 10:247.
38. Thijs C, Müller A, Rist L, et al. Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy* 2010; 66:58-67.
39. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
40. Guxens M, Ballester F, Espada M, et al. Cohort Profile: The INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol* 2012; 41:930-40.
41. Morales E, Bustamante M, Gonzalez JR, et al. Genetic Variants of the *FADS* Gene Cluster and *ELOVL* Gene Family, Colostrums LC-PUFA Levels, Breastfeeding, and Child Cognition. *PLoS ONE* 2011; 6:e17181.
42. Morales E, García-Esteban R, Guxens M, et al. Effects of prolonged breastfeeding and colostrum fatty acids on allergic manifestations and infections in infancy. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:918-28.
43. Willett W Reproducibility and validity of food-frequency questionnaires. In WC W eds. *Nutritional epidemiology*. Oxford Univ Press, New York, 1998:101-47.
44. Chisaguano AM, Lozano B, Molto-Puigmarti C, Castellote AI, Rafecas M, Lopez-Sabater MC. Elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid (c9,t11-CLA) determination in human plasma phospholipids and human milk by fast gas chromatography. *Anal. Methods* 2013; 5:1264-72.

Table1. Characteristics of the INMA -Sabadell cohort study.

Characteristics	
Maternal characteristics	
Allergy (IgE > 0.35 Uk/L) ^a , yes (%)	30.2
Maternal history of atopic manifestations ^b , yes (%)	38.5
Education (%)	
Low (Primary or less)	28.2
Medium (Secondary)	42.5
High (University or more)	29.4
Smoking in pregnancy, yes (%)	14.8
Age at delivery (mean±SD)	31.4 (4.37)
Children characteristics	
Sex, male (%)	49.1
Predominant breastfeeding, weeks (%)	
0	21.1
>0 – 16	29.8
16 – 24	40.4
>24	8.7
Atopic eczema (%)	20.8
Wheeze (%)	35.8
Fatty acids intake (g/day) (mean±SD)^c	
C16:0	16.00 ± 2.53
C18:0	6.38 ± 1.28
C18:1 n-9	42.14 ± 8.35
C18:2 n-6 (LA)	11.54 ± 2.60
C18:3 n-3 (ALA)	1.10 ± 0.19
C20:4 n-6 (AA)	0.16 ± 0.05
C20:5 n-3 (EPA)	0.15 ± 0.09
C22:6 n-3 (DHA)	0.27 ± 0.17
ΣTrans	1.32 ± 0.58
Σn-3	1.52 ± 0.33
Σn-6	11.70 ± 2.61

^a IgE antibodies against mite, cat dander and Poaceae plants (one or more positive response)

^b atopic dermatitis, allergic asthma or allergic rhinitis (one or more positive response)

^c Nutrient intakes were naturally log-transformed (n=496)

Table 2. Fatty acids concentrations in maternal plasma phospholipids.

Fatty acid	Maternal plasma ^a	
	mean	± SD
C16:0	30.34	± 1.80
C18:0	12.11	± 1.23
C18:1 n-9	9.20	± 1.61
C18:2 n-6 (LA)	22.94	± 3.41
C18:3 n-6 (GLA)	0.05	± 0.03
C20:2 n-6 (EDA)	0.46	± 0.10
C20:3 n-6 (DGLA)	3.50	± 0.87
C20:4 n-6 (AA)	11.36	± 1.96
C22:4 n-6 (DTA)	0.38	± 0.14
C22:5 n-6 (DPA)	0.40	± 0.17
C18:3 n-3 (ALA)	0.12	± 0.04
C20:5 n-3 (EPA)	0.41	± 0.33
C22:5 n-3 (DPA)	0.47	± 0.12
C22:6 n-3 (DHA)	4.56	± 0.90
C18:1 <i>t</i> 9	0.14	± 0.05
C18:1 <i>t</i> 11	0.18	± 0.06
CLA <i>c</i> 9 <i>t</i> 11	0.08	± 0.03
ΣTrans ^b	0.80	± 0.20
Σn-3 ^c	5.55	± 1.16
LC-PUFA n-3 ^d	5.43	± 1.16
Σn-6 ^e	39.10	± 2.35
LC-PUFA n-6 ^f	16.10	± 2.32
SFA ^g	43.14	± 1.44
MFA ^h	11.11	± 1.73
PUFA ⁱ	44.87	± 1.92

^a maternal plasma (n=274)

^bΣTrans (ΣC16:1t+ΣC18:1t+ΣC18:2t).

^cΣn-3 (ALA+EPA+DPA+DHA).

^dLCPUFA n-3 (EPA+DPA+DHA)

^eΣn-6 (LA+GLA+EDA+DGLA+AA+DTA+DPA).

^fLCPUFA n-6 (EDA+ DGLA+AA+DTA+DPA).

^gSFA (C14:0+C16+C17:0+C18:0+C20:0).

^hMFA (C16:1 n-9+C16:1 n-7+C18:1 n-9+C18:1 n-7+C20:1 n-9).

ⁱPUFA (C20:3n-9+ALA+EPA+DPA+DHA+LA+GLA+EDA+DGLA+AA+DTA+DPA).

Table 3. Pearson correlations between plasma fatty acids concentrations and dietary intake in pregnant women of the INMA Sabadell cohort study.

Fatty acid (Diet)	r	p-value
C16:0	-0.168	**
C18:0	0.150	*
C18:1 n-9	0.115	0.058
C18:2 n-6 (LA)	0.150	*
C18:3 n-3 (ALA)	0.046	0.451
C20:4 n-6 (AA)	-0.089	0.142
C20:5 n-3 (EPA)	0.334	**
C22:6 n-3 (DHA)	0.279	**
Σ Trans	-0.010	0.865
Σn-3	0.190	**
Σn-6	0.133	*
Σ Trans		
C18:1 t9	0.104	0.086
C18:1 t11	-0.065	0.286
CLA c9t11	-0.160	**

Associations are presented as Pearson's rank correlation coefficients (*p<0.05; **p<0.01)

Table 4. Pearson correlations between *trans* fatty acids and LC-PUFAs in maternal plasma phospholipids.

Fatty acids	C20:3 n-6 (DGLA)	C20:4 n-6 (AA)	C22:4 n-6 (DTA)	C22:5 n-6 (DPA)	C20:5 n-3 (EPA)	C22:5 n-3 (DPA)	C22:6 n-3 (DHA)	LC-PUFA n-6	LC-PUFA n-3
C18:1 <i>t</i>9	0.017	-0.010	0.178**	0.122*	-0.256**	-0.124*	-0.265**	0.024	-0.278**
C18:1 <i>t</i>11	-0.208**	0.058	0.096	0.031	0.025	0.082	-0.032	-0.019	-0.003
CLA <i>c</i>9<i>t</i>11	0.232**	0.048	0.315**	0.323**	0.125*	0.267**	0.153**	0.178**	0.177**
ΣTrans	-0.089	0.038	0.156*	0.109	-0.005	0.094	-0.052	0.019	-0.031
C18:1 <i>t</i>9 + C18:1 <i>t</i>6	-0.046	0.039	0.127*	0.120*	-0.249**	-0.135*	-0.238**	0.034	-0.249**
C18:1 <i>t</i>11 + CLA <i>c</i>9<i>t</i>11	-0.062	0.056	0.197**	0.154*	0.065	0.172**	0.033	0.051	0.064

Pearson correlation coefficient between the respective fatty acid in maternal plasma phospholipids (*p<0.05; **p<0.01).

Table 5. Association between the concentration of specific TFAs in maternal plasma phospholipids and atopic eczema of the infant.

Fatty acid	OR Unadjusted (95% CI)			OR Adjusted (95% CI)			
	Ref.	2	3	Ref.	2	3	P- for trend ^a
C18:1 t9	1	0.984 (0.499 – 1.940)	0.791 (0.395 – 1.582)	1	0.894 (0.424 – 1.882)	0.841 (0.396 – 1.788)	0.901
C18:1 t11	1	0.613 (0.315 – 1.193)	0.453 (0.223 – 0.918)	1	0.528 (0.254 – 1.098)	0.373 (0.171 – 0.811)	0.035
CLA c9t11	1	0.966 (0.489 – 1.908)	0.970 (0.484 – 1.947)	1	1.041 (0.495 – 2.189)	0.963 (0.456 – 2.032)	0.980
ΣTrans	1	1.356 (0.695 – 2.646)	0.748 (0.361 – 1.550)	1	1.285 (0.621 – 2.661)	0.702 (0.319 – 1.543)	0.279

^aAll values were adjusted for maternal allergy, maternal atopic manifestations, maternal education, maternal smoking, sex of child and predominant breastfeeding. The first tertile was set as the reference group.

Table 6. Association between the concentration of specific TFAs in maternal plasma phospholipids and wheeze of the infant

Fatty acid	OR Unadjusted (95% CI)				OR Adjusted (95% CI)			
	Ref.	2	3	P- for trend	Ref.	2	3	P- for trend ^a
C18:1 t9	1	1.029 (0.558 – 1.895)	0.865 (0.471 – 1.591)	0.836	1	1.042 (0.543 – 1.999)	0.814 (0.421 – 1.574)	0.726
C18:1 t11	1	0.810 (0.442 – 1.485)	0.802 (0.436 – 1.474)	0.722	1	0.893 (0.467 – 1.709)	0.888 (0.460 – 1.714)	0.922
CLA c9t11	1	1.479 (0.800 – 2.735)	1.462 (0.785 – 2.721)	0.375	1	1.432 (0.740 – 2.770)	1.398 (0.724 – 2.701)	0.494
ΣTrans	1	0.815 (0.442 – 1.502)	0.941 (0.513 – 1.727)	0.797	1	1.424 (0.734 – 2.759)	1.722 (0.867 – 3.421)	0.287

^aAll values were adjusted for maternal allergy, maternal atopic manifestations, maternal education, maternal smoking, sex of child and predominant breastfeeding. The first tertile was set as the reference group.

Publicación 3

Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort

.....

Composición de ácidos grasos del plasma materno y del cordón umbilical y el eczema atópico en la infancia en una Cohorte Española

Autores: Rosa Montes, Ainda Maribel Chisaguano, Ana Isabel Castellote, Eva Morales, Jordy Sunyer y M. Carmen López-Sabater.

Revista: *European Journal of Clinical Nutrition*

Año: 2013

Volumen: 67

Páginas: 658-663

.....

RESUMEN:

Antecedentes y Objetivos: Durante el embarazo el feto puede sintetizar *de novo* algunos AGS y AGMI utilizando la glucosa como sustrato. Sin embargo la mayor parte de los AGPI provienen desde la madre hacia el feto vía transferencia placentaria. Es por eso que se considera a los AGPI como nutrientes condicionalmente esenciales en la vida fetal y que podrían influir a largo plazo en el desarrollo de las enfermedades atópicas en la infancia. El objetivo de este trabajo fue investigar la relación entre la composición de AG del plasma materno y del cordón umbilical, y el riesgo de eczema atópico en los niños en los primeros 14 meses de vida.

Metodología: Las madres fueron reclutadas en su primer trimestre de gestación y los niños fueron monitorizados hasta los 14 meses de edad. Aunque se recogieron 363 pares de muestras de plasma materno y de cordón umbilical, sólo las madres que presentaron valores de anticuerpos IgE específicos menores a 0.35 KU/L fueron incluidas en el estudio. Así, la población final consistió en 211 parejas madre-hijo. Se analizaron muestras de plasma materno y plasma de sangre de cordón para determinar el perfil de AG de lípidos totales. La presencia del eczema atópico en los lactantes fue documentado por medio de cuestionarios a los 6 y 14 meses de edad. Modelos de regresión logística ajustados por diferentes factores de confusión sociodemográficos fueron utilizados para analizar las asociaciones entre los niveles plasmáticos de AG y el eczema atópico.

Resultados: Se encontraron altas concentraciones del total de AGPI-CL en el plasma de las madres de niños no atópicos. Las concentraciones de AGPI-CL del plasma materno se correlacionaron negativamente con el eczema atópico. En cuanto a las muestras de plasma del cordón umbilical, el ácido docosahexaenoico (DHA), la suma de AG n-3 y la suma de AGPI-CL n-3 mostraron una correlación negativa con la prevalencia de la enfermedad (OR =0.50, 0.49 y 0.49, respectivamente).

Conclusión: Nuestros resultados muestran que la composición de los ácidos grasos del feto durante el embarazo tiene un papel importante en el desarrollo del eczema atópico en la infancia temprana. La prevalencia de esta enfermedad está relacionada con bajos niveles de AG pertenecientes a la serie n-3 en plasma del cordón umbilical, especialmente DHA.

ORIGINAL ARTICLE

Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort

R Montes¹, AM Chisaguano¹, AI Castellote^{1,2}, E Morales³, J Sunyer^{3,4,5} and MC López-Sabater^{1,2}

BACKGROUND/OBJECTIVES: Fatty-acid status during *in-utero* development might influence the risk of atopic diseases in early childhood. The aim of this work was to identify the relationship between maternal plasma and cord blood fatty acid (FA) composition and the risk of atopic eczema in the offspring at 14 months of age.

SUBJECTS/METHODS: Two hundred and eleven non-atopic mothers and their children were studied. Mothers were recruited in their first trimester of gestation and children were monitored until 14 months of age. Samples of maternal plasma and cord blood plasma were analyzed to determine the FA profile of total lipids. Presence of atopic eczema in the infants was documented through questionnaires at 6 and 14 months of age.

RESULTS: Higher concentrations of total long-chain polyunsaturated FA (LC-PUFA) were found in maternal plasma of non-atopic children in relation to atopic group. Moreover, this maternal plasma LC-PUFA content was negatively correlated with the atopic eczema (odds ratios (OR) = 0.83, $P = 0.04$) in infants. Regarding cord blood samples, docosahexaenoic acid (DHA C22:6n3) and the sum of total n-3 and of LC-PUFA n-3 showed a negative correlation with the prevalence of the disease (OR = 0.50, 0.49 and 0.49, respectively).

CONCLUSIONS: Our results show that the fatty-acid status of the fetus during pregnancy has an important role in the development of atopic eczema in early childhood. The prevalence of this atopic disorder is related to lower cord blood plasma levels of FA belonging to n-3 series, especially DHA.

European Journal of Clinical Nutrition (2013) 67, 658–663; doi:10.1038/ejcn.2013.68; published online 3 April 2013

Keywords: atopic eczema; cord blood; fatty acids; n-3 LC-PUFA; pregnancy

INTRODUCTION

Several studies show that maternal intake of fatty acids (FA) during pregnancy is a major determinant of the FA status of infants at birth. Within FA, long-chain polyunsaturated FA (LC-PUFA) have an important role in infant growth and development through their functions in membrane lipids, as ligands for receptors and transcription factors that regulate gene expression, as eicosanoid precursors, and through direct interactions with proteins.¹ The synthesis of LC-PUFA by the human placenta and fetus is limited, and therefore the main source of fetus LC-PUFA must be maternal plasma via the umbilical cord.²

The prevalence of atopic diseases in children is a matter of worldwide concern, as it has increased over the last few decades and affects infants at an early age. One of the main atopic manifestations in children under 2 years of age is eczema, a pruritic inflammatory skin disease.³ Genetic factors have been proposed as important risk factors for atopy.⁴ It was therefore important to select a study group of mothers without a clinical history of atopy who presented a negligible contribution to their children's diseases.

The relationship between LC-PUFA and atopy has been widely investigated. Initial studies revealed increased levels of linoleic acid (LA C18:2n6) and lower levels of its long-chain derivatives in the plasma of patients with diagnosed atopic eczema.⁵ Several subsequent studies have reported that a decrease in the intake of n-3 PUFA and an increase in the intake of n-6 PUFA, particularly LA

may lead to an increase in atopic diseases.^{6,7} These findings may be attributed to the fact that the PUFA from different families are precursors for the production of eicosanoid mediators, such as prostaglandins and leukotrienes, which are involved in immunoregulation and inflammatory processes.^{8,9} On one hand, higher concentrations of n-6 PUFA enhance the synthesis of pro-inflammatory eicosanoids, prostaglandins of 2-series (such as PGE2) and leukotrienes of 4-series (such as LTB4). These mediators favor allergic inflammation and IgE response.¹⁰ On the other hand, n-3 PUFA gives rise to alternative mediators that are significantly less inflammatory and, moreover, favor the production of resolvins, which act by decreasing inflammation.^{11,12} The differences in lipid-mediator activity could lead to the conclusion that n-3 PUFA, conversely to n-6 PUFA, might reduce the risk of developing atopic diseases, although more comprehensive studies are needed.^{10,13}

Several studies have been performed to establish associations between maternal diet and the FA status of infants.^{14,15} Authors have attempted to find a relationship between the occurrence of certain series of FA (specially n-3 and n-6) in different biological matrices involved in the child FA supply, such as breast milk,^{16–20} maternal plasma^{6,17} and the umbilical cord,^{21,22} with the subsequent development of atopic diseases. The results obtained have been inconsistent. Whereas some works show an important relationship between atopic manifestations and a lower presence of n-3 FA in breast milk or cord blood,^{16,19,22,23} other

¹Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²CIBER in Epidemiology and Public Health, Spain; ³CREAL (Center for Research on Environmental Epidemiology), Barcelona, Spain; ⁴Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain and ⁵Parc Salut Mar—IMIM, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr MC López Sabater, Universitat de Barcelona, Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Joan XXIII s/n, 08028. Barcelona, Spain. E-mail: mclopez@ub.edu

Received 12 September 2012; revised 18 February 2013; accepted 19 February 2013; published online 3 April 2013

authors have found the opposite trend.¹⁸ In some cases the populations under study were too small or did not take into account other factors, such as parental atopy, which affect the occurrence of atopy in children.

In this study, the maternal plasma and cord blood fatty-acid profiles for atopic and non-atopic children from healthy mothers were compared. Moreover, correlations between FA from samples of cord blood and maternal plasma were evaluated.

SUBJECTS AND METHODS

Study design and participants

Data for this study were obtained from a population-based birth cohort established in the city of Sabadell (Catalonia, Spain) as part of the project *Infancia y Medio Ambiente* (INMA). INMA is a network of birth cohorts in Spain that aim to study the role of environmental pollutants in air, water and diet during pregnancy and early childhood in relation to child growth and development.²⁴ Between July 2004 and July 2006, pregnant women who visited Sabadell public health center for an ultrasound in the first trimester were recruited, based on certain criteria (over 16 years of age, intention to deliver in the reference hospital, no communication problems, singleton pregnancy and no assisted conception). Maternal blood samples were extracted during the 12th week of gestation. Venous cord blood samples were obtained from the umbilical cord during delivery. Although 363 pairs of samples' maternal and cord blood plasma were collected, only mothers who presented values of specific IgE antibodies <0.35 kU/l were included in the study. Thus, the final population consisted of 211 mother-child pairs. The FA composition of cord blood and maternal plasma was analyzed.

Information on parental characteristics, including education, socio-economic background (using the International Standard Classification of Occupations codes), siblings at birth, smoking habits and other variables, was obtained by interviewer-administered questionnaires with mothers when the child was 6- and 14-month-old.

Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Municipal Institute of Health Care (CEIC-IMAS), Barcelona, Spain.

Definition of atopy

Maternal atopy was defined according to specific IgE antibodies against cat dander, mite and Poaceae plants, which represent the most common allergens in Spain. A woman was considered to be atopic if at least one of the measured specific IgE antibodies had values ≥ 0.35 kU/l, as serum-specific IgE may be considered biomarkers for identifying the allergic phenotype.²⁵ Previous studies have revealed that maternal atopy, to a much higher degree than paternal atopy, is a key factor that influences the further development of infant atopy.²³ In this study, only non-atopic mothers (IgE < 0.35) were considered, thus minimizing hereditary factors. Information about atopic eczema was obtained from parents through two questionnaires completed when the child was 6- and 14-month-old. Atopic eczema was defined as a positive response to the question, "Has your child ever experienced atopic eczema since birth to 6 months, and from 7 to 14 months?". Thus, children whose parents reported that they had been diagnosed with eczema during both periods (recurrent eczema) were classified as atopics.

Plasma fatty-acid analysis

Blood samples were collected from mothers and babies in the aforementioned periods. The plasma samples were stored at -80°C until the assays were conducted.

Total FA were analyzed by fast-gas chromatography in accordance with a slightly modified version of Bondia-Pons *et al.*²⁶ Hundred microlitres of sample were saponified by adding 1 ml of sodium methylate (0.5% w/v) and heating to 100°C for 15 min. After cooling to 25°C , samples were esterified at 100°C for 15 min using 1 ml of boron trifluoride-methanol reagent. Subsequently, fatty-acid methyl esters were isolated by adding 500 μl of *n*-hexane. After shaking for 1 min, 1 ml of a saturated sodium chloride solution was added. Finally, the tubes were centrifuged for 8 min at 2200 g. Anhydrous sodium sulphate was added to eliminate aqueous residues. The *n*-hexane top layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter of 300 μl .

Fast-gas chromatography analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector

(Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation of fatty-acid methyl esters was carried out on a capillary column (10 m \times 0.10 mm i.d. \times 0.10 μm film thickness) coated with a Varian VF-23 ms high cyanopropyl stationary phase (Varian, Palo Alto, CA, USA). Helium was used as the carrier gas and the injector was used in split mode (1:30). The temperature program was as follows: initial temperature 120°C , a first ramp at $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 175°C (hold for 1.5 min) and a second ramp at $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250°C . Injector and detector were maintained at 250°C and 300°C , respectively. Data acquisition and processing were performed with Shimadzu-ChemStation software (Shimadzu) for gas chromatography systems.

Statistics

Means and s.d. were used to describe continuous variables. The Kolmogorov-Smirnov test was used to study the normal distribution of fatty-acid percentages. Those FA that did not present a normal distribution were naturally log-transformed.

Logistic regression was applied to estimate the effect of each FA separately on the dichotomous outcome (atopic eczema). The logistic models obtained were adjusted by six potential confounders: the sex of the child, maternal social class, maternal education, breastfeeding, maternal smoking during pregnancy and parity.

Correlations between plasma and cord blood FA were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient (ρ). All statistical analyses were performed on SPSS 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The baseline characteristics of the participants according to the child's atopic eczema status are shown in Table 1. A statistical analysis showed no significant differences in these baseline characteristics between the two groups of children studied. Thus, it was expected that these variables presented a negligible influence on the development of disease.

The levels of FA measured in the maternal plasma and cord blood for both groups, atopic and non-atopic infants, are shown in Table 2. The most abundant FA in maternal plasma was C18:2n6 (LA), which represented 32.8% of the total FA. Arachidonic acid was the main LC-PUFA, with a concentration of over 7% of the total. Nevertheless, arachidonic acid was found in much higher levels in the cord blood samples (around 13%), whereas LA only represented 12.4% of the total. It should be noted that the total n-3 fatty-acid content was higher in the cord blood samples and, conversely, n-6 FA appeared in higher proportion in the maternal plasma samples. With regard to monounsaturated FA, the levels were similar in both matrices.

Spearman correlations between the FA determined in cord blood and maternal plasma were analyzed. As expected, each FA in maternal plasma was strongly correlated with its analogous FA in the cord blood (data not shown).

No single FA in maternal plasma was significantly associated with eczema at 14 months, even after adjustment for confounders (see Table 3). However, when FA were analyzed by group, LC-PUFA showed a significant correlation with the prevalence of disease (odds ratios (OR) = 0.83, $P = 0.04$).

Regarding cord blood samples, logistic regression was also carried out and the results are presented in Table 4. A significant correlation with eczema in children was found for eicosapentaenoic acid (EPA C20:5n3) and docosahexaenoic acid (DHA), with unadjusted OR of 0.44 ($P = 0.04$) and 0.50 ($P = 0.01$), respectively. When adjusting for confounders, EPA correlation became non-significant. Therefore, the sum of total n-3 and LC-PUFA n-3 had a significant correlation with the outcome ($P = 0.004$ for both). Moreover, as in maternal plasma, the total LC-PUFA showed a negative correlation with development of the disease.

DISCUSSION

In this study, the relationships between FA status (cord blood and maternal plasma) and children with atopic eczema were

Table 1. Population characteristics of both groups, atopic and non-atopic infants

	Non-atopic (N = 170)	Atopic (N = 41)	P-value
<i>Maternal characteristics</i>			
Age (years) ^a	31.6 ± 4.3	32.1 ± 4.4	0.464 ^b
Initial weight (kg) ^a	62.4 ± 11.6	65.3 ± 10.7	0.138 ^b
BMI ^a	23.7 ± 4.2	24.7 ± 4.3	0.158 ^b
Parity (%)			
0	55.6	46.3	0.161 ^c
1	36.7	51.2	
2	7.7	2.4	
Smoker during pregnancy (%)	11.1	18.8	0.241 ^c
Education level, primary or less (%)	24.8	37.1	0.228 ^c
Social class, medium	51.4	52.9	0.349 ^c
<i>Neonates characteristics</i>			
Birth weight (g) ^a	3305.0 ± 391.6	3220.0 ± 379.8	0.211 ^b
Gestational age (weeks) ^a	39.7 ± 1.3	40.3 ± 1.2	0.050 ^b
Gender (%)			
Male	46.8	51.4	0.624 ^c
Father with atopic manifestations	21.8	23.5	0.769 ^c

Abbreviation: BMI, body mass index. ^aMean ± s.d. ^bSignificance for Student's t-test. ^cSignificance for Pearson's χ^2 test.

evaluated. The study group was set to avoid the influence of maternal atopy, as described by Hwang *et al.*²³ Thus, mothers presenting high IgE levels (>0.35 kU/l) were excluded from the study. It is obvious that the child's sole source of FA during fetal development is the maternal supply through the umbilical cord. Therefore, analyzing the FA composition of the maternal plasma and cord blood provides a large amount of information about the initial fatty-acid status of the child that can subsequently be related to the development of atopy. Moreover, the composition of maternal plasma is closely affected by dietary FA consumption,^{14,15} so it could provide information on potential dietary recommendations.

When analyzing the levels of FA in both matrices (maternal plasma and cord blood), some dissimilarities were observed (Table 2). Thus, increased amounts of n-6 LC-PUFA and n-3 LC-PUFA (especially DHA) in cord blood compared with maternal lipids were found. These differences were previously reported by other authors and could be explained by the special requirements of the fetus.²⁷ Moreover, there is a wide range of fatty-acid transporters and binding proteins in the placenta that determine the enrichment of these LC-PUFA.

In a German population, Enke *et al.*²⁷ found similar values for most individual FA in both matrices to those reported in this study (Table 2). In the case of DHA, levels were much higher in our study; this was probably because of differences between the diets of the mothers in the two populations. However, our values were similar to those reported by other authors for Western individuals who consume a Mediterranean diet.²⁸

Table 2. Fatty-acid percentages (mean ± s.d.) in maternal plasma and cord blood for both groups of children (atopic and non-atopic)

FA (%)	Maternal plasma		Cord blood	
	Non-atopic (n = 170)	Atopic (n = 41)	Non-atopic (n = 170)	Atopic (n = 41)
<i>n-6 PUFA</i>				
C18:2n6 (LA)	32.61 ± 4.16	33.14 ± 3.33	12.23 ± 1.80	12.48 ± 2.11
C18:3n6	0.26 ± 0.18	0.26 ± 0.29	0.39 ± 0.19	0.36 ± 0.09
C20:2n6	0.30 ± 0.15	0.27 ± 0.10	0.26 ± 0.09	0.24 ± 0.08
C20:3n6	1.55 ± 0.56	1.57 ± 0.39	3.07 ± 0.59	2.98 ± 0.66
C20:4n6 (AA)	7.33 ± 1.74	7.00 ± 1.21	14.13 ± 1.84	13.71 ± 1.79
C22:2n6	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.05	0.03 ± 0.04
C22:4n6	0.23 ± 0.18	0.21 ± 0.13	0.55 ± 0.20	0.53 ± 0.16
C22:5n6	0.23 ± 0.12	0.23 ± 0.10	0.81 ± 0.54	0.78 ± 0.21
<i>n-3 PUFA</i>				
C18:3n3 (ALA)	0.34 ± 0.17	0.32 ± 0.15	0.12 ± 0.08	0.12 ± 0.10
C20:5n3 (EPA)	0.39 ± 0.30	0.33 ± 0.21	0.19 ± 0.11	0.15 ± 0.08
C22:5n3	0.29 ± 0.17	0.3 ± 0.14	0.37 ± 0.45	0.37 ± 0.36
C22:6n3 (DHA)	2.67 ± 0.62	2.61 ± 1.16	4.53 ± 1.12	4.23 ± 1.14
Σn-3	3.69 ± 0.87	3.55 ± 1.29	5.21 ± 1.28	4.87 ± 1.43
Σn-6	42.56 ± 4.22	42.75 ± 3.17	31.48 ± 2.40	31.1 ± 2.56
ΣPUFA	46.37 ± 4.26	46.42 ± 3.43	37.15 ± 2.72	36.41 ± 2.87
ΣSFA	30.34 ± 2.06	30.16 ± 1.59	38.23 ± 1.52	38.01 ± 1.29
ΣMUFA	23.29 ± 3.62	23.42 ± 3.16	24.62 ± 3.04	25.56 ± 3.02
Σn-6/Σn-3	12.16 ± 3.04	12.98 ± 3.33	6.41 ± 1.68	6.82 ± 1.72
ΣLC-PUFA	13.17 ± 2.28	12.7 ± 2.21	24.41 ± 2.40	23.46 ± 2.58
Σn-3 LC-PUFA	3.35 ± 0.86	3.23 ± 1.29	5.09 ± 1.27	4.75 ± 1.42
Σn-6 LC-PUFA	9.70 ± 2.04	9.35 ± 1.39	18.86 ± 1.91	18.27 ± 2.05
Σn-6 LC-PUFA/Σn-3 LC-PUFA	3.06 ± 0.89	3.11 ± 0.75	3.93 ± 1.01	4.09 ± 0.99
Σn-3 LC-PUFA/ALA	12.16 ± 7.19	11.69 ± 6.76	58.86 ± 32.57	57.38 ± 31.61
Σn-6 LC-PUFA/LA	0.30 ± 0.08	0.29 ± 0.06	1.58 ± 0.32	1.51 ± 0.34

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; LA, linoleic acid; LC-PUFA, long-chain polyunsaturated FA; MUFA, monounsaturated FA; PUFA, polyunsaturated FA; SFA, saturated FA. (%) mean ± s.d. Σ SFA: C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0; Σ MUFA: C16:1n7 + C18:1n9n7 + C20:1n9 + C24:1; Σ PUFA: LA + C18:3n6 + ALA + C20:2n6 + C20:3n6 + C20:4n6 + AA + EPA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6 + C22:5n3 + DHA; Σ n-3: ALA + EPA + C22:5n3 + DHA. Σ n-6: LA + C18:3n6 + C20:2n6 + C20:3n6 + AA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6; LC (only FAs with >20 carbons).

Table 3. Association of maternal plasma FA with eczema in children

FA (%)	Unadjusted model			Adjusted model		
	OR	CI 95%	P-value	OR	CI 95%	P-value
<i>n-6 PUFA</i>						
C18:2n6 (LA)	1.06	0.96–1.17	0.25	1.08	0.97–1.20	0.19
lnC18:3n6	0.57	0.22–1.46	0.24	0.46	0.17–1.22	0.12
lnC20:2n6	0.77	0.22–2.73	0.69	0.68	0.19–2.51	0.57
lnC20:3n6	1.14	0.57–2.29	0.71	1.13	0.55–2.32	0.75
C20:4n6 (AA)	0.77	0.62–1.07	0.05	0.77	0.57–1.04	0.06
lnC22:2n6	2.08	0.61–7.09	0.24	1.74	0.48–6.74	0.39
lnC22:4n6	0.75	0.33–1.72	0.50	0.59	0.24–1.45	0.25
lnC22:5n6	0.70	0.31–1.59	0.40	0.57	0.23–1.38	0.21
<i>n-3 PUFA</i>						
lnC18:3n3 (ALA)	0.85	0.34–2.09	0.72	0.85	0.34–2.16	0.74
lnC20:5n3 (EPA)	0.67	0.35–1.27	0.22	0.62	0.31–1.24	0.18
lnC22:5n3	0.60	0.20–1.75	0.35	0.62	0.20–1.99	0.42
C22:6n3 (DHA)	0.93	0.56–1.57	0.80	1.02	0.63–1.65	0.94
Σn-3	0.88	0.58–1.33	0.54	0.92	0.61–1.38	0.68
Σn-6	1.01	0.91–1.11	0.92	1.00	0.90–1.12	0.94
ΣPUFA	1.00	0.91–1.10	0.93	0.94	0.90–1.10	0.94
ΣSFA	0.86	0.68–1.10	0.23	0.85	0.66–1.08	0.18
ΣMUFA	1.04	0.93–1.16	0.48	1.06	0.93–1.20	0.40
Σn-6/Σn-3	1.09	0.97–1.23	0.15	1.08	0.94–1.22	0.27
ΣLC-PUFA	0.81	0.67–0.97	0.02*	0.83	0.70–0.99	0.04*
lnΣn-3 LC-PUFA	0.41	0.09–1.94	0.26	0.32	0.10–2.57	0.42
Σn-6 LC-PUFA	0.81	0.67–0.98	0.04*	0.78	0.63–1.06	0.05
Σn-6 LC-PUFA/Σn-3 LC-PUFA	0.89	0.57–1.37	0.61	0.78	0.50–1.23	0.28
lnΣn-3 LC-PUFA/ALA	0.90	0.43–1.90	0.78	0.95	0.43–2.07	0.89
lnΣn-6 LC-PUFA/LA	0.41	0.13–1.24	0.11	0.35	0.11–1.18	0.09

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; CI, confidence interval; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; LA, linoleic acid; LC-PUFA, long-chain polyunsaturated FA; MUFA, monounsaturated FA; PUFA, polyunsaturated FA; SFA, saturated FA. Odds ratios (OR) estimated by logistic regression unadjusted and adjusted by sex, maternal social class, maternal education, breastfeeding, maternal smoking during pregnancy and parity. Σ SFA: C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0; Σ MUFA: C16:1n7 + C18:1n9n7 + C20:1n9 + C24:1; Σ PUFA: LA + C18:3n6 + ALA + C20:2n6 + C20:3n9 + C20:3n6 + AA + EPA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6 + C22:5n3 + DHA; Σ n-3: ALA + EPA + C22:5n3 + DHA. Σ n-6: LA + C18:3n6 + C20:2n6 + C20:3n6 + AA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6; LC (only FAs with >20 carbons). *P-value < 0.05.

The LC-PUFA content in maternal plasma was lower for the group of mothers whose children developed atopic eczema than for mothers of non-atopic children, and when logistic regression was carried out, this LC-PUFA content appeared to have a significant protective role in the development of the disease (Table 3). Our finding is in contrast to the study by Newson *et al.*,²⁹ which revealed no relationship between FA levels in maternal plasma and the development of eczema, although in that case the total amount of LC-PUFA was not evaluated. In a recent study, Noteboom *et al.*³⁰ suggested a negative association between the maternal ratio n-6:n-3 and the prevalence of eczema, but we did not observe any significant correlation. In any case, it seems clear that analyzing the cord blood composition should provide further information about the real FA status of the child.³¹

Many authors agree with the hypothesis that the consumption of n-3 FA results in a lower risk of developing atopic diseases.^{7,9,32} Consequently, feeding via the umbilical cord during fetal development, and via breastfeeding during the early stages of life, is particularly interesting. Thus, the relationship between the development of infant atopy and the composition of breast milk^{17–20} and cord blood^{16,21,22} has been evaluated in numerous research works, but outcomes obtained remain inconclusive.¹⁰ On one hand, most authors found an inverse correlation between the amount of n-3 FA in breast milk or cord blood and the development of atopic diseases.^{16,19,22,23,33} On the other hand, few studies have shown no evidences of a relationship^{6,29} or have even exposed the opposite trend, that is, higher amounts of n-3 FA in samples from atopic individuals than from non-atopics.^{17,18} These latter contradictory results might be explained by the use of

a very small number of individuals, especially, in the atopic group, or by the influence of parental atopy, which, in some cases, was not taken into consideration and might be a confounding factor. In this sense, it would be very useful to evaluate the results obtained in different studies, comparing the data and thus, establishing larger and more heterogeneous populations.³⁴

In our study, cord blood samples from healthy children presented higher amounts of n-3 FA, in particular, EPA and DHA, than samples from atopics. Furthermore, these increased levels of EPA and DHA may also explain the differences found in the ratios n-6:n-3 of total FA and LC-PUFA, which were consequently lower in healthy children compared with atopics. Thus, the study of correlations between cord blood FA and eczema showed that DHA, and also n-3 FA (both n-3 LC-PUFA and total n-3), was negatively correlated with the outcome (Table 4). In other words, higher levels of n-3 FA, in particular DHA, had a protective role in the development of eczema. The same trend was observed for EPA, but when adjusting for confounders, this correlation became non-significant.

Mechanisms by which elevated concentrations of EPA and DHA disadvantage atopic processes have been hypothesized.¹⁰ N-3 series FA establish a competitive process, with the n-6 series FA, for the substrate in the formation of eicosanoids. Thus, n-3 series FA give rise to eicosanoids with a slightly different structure to those formed from n-6 series FA that are believed to be less potent in inflammatory processes. Moreover, a novel group of mediators derived from n-3 FA, namely E- and D-series resolvins, have recently been identified. These mediators appear to exert anti-inflammatory and inflammation-resolving actions.¹¹

Table 4. Association of cord blood FA with eczema in children

FA (%)	Unadjusted model			Adjusted model		
	OR	CI 95%	P-value	OR	CI 95%	P-value
<i>n-6 PUFA</i>						
C18:2n6 (LA)	1.08	0.88–1.32	0.48	1.05	0.84–1.32	0.67
lnC18:3n6	0.47	0.13–1.66	0.24	0.49	0.13–1.80	0.28
lnC20:2n6	0.32	0.09–1.16	0.08	0.33	0.09–1.30	0.11
C20:3n6	0.67	0.33–1.39	0.28	0.72	0.34–1.53	0.39
C20:4n6 (AA)	0.77	0.62–1.06	0.05	0.71	0.56–1.01	0.06
lnC22:2n6	0.46	0.09–2.38	0.35	0.35	0.04–3.07	0.34
lnC22:4n6	1.07	0.42–2.77	0.88	1.05	0.39–2.83	0.92
lnC22:5n6	0.82	0.26–2.56	0.73	0.49	0.14–1.74	0.27
<i>n-3 PUFA</i>						
lnC18:3n3 (ALA)	0.71	0.36–1.39	0.32	0.66	0.30–1.46	0.31
lnC20:5n3 (EPA)	0.44	0.20–0.98	0.04*	0.48	0.19–1.20	0.11
lnC22:5n3	0.84	0.39–1.83	0.66	0.85	0.35–2.07	0.72
C22:6n3 (DHA)	0.50	0.31–0.81	0.01*	0.50	0.30–0.84	0.01*
Σn-3	0.50	0.32–0.79	0.00*	0.49	0.30–0.79	0.00*
Σn-6	0.89	0.75–1.03	0.12	0.83	0.69–1.08	0.05
ΣPUFA	0.85	0.74–1.08	0.05	0.82	0.70–1.06	0.06
lnΣSFA	0.79	0.58–1.09	0.16	0.73	0.50–1.05	0.09
ΣMUFA	1.21	0.95–1.39	0.07	1.27	0.90–1.48	0.07
Σn-6/Σn-3	1.21	0.95–1.55	0.12	1.18	0.91–1.54	0.22
ΣLC-PUFA	0.77	0.65–0.92	0.00*	0.72	0.59–0.89	0.00*
Σn-3 LC-PUFA	0.50	0.32–0.79	0.00*	0.49	0.30–0.80	0.00*
Σn-6 LC-PUFA	0.75	0.60–1.03	0.05	0.68	0.53–1.17	0.07
Σn-6 LC-PUFA/Σn-3 LC-PUFA	1.21	0.81–1.82	0.35	1.14	0.73–1.77	0.58
lnΣn-3 LC-PUFA/ALA	1.08	0.56–2.06	0.82	1.12	0.54–2.34	0.76
Σn-6 LC-PUFA/LA	0.29	0.07–1.15	0.08	0.20	0.04–1.01	0.05

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; CI, confidence interval; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; LA, linoleic acid; LC-PUFA, long-chain polyunsaturated FA; MUFA, monounsaturated FA; PUFA, polyunsaturated FA; SFA, saturated FA. Odds ratios (OR) estimated by logistic regression unadjusted and adjusted by sex, maternal social class, maternal education, breastfeeding, maternal smoking during pregnancy and parity. Σ SFA: C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0; Σ MUFA: C16:1n7 + C18:1n9n7 + C20:1n9 + C24:1; Σ PUFA: LA + C18:3n6 + ALA + C20:2n6 + C20:3n9 + C20:3n6 + AA + EPA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6 + C22:5n3 + DHA; Σ n-3: ALA + EPA + C22:5n3 + DHA. Σ n-6: LA + C18:3n6 + C20:2n6 + C20:3n6 + AA + C22:2n6 + C22:4n6 + C22:5n6; LC (only FAs with > 20 carbons). *P-value < 0.05.

As described previously, maternal plasma FA barely had influenced atopic eczema. However, strong correlations were observed when their relationship with cord blood FA was studied (data not shown). The FA of each different series was correlated with its analogous FA. Therefore, studying of these correlations lead to the assumption that maternal plasma composition also contributes, to a lesser extent, to the final prevalence of atopic eczema, as it affects cord blood composition.

In summary, this study shows that the fatty-acid composition of maternal plasma and, in particular, its transference via cord blood to the fetus has a considerable impact on childhood health. Thus, lower amounts of n-3 FA, especially DHA in cord blood were detected in children who subsequently developed atopic eczema than in non-atopic children. A lower LC-PUFA content in maternal plasma was also found for this atopic group. As infants with a low risk of developing atopic diseases were studied (that is, those with no parental history of atopy) it can be assumed that maternal diet and fatty-acid transference had a critical role in the development of the disease. Larger studies that include genetic considerations are needed to confirm these findings in order to rule out the influence of other factors involved in immune response.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of research project AGL2009-09730/ALI. R Montes thanks the Spanish Ministry of

Economy and Competitiveness for the post-doctoral Juan de la Cierva fellowship and AM Chisaguano is grateful for the FPI pre-doctoral grant. We also extend our gratitude to the study participants for their generous contribution and are also thankful to Silvia Fochs, Anna Sánchez and Núria Pey for their assistance in contacting the families, administering the questionnaires and obtaining the blood samples.

REFERENCES

- Innis SM. Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev* 2007; **83**: 761–766.
- Al MD, Badart-Smoock A, von Houwelingen AC, Hasaart TH, Hornstra G. Fat intake of women during normal pregnancy: relationship with maternal and neonatal essential fatty acid status. *J Am Coll Nutr* 1996; **15**: 49–55.
- Hill DJ, Hosking CS. Food allergy and atopic dermatitis in infancy: an epidemiologic study. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; **15**: 421–427.
- Böhme M, Wickman M, Lennart Nordvall S, Svartengren M, Wahlgren CF. Family history and risk of atopic dermatitis in children up to 4 years. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 1226–1231.
- Manku MS, Horrobin DF, Morse NL, Wright S, Burton JL. Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. *Br J Dermatol* 1984; **110**: 643–648.
- Mihirshahi S, Peat JK, Webb K, Oddy W, Marks GB, Mellis CM et al. Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; **15**: 517–522.
- Prescott SL, Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; **7**: 123–129.
- Calder PC, Miles EA. Fatty acids and atopic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; **11**: 29–36.
- Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda L-S, Diaper ND, Miles EA, Erlewyn-Lajeunesse M et al. Increased intake of oily fish in pregnancy: effects on neonatal immune responses and on clinical outcomes in infants at 6 mo. *Am J Clin Nutr* 2012; **95**: 395–404.

- 10 Sala-Vila A, Miles EA, Calder PC. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clin Exp Allergy* 2008; **38**: 1432–1450.
- 11 Calder PC. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; **83**: S1505–S1519S.
- 12 Gottrand Fdr. Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants. *J Nutr* 2008; **138**: 1807S–1812S.
- 13 Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Markert UR. Impact of PUFA on early immune and fetal development. *Br J Nutr* 2008; **100**: 1158–1168.
- 14 Donahue SMA, Rifas-Shiman SL, Olsen SF, Gold DR, Gillman MW, Oken E. Associations of maternal prenatal dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids with maternal and umbilical cord blood levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009; **80**: 289–296.
- 15 De Vriese SR, Matthys C, De Henauw S, De Backer G, Dhont M, Christophe AB. Maternal and umbilical fatty acid status in relation to maternal diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; **67**: 389–396.
- 16 Kankaanpää P, Nurmela K, Erkkilä A, Kalliomäki M, Holmberg-Marttila D, Salminen S *et al*. Polyunsaturated fatty acids in maternal diet, breast milk, and serum lipid fatty acids of infants in relation to atopy. *Allergy* 2001; **56**: 633–638.
- 17 Laitinen K, Sallinen J, Linderborg K, Isolauri E. Serum, cheek cell and breast milk fatty acid compositions in infants with atopic and non-atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2006; **36**: 166–173.
- 18 Stoney RM, Woods RK, Hosking CS, Hill DJ, Abramson MJ, Thien FCK. Maternal breast milk long-chain n-3 fatty acids are associated with increased risk of atopy in breastfed infants. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 194–200.
- 19 Thijs C, Müller A, Rist L, Kummeling I, Sniijders BEP, Huber M *et al*. Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy* 2011; **66**: 58–67.
- 20 Reichardt P, Müller D, Posselt U, Vorberg B, Diez U, Schlink U *et al*. Fatty acids in colostrum from mothers of children at high risk of atopy in relation to clinical and laboratory signs of allergy in the first year of life. *Allergy* 2004; **59**: 394–400.
- 21 Beck M, Zelczak G, Lentze MJ. Abnormal fatty acid composition in umbilical cord blood of infants at high risk of atopic disease. *Acta Paediatrica* 2000; **89**: 279–284.
- 22 Byberg K, Oymar K, Aksnes L. Fatty acids in cord blood plasma, the relation to soluble CD23 and subsequent atopy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008; **78**: 61–65.
- 23 Hwang I, Cha A, Lee H, Yoon H, Yoon T, Cho B *et al*. N-3 polyunsaturated fatty acids and atopy in Korean preschoolers. *Lipids* 2007; **42**: 345–349.
- 24 Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea Js *et al*. Cohort profile: the INMA-Infancia y Medio Ambiente-(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol* 2011; **41**: 930–940.
- 25 Alesina R, De Amici M, Ciprandi G. Serum IgE discriminates allergy from sensitisation better than skin testing. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012, In press doi:10.1016/j.jbbr.2011.03.031.
- 26 Bondia-Pons I, Castellote AI, López-Sabater MC. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B* 2004; **809**: 339–344.
- 27 Enke U, Jaudszus A, Schleussner E, Seyfarth L, Jahreis G, Kuhnt K. Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: special focus on individual trans fatty acids and conjugated linoleic acids. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 247.
- 28 Astorg P, Bertrais S, Laporte F, Arnault N, Estaquio C, Galan P *et al*. Plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of their dietary intakes: a cross-sectional study within a cohort of middle-aged French men and women. *Eur J Clin Nutr* 2007; **62**: 1155–1161.
- 29 Newson RB, Shaheen SO, Henderson AJ, Emmett PM, Sherriff A, Calder PC *et al*. Umbilical cord and maternal blood red cell fatty acids and early childhood wheezing and eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**: 531–537.
- 30 Notenboom ML, Mommers M, Jansen EHJM, Penders J, Thijs C. Maternal fatty acid status in pregnancy and childhood atopic manifestations: KOALA Birth Cohort Study. *Clin Exp Allergy*, 2011; **41**: 407–416.
- 31 Oddy WH, Pal S, Kusel MMH, Vine D, de Klerk NH, Hartmann P *et al*. Atopy, eczema and breast milk fatty acids in a high-risk cohort of children followed from birth to 5 yr. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; **17**: 4–10.
- 32 Duchén K, Björkstén B. Polyunsaturated n – 3 fatty acids and the development of atopic disease. *Lipids* 2001; **36**: 1033–1042.
- 33 Yu G, Kjellman NI, Björkstén B. Phospholipid fatty acids in cord blood: family history and development of allergy. *Acta Paediatrica* 1996; **85**: 679–683.
- 34 Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, Jansen En *et al*. Variants of the FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One* 2010; **5**: e13261.

Publicación 4

FADS and ELOVL genetic variants, cord blood fatty acid composition and risk of eczema and wheeze in childhood

.....

Variantes genéticas de los genes *FADS* y *ELOVL*, composición de ácidos grasos del cordón umbilical y riesgo de eczema y sibilancias en la infancia

Autores: Rosa Montes, Eva Morales, Aida Maribel Chisaguano, Mariona Bustamante, Ana Isabel Castellote, Jordi Sunyer, M. Carmen López-Sabater.

Revista: *European Journal of Clinical Nutrition*

En revisión

.....

RESUMEN:

Antecedentes y Objetivos: Se conoce que las variantes genéticas (SNPs) en los genes que codifican a la Δ 5- y Δ 6-desaturasas (clúster genético *FADS1 FADS2*) están asociadas con las proporciones de ácidos grasos en plasma y tejidos humanos. Sin embargo, no hay estudios que hayan analizado las variantes genéticas de las elongasas (codificadas por los genes de la familia *ELOVL*), enzimas que también participan en la biosíntesis de AGPI-CL. El objetivo de este estudio fue evaluar si las variantes genéticas de *FADS* y *ELOVL* influyen en la composición de ácidos grasos del cordón umbilical y explorar su asociación con el riesgo de eczema y sibilancias en la infancia.

Metodología: Se genotiparon 25 SNPs (11 en el clúster *FADS*, 6 en el gen *ELOVL2* y 8 en el gen *ELOVL5*) en 363 parejas de madres e hijos de la Cohorte de INMA-Sabadell. Los AGPI fueron analizados en el plasma del cordón umbilical y la información del eczema y sibilancias fue obtenida de las madres cuando los niños cumplieron 4 años de edad. Las asociaciones entre las variantes genéticas de las madres y los niños con los niveles de AGPI fueron determinadas mediante la aplicación de modelos genéticos aditivos asumiendo una tendencia por copia del alelo minoritario. También se aplicaron modelos de regresión logística para evaluar la asociación entre los SNPs de las madres y los niños y las concentraciones de AG, y el riesgo de eczema y sibilancias, ajustados por diferentes factores de confusión sociodemográficos.

Resultados: Las concentraciones de AGPI de la serie n-6, especialmente DGLA y AA del cordón umbilical están asociadas con las variantes genéticas de la madre y del niño. Madres e hijos portadores de alelos minoritarios en el SNP rs174627 del clúster *FADS* están asociados con bajas concentraciones de AA y con un menor riesgo de eczema. La misma tendencia se observó para el SNP rs7482316 y el riesgo de sibilancias. Por otro lado, los portadores de los alelos minoritarios del SNP rs12207094 localizado en el gen *ELOVL5*, tienen un alto riesgo de desarrollar eczema.

Conclusión: Las variantes genéticas de madre e hijo determinan la composición de AG al nacimiento y están asociadas con el riesgo de desarrollar manifestaciones atópicas en la infancia.

***FADS* and *ELOVL* genetic variants, cord blood fatty acid composition and risk of eczema and wheeze in childhood**

Rosa Montes^{1,2}, Eva Morales^{3,4,5}, Aida M. Chisaguano^{1,2}, Mariona Bustamante^{3,4,5,6}, Ana I. Castellote^{1,2}, Jordi Sunyer^{3,4,5,7}, M. Carmen. Lopez-Sabater^{1,2,*}

¹. Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

². CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain.

³. Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain.

⁴. Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain.

⁵. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain.

⁶. Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain.

⁷. Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

M. Carmen López Sabater, PhD

Address: Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy. Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

Phone: (+34) 934024512

Email: mclopez@ub.edu

RUNNING TITLE: **Genetic variants, FA status and atopy in children.**

SUPPLEMENTARY DATA: 5 tables, 1 Figure and 1 appendix.

Abstract

The links between genetic variants related to fatty acids (FA) metabolism and FA status have been investigated in depth, as well as the influence of both on the prevalence of diseases mainly related to lipid metabolism, especially atopic diseases. We aimed to assess whether genetic variation in *FADS* and *ELOVL* influences the concentration of umbilical cord fatty acids and to explore its association with risk of eczema and wheeze in early childhood. Data for this study came from 363 mother-child pairs of a Spanish population-based birth cohort embedded within the INfancia y Medio Ambiente (INMA) Project. Twenty-five SNPs were genotyped (11 in *FADS* cluster, 6 in *ELOVL2* and 8 in *ELOVL5*). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) were determined in cord blood and information on eczema and wheeze was obtained at the age of 4. Cord blood PUFA concentration of n-6 series, especially dihomo- γ -linoleic acid (DGLA) and arachidonic acid (AA), was associated with genetic variants in both mother and child genes. The mother/child minor allele in rs174627 in the *FADS* cluster, associated with a lower concentration of AA, was related to less risk of eczema. The same trend was observed for SNP rs7482316 and risk of wheeze. On the other hand, the minor allele at rs12207094, located in *ELOVL5*, was associated with high risk of developing eczema. Mother and child genetic variation in *FADS* and *ELOVL* determines fatty acid composition at birth and is associated with the risk of developing atopic manifestations and wheeze in early childhood.

Introduction

In recent years several studies have sought to understand how genetic variation affects metabolic pathways and thus to determine the prevalence of several related diseases, including atopy, diabetes and cardiovascular and mental diseases ^(1, 2).

Within the fatty acids (FA) metabolic pathway, it is known that long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) are mainly provided by the diet. However, they can also be synthesized by humans from their precursor essential fatty acids, linoleic acid (LA, 18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), through the action of desaturase and elongase enzymes (see **Supplemental Figure 1**). These enzymes are encoded by the *FADS* gene cluster and the *ELOVL* gene family, respectively. *FADS* cluster is composed by three genes located on chromosome 11. Within this cluster *FADS1*, and *FADS2* genes are directly related to PUFA metabolism ⁽²⁾. *ELOVL* family comprises six genes located on chromosome 6. The enzymes ELOVL2, ELOVL5 and ELOVL4 encoded by the respective genes are involved in the PUFA elongation steps ⁽³⁾. Therefore, the study of single-nucleotide polymorphisms (SNPs), located in *FADS* and *ELOVL* genes is highly relevant to understand PUFA metabolism ^(3, 4). Most previous studies focused on the analysis of SNPs in the *FADS* gene cluster and their relationship with PUFA levels in various biological matrices, such as plasma ⁽⁵⁻¹¹⁾, breast milk ^(10, 12), cord blood ^(11, 13) and brain tissue ⁽¹⁴⁾. However, SNPs in *ELOVL* genes related to PUFA metabolism have been studied much less ^(3, 12).

Since LC-PUFA are precursors of eicosanoids and similar mediators involved in the inflammatory response, it has been hypothesized that inflammatory diseases (e.g. atopy and obesity) could be associated with LC-PUFA levels and metabolism ^(15, 16). Several studies have reported that decreased levels of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) and increased levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA), in particular arachidonic acid (AA), are related to greater prevalence of atopic diseases ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. These results could be explained by the fact that PUFA of different families are precursors in the production of different eicosanoid mediators. On the one hand, higher concentrations of n-6 PUFA enhance the synthesis of pro-inflammatory eicosanoids, 2-series prostaglandins (such as PGE2) and 4-series leukotrienes (such as LTB4) ⁽²⁰⁾. These mediators favor allergic inflammation and IgE response. In addition,

n-3 PUFAs give rise to alternative mediators that are significantly less inflammatory and, moreover, enhance the production of resolvins, which reduce the inflammatory response (see **supplemental Figure 1**). Nevertheless, epidemiological evidence of the relationships between fatty acid status early in life and the development of atopic disorders in infancy and childhood is still contradictory ⁽²¹⁻³⁰⁾.

Therefore, the study of factors affecting the metabolic pathways, such as genetic variants, and the evaluation of fatty acid status are of major importance when dealing with atopic diseases in infancy. Some authors have investigated in depth how SNPs in *FADS* cluster are related to atopy ^(30, 31), and may also modulate the effects of other variables (e.g. diet or breastfeeding), on the prevalence of disease ^(32, 33). However, the influence of polymorphisms in *ELOVL* genes, which are also involved in the PUFA metabolism, has not yet been investigated.

This study aimed to explore the influence of mother and child genetic variants in *FADS* gene cluster and in *ELOVL* genes on fatty acid status at birth by analyzing cord blood composition. We also aimed to study the association of both genetic variants and fatty acid status with the risk of developing atopic manifestations during early childhood.

Methods

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all mothers involved in this study for the treatment of both mothers and children information and samples. The study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Municipal Institute of Health Care (CEIC-IMAS), Barcelona, Spain.

Population

A population-based birth cohort was established in the city of Sabadell (Catalonia, Spain) as part of the *Infancia y Medio Ambiente-(Environment and Childhood)* (INMA) Project ⁽³⁴⁾. Between July 2004 and July 2006, pregnant women who visited the public health centre of Sabadell for an ultrasound scan in their 1st trimester were recruited, provided that they fulfilled the inclusion criteria (age \geq 16years, intention to give birth

at the reference hospital, no problems of communication, singleton pregnancy, no assisted conception). Detailed information about mother's diet during pregnancy was obtained by a Food Frequency Questionnaire (FFQ). Other general questionnaires were used to evaluate parents' general health, social class, education, smoking habit and other variables. Finally, 363 mother-child pairs were included in the present study.

Definition of atopic outcomes

Information on eczema and wheeze was obtained from parental reports of medical diagnoses or treatment at 4 years of age. Atopic eczema was defined as a positive answer to both following questions: "has the child ever experienced atopic eczema in the last 12 months?" and "has the child taken any medication for atopic eczema in the last 12 months?". Wheezing was defined as a positive response to the same both questions regarding whistling or wheezing from the chest.

Genotyping procedure

Maternal DNA was extracted from blood samples obtained in the first trimester of pregnancy, whereas child DNA was extracted from cord blood obtained at birth. Details of the SNP selection process and genotyping are given in Morales *et al.* ⁽¹²⁾. Finally, 25 SNPs were genotyped in both mothers and children (11 in the *FADS* gene cluster, 6 in *ELOVL2* and 8 in *ELOVL5* genes). Rs numbers, gene location, minor allele frequencies and Hardy-Weinberg Equilibrium values are shown in the supporting information (see **Supplemental Table 1**). P-values of Fisher's exact test for violation of HWE were higher than 0.05 for all SNPs studied.

Cord blood fatty acids analysis

Venous cord blood samples were obtained at delivery from the umbilical cord and were stored at -80°C until the assays.

Total fatty acids were analyzed by fast-gas chromatography according to a slight modification of Bondia-Pons *et al.* ⁽³⁵⁾ (see **Supplemental Appendix 1**). Although 35 fatty acids were identified and quantified, authors selected only 11 LC-PUFA for further evaluations, since they are the most studied in previous works regarding the n-

3 and n-6 LC-PUFA series. 7 PUFA were selected from the n-6-PUFA series: linoleic acid (C18:2n-6, LA), γ -linolenic acid (C18:3n-6, GLA), eicosadienoic acid (C20:2n-6, EDA), dihomo- γ -linoleic acid (C20:3n-6, DGLA), arachidonic acid (C20:4n-6, AA), adrenic acid (C22:4n-6, A) and docosapentaenoic acid (C22:5n-6, DPAn-6); and 4 PUFA belonging the n-3-PUFA family: α -linolenic acid (C18:3n-3, ALA), eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA), docosapentaenoic acid (C22:5n-3, DPAn-3) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA). In addition, the EPA/AA and DHA/AA ratios, which reflect the proportions of key n-3 to n-6 fatty acids, were calculated.

Enzyme activities were calculated from relevant fatty acid product:precursor ratios, as previously described ⁽¹²⁾. Thus, ratios AA:DGLA for Δ -5 desaturase (FADS1), DGLA:LA for Δ -6 desaturase (FADS2) and DGLA:GLA for Elongase-5 (ELOVL5) were used.

Statistics

All PUFA were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. PUFA LA, GLA, EDA, DPAn-6, ALA, DPAn-3, EPA and DHA failed this test and were log-transformed to achieve normal distribution.

Associations between mother and child genetic variants with PUFA levels and ratios in cord blood were assessed by additive genetic models assuming a trend per copy of the minor allele. Logistic regression was carried out to evaluate the association between maternal and child SNPs and fatty acid concentration with risk of eczema and wheeze. SNPs were treated under an additive model. Odds ratios (ORs) and confidence intervals (95% CI) are reported as measurements of the associations between genotypes and PUFA levels with the selected outcomes. Analyses were performed unadjusted and after adjustment for different confounder variables, such as child's sex, mother's education, maternal smoking and fish consumption in pregnancy and duration of predominant breastfeeding.

Statistical analysis was performed with the R statistical package, version 2.15.2, using the SNPassoc package ⁽³⁶⁾.

Results

Characteristics of study population and percentages of fatty acids found in cord blood (median IQR) are given in **Table 1**. The most abundant fatty acids were LA and AA. Within the n-3 series, DHA had the highest concentration.

Associations of mother and child SNPs in FADS and ELOVL genes with cord blood PUFA.

In relation to maternal genetic variants (**Table 2**), several SNPs showed significant associations with PUFA concentrations, mainly with PUFA belonging to the n-6 series. LA and DGLA acids were associated with most SNPs belonging to the *FADS* gene cluster, with the minor allele being associated with higher levels of the LC-PUFA, whereas AA showed the opposite trend. DPA n-6 levels were associated with few SNPs in the *FADS* gene cluster and in this case, like AA, the homozygous for the minor allele had lower amounts of this fatty acid. EDA was associated with one SNP located in the *FADS2* gene and two SNPs in the *ELOVL2* gene. In turn, GLA showed a slight correlation with an SNP in the *ELOVL5* gene. Concentration of adrenic acid (A) was not related to any of the SNPs studied.

For n-3 FA series, carriers of minor alleles of some SNPs belonging to the *FADS* cluster had lower amounts of DPAn-3 and DHA fatty acids; while EPA was only associated with one SNP in this cluster. Within this series only the essential fatty acid ALA was associated with two SNPs in the *ELOVL5* gene.

Child SNPs were also associated with levels of PUFA in cord blood (**Table 3**). For n-6 FA series the results obtained were almost the same as those found for maternal SNPs, i.e. carriers of minor alleles who had higher amounts of DGLA also showed lower amounts of AA (rs174537, rs968567, rs174570, rs2072114, rs174602, rs526126, rs174627, rs174464) and *vice versa* (rs174626 and rs174468). In addition, some marginal associations were observed for LA, GLA and A. On the other hand, EDA was associated with some SNPs in *ELOVL* genes.

Moreover, no n-3 series FA were associated with any SNPs with the exception of DHA, which was associated with two SNPs in the *FADS* cluster (rs174627 and rs174464), with the minor allele being associated with lower levels.

Most maternal SNPs from the *FADS* cluster were associated with the estimated activity of the FADS1 enzyme, whereas FADS2 activity was affected by maternal SNPs to a lesser extent. Results obtained for children were in the same line for FADS1 and FADS2. However, ELOVL5 activity was more affected by SNPs in *FADS* cluster than in *ELOVL* (see **Supplemental Table 2**).

Associations of mother and child SNPs with child atopic outcomes.

The results obtained for the logistic regression models carried out to evaluate the influence of the SNPs studied on child outcomes, eczema and wheeze, are shown in **Table 4**. Since the relationships observed were different for both outcomes, there is no SNP associated simultaneously with both diseases. However, as can be observed, there are child and/or mother SNPs associated with the outcomes, playing a protective role for carriers of the minor allele. Thus, mother or child SNPs rs174627 and rs7482316 in the *FADS* cluster were related to risk of eczema and wheeze, respectively and showed ORs lower than 0.4 for the minor allele ($p < 0.05$). The minor allele in rs174627 was mainly associated with higher levels of DGLA in mothers and children, as well as lower AA in children. The minor allele in rs7482316 was associated with lower levels of GLA in children and DPA in mothers. On the other hand, only in children, the minor allele of SNP rs174602 in the *FADS* cluster, associated with lower levels of cord AA and higher levels of DGLA, was also related to a lower risk of wheeze (OR 0.38, $p = 0.016$).

To find the strongest association for the SNPs rs174627 and rs7482316, logistic regression models including mother and child genotypes at the same time were composed (see **Supplemental Table 5**). The maternal genotype controls the association for both outcomes, since the correlation remains significant even when the adjustment for child genotype was applied.

Two maternal SNPs in the *ELOVL5* gene, SNPs rs11968589 (OR 0.18 $p = 0.003$) and rs2294859 (OR 0.13 $p = 0.01$), were related to eczema and wheeze, respectively. Within

this *locus*, children carriers of the minor allele in the SNP rs12207094, associated with higher EDA levels, were predisposed to a higher risk of eczema (OR 3.47, $p=0.002$).

Associations between PUFA concentrations and atopic outcomes.

We did not find an association between the levels of PUFA in cord blood and risk of developing eczema and wheeze at 4 years of age (see **Supplemental Table 3 and 4**). Nor were the enzymatic activities calculated for FADS1, FADS2 and ELOVL5 related to these outcomes.

Discussion

This study evaluates the links between SNPs in *ELOVL* and *FADS* genes, which encode key enzymes of FA metabolism, and the levels of FA found in cord blood.

The levels of the studied FA remained in the same order of magnitude than those reported by other authors in cord blood ^(13,37).

Some of the SNPs studied in the *FADS* cluster from both the mother and the child were significantly related to PUFA levels in cord blood. Within the n-6 series, differences in maternal genotypes were related more to the essential C18:2n-6, whereas child genotypes had more influence on the levels of highly desaturated AA. These results corroborate those reported by other authors in the ALSPAC study ^(11,13) who suggested that the fetus may be able to synthesize n-6 LC-PUFA independently of placental transfer. Thus, the fetus genotype could play an important role in the final cord levels of n-6 PUFA. On evaluating the coinciding SNPs studied in ALSPAC and by us, results support the view that the n-3 series is less influenced than n-6 by both mother and child genotypes. However, in our study and contrary to what was expected, mother SNPs showed the greatest influence on n-3 LC-PUFA cord blood composition. This could be explained by a low ability of the fetus to n-3 series FA biosynthesis when compared with n-6 series and the great influence of the transport of these n-3 FA, especially DHA, from the mother through the placenta ⁽³⁸⁾.

In general, minor alleles in *FADS* cluster SNPs were related to higher concentrations of LA and DGLA and lower concentrations of AA, DPA and DHA. Our results corroborate

those previously reported for the same SNPs or others belonging to the same locus^(3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 30). Thus, carriers of minor alleles showed increased levels of LC-PUFA precursors, i.e. desaturase substrates (LA and DGLA) and decreased amounts of desaturation by-products. As has been mentioned, DHA levels in cord blood were affected by genotype. This result is consistent with some previous findings on this topic^(11, 13, 30), in contrast to other studies in adults in which it was reported that DHA was not influenced by *FADS* variants^(5, 6, 8). Since DHA is one of the most important FA for fetal brain development^(12, 39), it is of special relevance to understand the factors affecting its levels during pre- and post-natal periods.

Only a few SNPs in *ELOVL* genes, encoding elongases which are also key enzymes in lipid metabolism, showed influence on the cord blood FA level. The LC-PUFA that was determined most by *ELOVL* genotypes was EDA, which derives from LA through an elongation step. Minor alleles in *ELOVL* SNPs (rs953413, rs10498676 and rs3798719) were related to higher amounts of this FA and might be linked with reduced expression of elongase enzymes. Tanaka et al. reported that the minor allele at SNP rs953413 was associated with higher amounts of EPA in a GWAS study, but we did not find this association, maybe due to the smaller size of our population⁽³⁾. We found other correlations between *ELOVL* SNPs and FA levels with low statistical significance ($p>0.01$). Further studies involving bigger populations should be performed in order to establish the influence of genetic variants in this region (*ELOVL* genes) on FA metabolism.

The majority of maternal SNPs studied in the *FADS* cluster were associated with the estimated activity of the FADS1 enzyme, whereas FADS2 activity was affected by maternal SNPs to a lesser extent. Results obtained for children were along the same lines for FADS1 and FADS2, though ELOVL5 activity was more affected by SNPs in the *FADS* cluster than in *ELOVL*. The ELOVL5 activity was calculated with the ratio DGLA:GLA which is a relative estimation. The concentration of DGLA was affected in a high degree by FADS polymorphisms since it can be synthesized through two different pathways (see **Supplemental Figure 1**) in which both ELOVL and FADS enzymes can participate.

Previous findings in studies of the relationship between *FADS* genetic variants and atopic outcomes are inconclusive ^(5, 30, 31). On the one hand Schaeffer et al. found a protective role of minor alleles in allergic outcomes for two *FADS* SNPs ⁽⁵⁾ in an adult German population. On the other hand, in a study carried out in children involving two different populations, other authors reported no associations between genetic variants and several atopic outcomes ⁽³¹⁾. However, when the populations were analyzed separately at a different age, they found correlations in one of the studied populations between SNPs and atopic eczema ⁽³⁰⁾. In our study, most of the significant relationships found are consistent with the Schaeffer study. Minor alleles in mother and child SNP rs174627 were related to a lower risk of eczema. Similar associations were observed for SNP rs7482316 and wheeze. However, when mother/child polymorphisms were introduced in the same models, only the associations for maternal SNPs remained significant. Thus, the maternal genotype has considerable impact on the development of eczema and wheeze in children. Moreover, the SNP rs174627 was related to higher amounts of DGLA in cord blood, as well as lower levels of AA. The same trend was observed for SNP rs174602. Thus, it can be inferred that some minor alleles, which were associated with lower levels of AA than major alleles, were also associated with a lower risk of eczema and wheeze.

Regarding to genetic variation in *ELOVL*, children of mothers who carried the minor allele at rs2294859 and rs11968589 had a significant risk of eczema and wheeze at 4 years. Moreover, the minor alleles in SNP rs12207094, related to high EDA levels, were the only ones in this study that showed a strong influence on the risk of suffering eczema.

Several authors have reported a direct link between FA status and atopic diseases in children ^(18, 19, 40). Since LC-PUFA are mediators in the synthesis of inflammatory mediators, such as eicosanoids and prostaglandins, it has been hypothesized that they might play an important role in the development of diseases involving inflammatory processes. However, we did not find statistically significant associations between cord blood FA levels and risk of eczema or wheeze. In a previous study ⁽⁴¹⁾, involving a subsample of this study, we did find correlations between the levels of EPA and DHA in cord blood and atopic eczema in children during the first 14 months of life. At 4 years, with a higher population, the cord blood levels of EPA and DHA seem to have lower

influence on child health. It could be useful to evaluate the current FA status of children, which in turn can be partially driven by child genetic variants in genes involved in LC-PUFA metabolism, as we have seen with the association between some of these variants and the risk of atopic diseases ⁽⁷⁾.

This study has some strengths and limitations. The main strength of this study is that we assessed genetic variability not only in the *FADS* cluster but also in elongase genes involved in the LC-PUFA synthesis pathway. SNPs in *ELOVL* have been previously reported to be associated with FA in GWAS studies ⁽³⁾. We successfully obtained genotype information of both mothers and children. Thus, the present study provides extra information regarding important polymorphisms that have been little studied in relation to atopic diseases. This is the case of SNPs located in *ELOVL* genes, which were associated in a previous study with maternal FA status and child cognition ⁽¹²⁾. The main drawbacks to this study are the small sample size and the *multiple testing* survival, which probably limited its statistical power. In case of SNPs and LC-PUFA the most important interactions were strong enough to support *Bonferroni* correction (Tables 2 and 3, $p < 0.002$ as corrected limit for statistical significance). This is the case of the relations between some SNPs in *FADS* and DGLA or AA. However, the relationships of SNPs with atopic outcomes are weaker, since most of them not support *Bonferroni* correction (Table 3, $p < 0.002$ as corrected limit for statistical significance). As explained by Hall et al. ⁽⁴²⁾ studies without *multiple testing* correction are adequate for hypothesis elaboration and useful to be taken into consideration in other populations, seeking replication for only those initially associated variables. Thus, further studies in other cohorts are needed in order to corroborate our preliminary findings.

In conclusion, this study contributes to current knowledge about the role of genetic variants in the *FADS* cluster and *ELOVL* genes in the PUFA synthesis and metabolism early in life and atopic diseases in early childhood. We found that the n-6 series at birth might be more influenced by maternal and child genetic variants in the *FADS* cluster than the n-3 series. In general, the presence of minor alleles was related to higher concentrations of LA and DGLA and lower levels of AA, DPA and DHA. Some child/mother SNPs in the *FADS* cluster, associated with lower AA and higher DGLA,

were associated with a lower risk of developing eczema and wheeze at the age of 4. Only one SNP in *ELOVL* was found to be related to high risk of eczema.

Acknowledgements

The authors are grateful to Silvia Fochs, Anna Sánchez and Nuria Pey for their assistance in contacting the families and administering the questionnaires. Special thanks go to INMA study participants for their generous contribution. The authors thank Mr. Toffa Evans for his help with the English grammar and expression.

Financial support

This study was funded by grants from the Carlos III Health Institute (Red INMA G03/176, CB06/02/0041 and CIBERobn), the Spanish Ministry of Health (FIS-PI041436, FIS-PI081151), the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2009-09730), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-40254-C03-02) and the Generalitat de Catalunya-CIRIT (1999SGR 00241, 2009SGR 606). RM and AMC's work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through a *Juan de la Cierva* post-doctoral contract and a FPI pre-doctoral grant, respectively.

Conflict of interest

The authors, R. Montes, E. Morales, A.M. Chisaguano, M. Bustamante, A.I. Castellote, J. Sunyer and M.C. Lopez-Sabater, declare no conflicts of interest.

Authorship

The author's contribution was as follows: JS & MCLS conceived and designed the experiments; RM., AMC, AIC, EM & MB performed the experiments; RM & EM analyzed the data; RM wrote the paper; EM & MB provided additional expertise; MCLS had primary responsibility for final content and all authors read and approved the final manuscript.

References

1. Lattka E, Klopp N, Demmelmair H et al. (2012) Genetic variations in polyunsaturated fatty acid metabolism - Implications for child health? *Ann Nutr Metab* 60, 8-17.
2. Glaser C, Lattka E, Rzehak P et al. (2011) Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Maternal & Child Nutrition* 7, 27-40.
3. Tanaka T, Shen J, Abecasis GaR et al. (2009) Genome-Wide Association Study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI study. *PLoS Genet* 5, e1000338.
4. Glaser C, Heinrich J, Koletzko B (2010) Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism* 59, 993-999.
5. Schaeffer L, Gohlke H, Maller M et al. (2006) Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 15, 1745-1756.
6. Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L et al. (2008) SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* 43, 289-299.
7. Rzehak P, Heinrich J, Klopp N et al. (2009) Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (FADS1 FADS2) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *Br J Nutr* 101, 20-26.
8. Bokor S, Dumont J, Spinneker A et al. (2010) Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res* 51, 2325-2333.
9. Mathias RA, Vergara C, Gao L et al. (2010) FADS genetic variants and w-6 polyunsaturated fatty acid metabolism in a homogeneous island population. *J Lipid Res* 51, 2766-2774.
10. Xie L, Innis SM (2008) Genetic Variants of the FADS1 FADS2 Gene Cluster Are Associated with Altered (n-6) and (n-3) Essential Fatty Acids in Plasma and

-
- Erythrocyte Phospholipids in Women during Pregnancy and in Breast Milk during Lactation. *J Nutr* 138, 2222-2228.
11. Steer CD, Hibbeln JR, Golding J et al. (2012) Polyunsaturated fatty acid levels in blood during pregnancy, at birth and at 7 years: their associations with two common FADS2 polymorphisms. *Hum Mol Genet* 21, 1504-1512.
 12. Morales E, Bustamante M, Gonzalez JR et al. (2011) Genetic Variants of the FADS Gene Cluster and ELOVL Gene Family, Colostrums LC-PUFA Levels, Breastfeeding, and Child Cognition. *PLoS ONE* 6, e17181.
 13. Lattka E, Koletzko B, Zeilinger S et al. (2012) Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (FADS) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Br J Nutr* 109(7), 1196-1210.
 14. Freemantle E, Lalovic A, Mechawar N et al. (2012) Age and Haplotype Variations within FADS1 Interact and Associate with Alterations in Fatty Acid Composition in Human Male Cortical Brain Tissue. *PLoS ONE* 7, e42696.
 15. Calder PC (2006) Abnormal fatty acid profiles occur in atopic dermatitis but what do they mean? *Clin Exp Allergy* 36, 138-141.
 16. Sala-Vila A, Miles EA, Calder PC (2008) Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clin Exp Allergy* 38, 1432-1450.
 17. Thijs C, Müller A, Rist L et al. (2011) Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy* 66, 58-67.
 18. Mahrshahi S, Peat JK, Webb K et al. (2004) Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *Pediatr Allergy Immunol* 15, 517-522.
 19. Byberg K, Oymar K, Aksnes L (2008) Fatty acids in cord blood plasma, the relation to soluble CD23 and subsequent atopy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78, 61-65.
 20. Calder PC (2006) N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83, S1505-S1519S.
 21. Lauritzen L, Halkjaer LB, Mikkelsen TB et al. (2006) Fatty acid composition of human milk in atopic Danish mothers. *Am J Clin Nutr* 84, 190-196.

22. Notenboom ML, Mommers M, Jansen EHJM et al. (2011) Maternal fatty acid status in pregnancy and childhood atopic manifestations: KOALA Birth Cohort Study. *Clin Exp Allergy* 41, 407-416.
23. Hwang I, Cha A, Lee H et al. (2007) N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Atopy in Korean Preschoolers. *Lipids* 42, 345-349.
24. Kremmyda L-S, Vlachava M, Noakes P et al. (2011) Atopy Risk in Infants and Children in Relation to Early Exposure to Fish, Oily Fish, or Long-Chain Omega-3 Fatty Acids: A Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 41, 36-66.
25. Lowe AJ, Thien FCK, Stoney RM et al. (2008) Associations between fatty acids in colostrum and breast milk and risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 38, 1745-1751.
26. Miyake Y, Tanaka K, Sasaki S et al. (2011) Polyunsaturated fatty acid intake and prevalence of eczema and rhinoconjunctivitis in Japanese children: The Ryukyus Child Health Study. *BMC Public Health* 11, 358.
27. Nwaru BI, Erkkola M, Lumia M et al. (2012) Maternal intake of fatty acids during pregnancy and allergies in the offspring. *Br J Nutr* 108, 720-732.
28. Oddy WH, Pal S, Kusel MMH et al. (2006) Atopy, eczema and breast milk fatty acids in a high-risk cohort of children followed from birth to 5 yr. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 4-10.
29. Pike KC, Calder, P.C., Inskip, H.M., Robinson, S.M., Roberts, G., Cooper, C., Godfrey, K.M., Lucas J.S.A. (2012) Maternal Plasma Phosphatidylcholine Fatty Acids and Atopy and Wheeze in the Offspring at Age of 6 Years. *Clin Dev Immunol* 2012: 474613.
30. Rzehak P, Thijs C, Standl M et al. (2010) Variants of the FADS1 FADS2 Gene Cluster, Blood Levels of Polyunsaturated Fatty Acids and Eczema in Children within the First 2 Years of Life. *PLoS ONE* 5, e13261.
31. Singmann P, Rzehak P, Berdel D et al. (2010) No association between FADS polymorphisms and atopic diseases in children from the GINI and LISA birth cohorts. *Allergy* 65, 1627-1629.

32. Standl M, Sausenthaler S, Lattka E et al. (2011) FADS gene cluster modulates the effect of breastfeeding on asthma. Results from the GINIplus and LISApplus studies. *Allergy* 67, 83-90.
33. Standl M, Sausenthaler S, Lattka E et al. (2011) FADS gene variants modulate the effect of dietary fatty acid intake on allergic diseases in children. *Clin Exp Allergy* 41, 1757-1766.
34. Guxens M, Ballester F, Espada M et al. (2011) Cohort Profile: The INMA-Infancia y Medio Ambiente-(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol*, 1-11.
35. Bondia-Pons I, Castellote AI, López-Sabater MC (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B* 809, 339-344.
36. Gonzalez JR, Armengol L, Sola X et al. (2007) SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 654-655.
37. Beck M, Zelczak G, Lentze MJ (2000) Abnormal fatty acid composition in umbilical cord blood of infants at high risk of atopic disease. *Acta Paediatr* 89, 279-284.
38. Larque E, Demmelmair H, Gil-Sanchez A et al. (2011) Placental transfer of fatty acids and fetal implications. *Am J Clin Nutr* 94, 1908S-1913S.
39. Schuchardt J, Huss M, Stauss-Grabo M et al. (2010) Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr* 169, 149-164.
40. Laitinen K, Sallinen J, Linderborg K et al. (2006) Serum, cheek cell and breast milk fatty acid compositions in infants with atopic and non-atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 36, 166-173.
41. Montes R, Chisaguano AM, Castellote AI et al. (2013) Fatty-acid composition of maternal and umbilical cord plasma and early childhood atopic eczema in a Spanish cohort. *Eur J Clin Nutr* 67, 658-663.
42. Hall IP, Blakey JD (2005) Genetic association studies in Thorax. *Thorax* 60, 357-359.

Table 1. Characteristics of studied population.

Maternal characteristics	
Age at delivery, mean (IQR)	31.5 (28.7-34.5)
Body Mass Index (BMI), mean (IQR)	23.7 (20.9-25.6)
Social class (%)	
Professional	24.3
Skilled manual & non-manual	49.7
Partially skilled & unskilled	26.0
Education (%)	
High	28.6
Secondary	41.7
Primary or less	29.7
Smoking in pregnancy, yes (%)	13.9
Atopic eczema, yes (%)	13.5
Allergy (IgE \geq 0.35)*, yes (%)	31.2
Children characteristics	
Sex, male (%)	47.1
Breastfeeding, yes (%)	92.8
Reported eczema 4y., yes (%)	20.1
Reported wheezing 4y., yes (%)	18.4
Fatty acids in cord blood**	
	Mean (IQR)
n-6 series	
C18:2n-6 LA	11.89 (10.72-13.72)
C18:3n-6 GLA	0.36 (0.31-0.41)
C20:2n-6 EDA	0.25 (0.21-0.29)
C20:3n-6 DGLA	2.99 (2.56-3.39)
C20:4n-6 AA	13.75 (12.51-15.24)
C22:4n-6 A	0.56 (0.47-0.65)
C22:5n-6 DPAn-6	0.76 (0.61-0.96)
n-3 series	
C18:3n-3 ALA	0.09 (0.06-0.14)
C20:5n-3 EPA	0.15 (0.10-0.22)
C22:5n-3 DPAn-3	0.29 (0.19-0.42)
C22:6n-3 DHA	4.23 (3.63-5.09)

* IgE antibodies against cat dander, mite, and Poaceae plants (one or more manifestations).

** % (w/w) respect to total fatty acids

Table 2. Associations of the maternal variants in the *FADS* and *ELOVL* genes with fatty acids in cord blood.

SNP	Location	M/m	n-6										n-3		
			LA	GLA	EDA	DGLA	AA	A	DPAn-6	ALA	EPA	DPAn-3	DHA		
			ln(18:2)	ln(18:3)	ln(20:2)	(20:3)	(20:4)	(22:4)	ln(22:5)	ln(18:3)	ln(20:5)	ln(22:5)	ln(22:6)		
rs174537	Cluster	G/T	0.022	0.289	0.070	1.00e-06	1.00e-05	0.217	0.049	0.413	0.381	0.003	0.036		
	<i>FADS</i>		0.037			0.430	-0.779		-0.069			-0.160	-0.049		
rs968567	Cluster	G/A	0.713	0.938	0.556	1.10e-06	0.306	0.641	0.469	0.714	0.136	0.001	0.291		
	<i>FADS</i>					0.397						-0.224			
rs174570	Cluster	C/T	0.008	0.510	0.344	5.40e-04	0.002	0.187	0.004	0.174	0.346	0.646	0.173		
	<i>FADS</i>		0.067			0.307	-0.843		-0.162						
rs2072114	Cluster	A/G	0.265	0.536	0.005	3.00e-05	1.50e-04	0.385	0.466	0.448	0.096	0.008	0.003		
	<i>FADS</i>				0.117	0.352	-1.019					-0.219	-0.106		
rs174602	Cluster	A/G	0.001	0.154	0.391	0.026	0.087	0.904	0.491	0.706	0.414	0.509	0.560		
	<i>FADS</i>		0.052			0.125									
rs526126	Cluster	C/G	0.010	0.667	0.874	0.018	0.004	0.095	0.074	0.540	0.445	0.859	0.833		
	<i>FADS</i>		0.054			0.169	-0.636								
rs174626	Cluster	T/C	0.014	0.793	0.729	8.00e-04	0.044	0.143	0.067	0.750	0.175	0.960	0.603		
	<i>FADS</i>		-0.036			-0.169	0.328								
rs174627	Cluster	C/T	0.041	0.940	0.786	0.001	0.108	0.760	0.729	0.286	0.823	0.014	0.168		
	<i>FADS</i>		0.043			0.230						-0.172			
rs7482316	Cluster	A/G	0.213	0.194	0.765	0.445	0.702	0.181	0.038	0.883	0.007	0.158	0.027		
	<i>FADS</i>					6.00e-05	0.059	0.938	-0.116		0.223	0.082	0.030		
rs174464	Cluster	C/T	0.177	0.694	0.636	0.241			0.339	0.856	0.942	0.030	0.030		
	<i>FADS</i>					0.241						-0.125	-0.055		
rs174468	Cluster	G/A	0.244	0.184	0.746	2.90e-04	0.204	0.452	0.116	0.719	0.206	0.584	0.411		
	<i>FADS</i>					-0.188									

P value and difference of each SNP under an additive model (MM/Mm/mm) for the respective outcome (LC-PUFA) in a simple regression model. The difference is only shown for those SNPs with a p value < 0.05 and is marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction p = 2.0e-03).

Table2. Cont.

SNP	Location	M/m	n-6										n-3		
			LA ln(18:2)	GLA ln(18:3)	EDA ln(20:2)	DGLA (20:3)	AA (20:4)	A (22:4)	DPAn-6 ln(22:5)	ALA ln(18:3)	EPA ln(20:5)	DPAn-3 ln(22:5)	DHA ln(22:6)		
rs3734397	ELOVL2	A/G	P value 0.456	0.545	0.248	0.600	0.281	0.419	0.154	0.143	0.994	0.832	0.575		
			Diff.												
rs953413	ELOVL2	G/A	P value 0.436	0.731	0.018	0.517	0.645	0.968	0.166	0.565	0.909	0.805	0.941		
			Diff.		0.060										
rs10498676	ELOVL2	G/A	P value 0.091	0.793	0.877	0.093	0.879	0.447	0.862	0.448	0.597	0.950	0.605		
			Diff.												
rs6936315	ELOVL2	T/C	P value 0.964	0.596	0.107	0.076	0.072	0.092	0.423	0.724	0.739	0.433	0.887		
			Diff.												
rs3798719	ELOVL2	C/T	P value 0.841	0.647	0.005	0.368	0.657	0.230	0.163	0.760	0.988	0.457	0.971		
			Diff.		0.076										
rs13204015	ELOVL2	T/C	P value 0.018	0.439	0.068	0.276	0.204	0.705	0.460	0.139	0.644	0.802	0.779		
			Diff.	-0.084											
rs17544159	ELOVL5	A/C	P value 0.376	0.029	0.943	0.890	0.297	0.834	0.868	0.115	0.297	0.609	0.302		
			Diff.	0.145											
rs2281274	ELOVL5	T/C	P value 0.130	0.921	0.686	0.182	0.245	0.200	0.555	0.366	0.146	0.508	0.182		
			Diff.												
rs2294859	ELOVL5	T/C	P value 0.163	0.209	0.757	0.654	0.199	0.352	0.122	0.061	0.676	0.545	0.306		
			Diff.												
rs761179	ELOVL5	T/C	P value 0.455	0.609	0.128	0.840	0.511	0.203	0.187	0.802	0.178	0.482	0.151		
			Diff.												
rs9395855	ELOVL5	T/C	P value 0.250	0.063	0.386	0.646	0.720	0.547	0.968	0.039	0.977	0.566	0.359		
			Diff.							0.102					
rs11968589	ELOVL5	C/T	P value 0.852	0.959	0.123	0.664	0.473	0.605	0.240	0.603	0.343	0.651	0.076		
			Diff.												
rs2397142	ELOVL5	C/G	P value 0.483	0.705	0.142	0.968	0.575	0.114	0.230	0.703	0.125	0.639	0.098		
			Diff.												
rs12207094	ELOVL5	A/T	P value 0.743	0.528	0.777	0.714	0.934	0.927	0.116	0.040	0.156	0.909	0.300		
			Diff.							0.141					

P value and difference of each SNP under an additive model (MM/Mm/mm) for the respective outcome (LC-PUFA) in a simple regression model. The difference is only shown for those SNPs with a p value<0.05 and is marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction p=2.0e-03).

Table 3. Associations of the child variants in the *FADS* and *ELOVL* genes with fatty acids in cord blood.

SNP	Location	M/m	n-6										n-3			
			LA	GLA	EDA	DGLA	AA	A	DPAn-6	ALA	EPA	DPAn-3	DHA			
rs174537	Cluster	G/T	ln(18:2)	ln(18:3)	ln(20:2)	(20:3)	(20:4)	(22:4)	ln(22:5)	ln(18:3)	ln(20:5)	ln(22:5)	ln(22:6)			
	<i>FADS</i>	P value	0.047	0.077	0.733	2.83e-20	1.40e-04	0.425	0.082	0.986	0.162	0.123	0.329			
rs968567	Cluster	G/A	0.034	0.024	0.529	0.520	0.194	0.857	0.251	0.938	0.135	0.208	0.515			
	<i>FADS</i>	P value	0.265	-0.093	0.529	0.526	0.194	0.857	0.251	0.938	0.135	0.208	0.515			
rs174570	Cluster	C/T	0.102	0.283	0.990	5.00e-04	0.002	0.011	0.051	0.650	0.771	0.591	0.175			
	<i>FADS</i>	P value	0.102	0.283	0.990	5.00e-04	0.002	0.011	0.051	0.650	0.771	0.591	0.175			
rs2072114	Cluster	A/G	0.458	0.137	0.777	1.38e-06	0.005	0.913	0.963	0.072	0.686	0.210	0.912			
	<i>FADS</i>	P value	0.458	0.137	0.777	1.38e-06	0.005	0.913	0.963	0.072	0.686	0.210	0.912			
rs174602	Cluster	A/G	0.568	0.082	0.988	3.70e-03	0.053	0.467	0.251	0.508	0.505	0.923	0.629			
	<i>FADS</i>	P value	0.568	0.082	0.988	3.70e-03	0.053	0.467	0.251	0.508	0.505	0.923	0.629			
rs526126	Cluster	C/G	0.144	0.291	0.843	1.80e-03	0.008	0.567	0.482	0.525	0.280	0.940	0.769			
	<i>FADS</i>	P value	0.144	0.291	0.843	1.80e-03	0.008	0.567	0.482	0.525	0.280	0.940	0.769			
rs174626	Cluster	T/C	0.052	0.007	0.652	0.261	-0.647	0.068	0.094	0.606	0.445	0.978	0.169			
	<i>FADS</i>	P value	0.052	0.007	0.652	0.261	-0.647	0.068	0.094	0.606	0.445	0.978	0.169			
rs174627	Cluster	C/T	0.186	0.851	0.358	3.00e-04	0.055	0.502	0.776	0.853	0.453	0.591	0.035			
	<i>FADS</i>	P value	0.186	0.851	0.358	3.00e-04	0.055	0.502	0.776	0.853	0.453	0.591	0.035			
rs7482316	Cluster	A/G	0.308	0.024	0.779	0.298	-0.504	0.124	0.173	0.454	0.063	0.113	0.722			
	<i>FADS</i>	P value	0.308	0.024	0.779	0.298	-0.504	0.124	0.173	0.454	0.063	0.113	0.722			
rs174464	Cluster	C/T	0.267	0.507	0.128	0.041	0.041	0.600	0.937	0.847	0.862	0.463	0.045			
	<i>FADS</i>	P value	0.267	0.507	0.128	0.041	0.041	0.600	0.937	0.847	0.862	0.463	0.045			
rs174468	Cluster	G/A	0.150	0.100	0.653	9.00e-04	0.001	0.050	0.074	0.146	0.200	0.478	-0.053			
	<i>FADS</i>	P value	0.150	0.100	0.653	9.00e-04	0.001	0.050	0.074	0.146	0.200	0.478	-0.053			

P value and difference of each SNP under an additive model (MM/Mm/mm) for the respective outcome (LC-PUFA) in a simple regression model. The difference is only shown for those SNPs with a p value < 0.05 and is marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction p = 2.0e-03).

Table 3. Cont.

SNP	Location	M/m	n-6						n-3					
			LA	GLA	EDA	DGLA	AA	A	DPAn-6	ALA	EPA	DPAn-3	DHA	
			ln(18:2)	ln(18:3)	ln(20:2)	(20:3)	(20:4)	(22:4)	ln(22:5)	ln(18:3)	ln(20:5)	ln(22:5)	ln(22:6)	
rs3734397	ELOVL2	A/G	P value Diff.	0.807	0.144	0.491	0.335	0.507	0.934	0.781	0.314	0.562	0.818	0.773
rs953413	ELOVL2	G/A	P value Diff.	0.622	0.220	4.00e-04 0.101	0.236	0.729	0.009 0.043	0.166	0.112	0.516	0.459	0.626
rs10498676	ELOVL2	G/A	P value Diff.	0.080	0.610	0.025 0.094	0.027 0.185	0.707	0.601	0.309	0.670	0.128	0.780	0.796
rs6936315	ELOVL2	T/C	P value Diff.	0.716	0.699	0.243	0.909	0.808	0.077	0.913	0.209	0.291	0.915	0.052
rs3798719	ELOVL2	C/T	P value Diff.	0.198	0.212	0.010 0.078	0.984	0.939	0.077	0.875	0.202	0.605	0.217	0.303
rs13204015	ELOVL2	T/C	P value Diff.	0.106	0.648	0.403	0.581	0.220	0.639	0.854	0.066	0.839	0.531	0.876
rs17544159	ELOVL5	A/C	P value Diff.	0.341	0.846	0.257	0.770	0.395	0.520	0.887	0.913	0.192	0.914	0.133
rs2281274	ELOVL5	T/C	P value Diff.	0.241	0.688	0.640	0.867	0.101	0.155	0.234	0.641	0.537	0.845	0.307
rs2294859	ELOVL5	T/C	P value Diff.	0.822	0.531	0.665	0.765	0.756	0.970	0.598	0.661	0.503	0.602	0.113
rs761179	ELOVL5	T/C	P value Diff.	0.938	0.607	0.815	0.227	0.984	0.891	0.947	0.387	0.690	0.644	0.736
rs9395855	ELOVL5	T/C	P value Diff.	0.848	0.272	0.715	0.058	0.851	0.705	0.908	0.830	0.319	0.816	0.596
rs11968589	ELOVL5	C/T	P value Diff.	0.490	0.424	0.266	0.836	0.097	0.802	0.536	0.396	0.481	0.404	0.052
rs2397142	ELOVL5	C/G	P value Diff.	0.900	0.514	0.794	0.261	0.971	0.641	0.521	0.301	0.913	0.452	0.794
rs12207094	ELOVL5	A/T	P value Diff.	0.455	0.940	0.044 -0.093	0.295	0.985	0.295	0.751	0.845	0.205	0.417	0.076

P value and difference of each SNP under an additive model (MM/Mm/mm) for the respective outcome (LC-PUFA) in a simple regression model. The difference is only shown for those SNPs with a p value<0.05 and is marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction p=2.0e-03).

Table 4. Associations of the maternal or child variants in the *FADS* and *ELOVL* genes with child outcomes at 4 years.

SNP	Location	M/m	MOTHER SNP			CHILD SNP		
			Eczema 4y	Wheeze 4 y	Eczema 4y	Wheeze 4 y	Eczema 4y	Wheeze 4 y
rs174537	<i>Cluster</i>	G/T	P value	0.278	0.293	0.655	0.155	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.37(0.78-2.40)	1.39 (0.75-2.56)	1.14(0.64-2.04)	0.62(0.31-1.22)	
rs968567	<i>Cluster</i>	G/A	P value	0.310	0.432	0.51	0.749	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.46 (0.71-2.99)	1.39 (0.62-3.10)	1.28 (0.62-2.66)	0.87 (0.38-2.03)	
rs174570	<i>Cluster</i>	C/T	P value	0.866	0.692	0.578	0.116	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.08 (0.45-2.56)	0.83 (0.32-2.14)	0.78 (0.31-1.92)	0.44 (0.14-1.34)	
rs2072114	<i>Cluster</i>	A/G	P value	0.250	0.167	0.858	0.706	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.66 (0.71-3.89)	1.93 (0.77-4.85)	1.08 (0.45-2.62)	0.83 (0.31-2.21)	
rs174602	<i>Cluster</i>	A/G	P value	0.989	0.634	0.839	0.016	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.00 (0.55-1.83)	0.84 (0.41-1.73)	1.07 (0.57-1.99)	0.38 (0.15-0.92)	
rs526126	<i>Cluster</i>	C/G	P value	0.454	0.527	0.986	0.136	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	0.74 (0.34-1.63)	1.29 (0.59-2.85)	1.01 (0.48-2.13)	1.82 (0.83-3.98)	
rs174626	<i>Cluster</i>	T/C	P value	0.933	0.755	0.911	0.868	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.02 (0.61-1.70)	0.92 (0.53-1.59)	1.03 (0.60-1.79)	1.05 (0.59-1.87)	
rs174627	<i>Cluster</i>	C/T	P value	0.039	0.651	0.016	0.710	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	0.38 (0.14-1.05)	1.23 (0.51-2.95)	0.31 (0.11-0.90)	0.85 (0.35-2.04)	
rs7482316	<i>Cluster</i>	A/G	P value	0.254	0.014	0.065	0.024	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.59 (0.73-3.45)	0.22 (0.05-0.96)	2.41 (0.96-6.07)	0.23 (0.05-1.05)	
rs174464	<i>Cluster</i>	C/T	P value	0.140	0.605	0.066	0.845	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	0.59 (0.29-1.21)	1.2 (0.60-2.42)	0.55 (0.29-1.07)	1.07 (0.54-2.10)	
rs174468	<i>Cluster</i>	G/A	P value	0.678	0.680	0.687	0.338	
	<i>FADS</i>		OR (95% CI)	1.11 (0.68-1.82)	0.89 (0.51-1.55)	1.12 (0.64-1.96)	1.34 (0.74-2.44)	

P value and OR (95% CI) of the additive coded SNP (MM/Mm/mm) for the respective outcome (eczema and wheeze) in a simple regression model. All models were adjusted for sex, maternal social class, maternal education, maternal smoking during pregnancy, breastfeeding and maternal blue fish intake during pregnancy. Results with $p < 0.05$ are marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction $p = 0.002$).

Table 4. Cont.

SNP	Location	M/m	MOTHER SNP			CHILD SNP		
			Eczema 4y	Wheeze 4y	Eczema 4y	Eczema 4y	Wheeze 4y	
rs3734397	ELOVL2	A/G	P value 0.348	0.607	0.827	0.373	0.827	0.373
			OR (95% CI) 1.34 (0.73-2.44)	0.83 (0.41-1.68)	0.93 (0.48-1.79)	0.73 (0.35-1.49)	0.93 (0.48-1.79)	0.73 (0.35-1.49)
rs953413	ELOVL2	G/A	P value 0.815	0.379	0.786	0.978	0.786	0.978
			OR (95% CI) 0.94 (0.57-1.56)	1.28 (0.74-2.21)	1.08 (0.62-1.87)	0.99 (0.54-1.82)	1.08 (0.62-1.87)	0.99 (0.54-1.82)
rs10498676	ELOVL2	G/A	P value 0.451	0.308	0.090	0.711	0.090	0.711
			OR (95% CI) 0.76 (0.37-1.58)	1.48 (0.70-3.10)	0.45 (0.16-1.23)	0.85 (0.34-2.08)	0.45 (0.16-1.23)	0.85 (0.34-2.08)
rs6936315	ELOVL2	T/C	P value 0.220	0.835	0.582	0.218	0.582	0.218
			OR (95% CI) 0.62 (0.28-1.37)	1.09 (0.48-2.49)	0.79 (0.35-1.82)	1.72 (0.73-4.05)	0.79 (0.35-1.82)	1.72 (0.73-4.05)
rs3798719	ELOVL2	C/T	P value 0.173	0.500	0.050	0.452	0.050	0.452
			OR (95% CI) 1.46 (0.85-2.49)	1.24 (0.67-2.31)	1.79 (1.00-3.21)	1.28 (0.68-2.40)	1.79 (1.00-3.21)	1.28 (0.68-2.40)
rs13204015	ELOVL2	T/C	P value 0.908	0.103	0.513	0.184	0.513	0.184
			OR (95% CI) 0.94 (0.30-2.90)	0.24 (0.03-1.93)	1.56 (0.42-5.76)	2.55 (0.68-9.65)	1.56 (0.42-5.76)	2.55 (0.68-9.65)
rs17544159	ELOVL5	A/C	P value 0.166	0.802	0.772	0.887	0.772	0.887
			OR (95% CI) 0.44 (0.12-1.56)	1.15 (0.39-3.44)	1.19 (0.38-3.75)	1.09 (0.32-3.67)	1.19 (0.38-3.75)	1.09 (0.32-3.67)
rs2281274	ELOVL5	T/C	P value 0.082	0.590	0.728	0.423	0.728	0.423
			OR (95% CI) 0.6 (0.33-1.09)	0.84 (0.45-1.58)	1.12 (0.60-2.06)	0.76 (0.38-1.52)	1.12 (0.60-2.06)	0.76 (0.38-1.52)
rs2294859	ELOVL5	T/C	P value 0.735	0.010	0.849	0.765	0.849	0.765
			OR (95% CI) 1.18 (0.45-3.14)	0.13 (0.02-1.01)	0.89 (0.26-3.02)	0.82 (0.21-3.12)	0.89 (0.26-3.02)	0.82 (0.21-3.12)
rs761179	ELOVL5	T/C	P value 0.520	0.490	0.652	0.551	0.652	0.551
			OR (95% CI) 1.19 (0.70-2.05)	1.23 (0.69-2.20)	0.88 (0.49-1.56)	1.2 (0.66-2.21)	0.88 (0.49-1.56)	1.2 (0.66-2.21)
rs9395855	ELOVL5	T/C	P value 0.913	0.616	0.499	0.439	0.499	0.439
			OR (95% CI) 1.03 (0.61-1.73)	1.16 (0.65-2.05)	1.21 (0.69-2.13)	0.79 (0.44-1.43)	1.21 (0.69-2.13)	0.79 (0.44-1.43)
rs11968589	ELOVL5	C/T	P value 0.003	0.270	0.307	0.414	0.307	0.414
			OR (95% CI) 0.18 (0.04-0.79)	1.59 (0.72-3.51)	0.65 (0.28-1.52)	1.41 (0.63-3.16)	0.65 (0.28-1.52)	1.41 (0.63-3.16)
rs2397142	ELOVL5	C/G	P value 0.409	0.566	0.528	0.913	0.528	0.913
			OR (95% CI) 1.25 (0.73-2.13)	1.19 (0.66-2.13)	0.82 (0.45-1.51)	1.04 (0.54-1.99)	0.82 (0.45-1.51)	1.04 (0.54-1.99)
rs12207094	ELOVL5	A/T	P value 0.773	0.392	0.002	0.719	0.002	0.719
			OR (95% CI) 0.9 (0.44-1.85)	1.44 (0.64-3.25)	3.47 (1.54-7.79)	1.18 (0.49-2.85)	3.47 (1.54-7.79)	1.18 (0.49-2.85)

P value and OR (95% CI) of the additive coded SNP (MM/Mm/mm) for the respective outcome (eczema and wheeze) in a simple regression model. All models were adjusted for sex, maternal social class, maternal education, maternal smoking during pregnancy, breastfeeding and maternal blue fish intake during pregnancy. Results with p<0.05 are marked in bolds (limit of significance with Bonferroni correction p=0.002).

SUPPLEMENTARY DATA**Supplemental Appendix 1. Fatty acids analysis.**

Total fatty acids were analyzed by fast-gas chromatography according to a slight modification of Bondia-Pons *et al.* (1) 100 μ l of sample were saponified by adding 1ml of sodium methylate (0.5% w/v) and heating to 100 $^{\circ}$ C for 15 min. After cooling to 25 $^{\circ}$ C, samples were esterified at 100 $^{\circ}$ C for 15 min using 1ml of boron trifluoride-methanol reagent. Subsequently, fatty acids methyl esters (FAMES) were isolated by adding 500 μ l of *n*-hexane. After shaking for 1 min, 1mL of a saturated sodium chloride solution was added. Finally, the tubes were centrifuged for 8 min at 2200 $\times g$. Anhydrous sodium sulphate was added to eliminate aqueous residues. The *n*-hexane top layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter of 300 μ l.

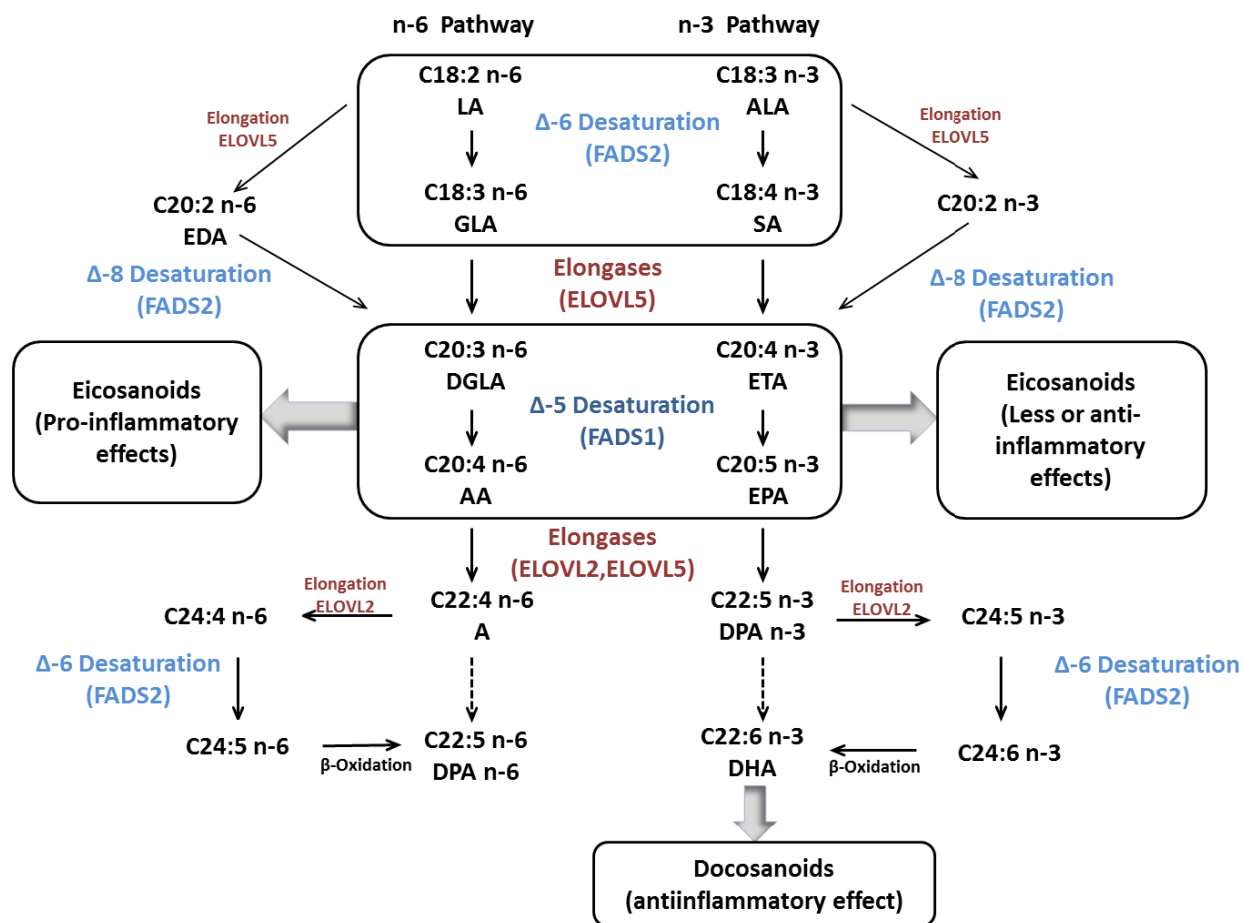
Fast GC analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 Gas Chromatograph equipped with a flame ionization detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation of FAME was carried out on a capillary column (10 m \times 0.10mm i.d. \times 0.10 μ m film thickness) coated with a Varian VF-23ms high cyanopropyl stationary phase (Varian, Palo Alto, CA, USA). Helium was used as the carrier gas and the injector was used in split mode (1:30). The temperature program was as follows: initial temperature 120 $^{\circ}$ C, a first ramp at 35 $^{\circ}$ C/min to 175 $^{\circ}$ C (hold for 1.5 min) and a second ramp at 20 $^{\circ}$ C/min to 250 $^{\circ}$ C. Injector and detector were maintained at 250 and 300 $^{\circ}$ C, respectively. Data acquisition and processing were performed with a Shimadzu-Chemstation software for GC systems.

1. Bondia-Pons I, Castellote AI, López-Sabater MC. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B* 2004; 809: 339-44.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Figure 1. Metabolic pathways of n-6 and n-3 fatty acids.

Dashed arrows indicate pathways absent in humans. Figure is based in Rezhak et al. (1), and Park et al.(2) LA: linoleic acid, GLA: gamma linolenic acid, EDA: eicosadienoic acid, ALA: alpha-linolenic, SA: estearidonic acid , DGLA: dihomo-gamma linolenic acid, ETA: eicosatetraenoic acid, AA: araquidonic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, A: adrenic acid, DPA: docosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid.



1. Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, et al. (2010) Variants of the *FADS1* *FADS2* Gene Cluster, Blood Levels of Polyunsaturated Fatty Acids and Eczema in Children within the First 2 years of Life. PLoS ONE 5:e13261

2. Park WJ, Kothapalli KSD, Lawrence P, Tyburczy C, Brenna JT (2009) An alternate pathway to long-chain polyunsaturated: the *FADS2* gene product $\Delta 8$ -desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *Journal of Lipid Research* 50: 1195-1202.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 1. Characteristics of genotyping process.

SNP	Gene	Position	Location	Chr	Major/Minor allele	Children				Mothers			
						Genotyping success rate (%)	MAF	HWE p-value	Genotyping success rate (%)	MAF	HWE p-value	Genotyping success rate (%)	MAF
rs174537	<i>FADS cluster</i>	61552679	intron 2 <i>C11orf9</i>	11	G/T	97.0	0.291	0.384	94.7	0.304	0.543		
rs968567	<i>FADS cluster</i>	61595563	near 5' <i>FADS2</i>	11	G/A	96.2	0.136	0.445	91.7	0.142	1.000		
rs174570	<i>FADS cluster</i>	61597211	intron 1 <i>FADS2</i>	11	C/T	82.0	0.112	0.363	81.5	0.100	0.672		
rs2072114	<i>FADS cluster</i>	61605214	intron 1 <i>FADS2</i>	11	A/G	97.7	0.120	0.518	94.6	0.113	0.130		
rs174602	<i>FADS cluster</i>	61624413	intron 4 <i>FADS2</i>	11	A/G	95.7	0.235	0.362	92.5	0.250	0.115		
rs526126	<i>FADS cluster</i>	61624884	intron 6 <i>FADS2</i>	11	C/G	63.5	0.206	0.918	79.4	0.178	0.373		
rs174626	<i>FADS cluster</i>	61637056	near 3' <i>FADS2</i>	11	T/C	96.7	0.496	0.591	94.4	0.496	0.392		
rs174627	<i>FADS cluster</i>	61637465	near 3' <i>FADS2</i>	11	C/T	98.0	0.134	0.694	94.4	0.136	0.806		
rs7482316	<i>FADS cluster</i>	61640197	near 3' <i>FADS3</i>	11	A/G	89.3	0.082	1.000	89.6	0.093	0.893		
rs174464	<i>FADS cluster</i>	61657925	intron 1 <i>FADS3</i>	11	C/T	81.2	0.303	0.102	82.5	0.306	0.317		
rs174468	<i>FADS cluster</i>	61663690	near 5' <i>FADS3</i>	11	G/A	97.2	0.390	1.000	93.4	0.398	0.687		

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 1. Cont.

SNP	Gene	Position	Location	Chr	Major/Minor allele	Children			Mothers		
						Genotypin g success rate (%)	MAF	HWE p-value	Genotypin g success rate (%)	MAF	HWE p-value
rs3734397	<i>ELOVL2</i>	10.982.847	3'UTR	6	A/G	97.7	0.255	0.537	94.9	0.268	0.164
rs953413	<i>ELOVL2</i>	11.012.858	intron 1	6	G/A	84.0	0.407	0.149	90.3	0.470	0.831
rs10498676	<i>ELOVL2</i>	11.026.998	intron 1	6	G/A	88.3	0.132	0.445	93.0	0.164	0.668
rs6936315	<i>ELOVL2</i>	11.035.971	intron 1	6	T/C	72.8	0.142	0.348	79.9	0.165	1.000
rs3798719	<i>ELOVL2</i>	11.036.824	intron 1	6	C/T	92.1	0.277	0.104	90.8	0.278	0.414
rs13204015	<i>ELOVL2</i>	11.040.459	intron 1	6	T/C	82.7	0.039	0.234	92.0	0.041	0.495
rs17544159	<i>ELOVL5</i>	53.130.519	near 3'	6	A/C	87.1	0.048	0.525	89.8	0.076	1.000
rs2281274	<i>ELOVL5</i>	53.143.553	intron 3	6	T/C	95.4	0.287	0.253	93.2	0.295	0.109
rs2294859	<i>ELOVL5</i>	53.159.575	intron 2	6	T/C	90.1	0.076	0.379	92.2	0.081	0.545
rs761179	<i>ELOVL5</i>	53.166.835	intron 1	6	T/C	98.5	0.321	0.805	94.9	0.348	0.896
rs9395855	<i>ELOVL5</i>	53.176.764	intron 1	6	T/G	98.2	0.498	0.856	94.0	0.466	0.918
rs11968589	<i>ELOVL5</i>	53.190.233	intron 1	6	C/T	91.1	0.137	0.539	92.3	0.113	0.098
rs2397142	<i>ELOVL5</i>	53.200.298	intron 1	6	C/G	88.6	0.307	0.631	93.9	0.351	0.761
rs12207094	<i>ELOVL5</i>	53.204.174	intron 1	6	A/T	96.2	0.123	0.434	94.0	0.155	0.840

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 2. Associations of the maternal and child variants in the FADS and ELOVL genes with fatty acids ratios and enzymatic activities.

SNP	Mother SNPs						Child SNPs									
	n-3/n-6 ratios			FADS 1			FADS 2			ELOVL5						
	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA
rs174537	P value	0.073	0.812	8.416e-19	2.284e-05	0.007	0.034	0.337	2.829e-21	7.792e-07	1.036e-12					
	Diff.			-0.199	0.026	0.104			-0.226	0.032	0.231					
rs968567	P value	0.109	0.134	1.155e-06	0.0003	0.007	0.093	0.202	2.201e-09	4.556e-05	3.612e-10					
	Diff.			-0.150	0.0289	0.139			-0.197	0.034	0.268					
rs174570	P value	0.119	0.808	1.580e-05	0.393	0.347	0.342	0.783	1.093e-05	0.170	0.001					
	Diff.			-0.162					-0.165		0.150					
rs2072114	P value	0.486	0.402	3.471e-08	0.012	0.150	0.325	0.188	1.021e-07	0.002	1.714e-05					
	Diff.			-0.195	0.024				-0.198	0.029	0.211					
rs174602	P value	0.244	0.720	0.013	0.870	0.662	0.280	0.541	0.0012	0.065	0.001					
	Diff.			-0.059					-0.088	0.012	0.116					
rs526126	P value	0.164	0.178	0.0005	0.977	0.103	0.120	0.124	0.0001	0.205	0.003					
	Diff.			-0.103					-0.134		0.133					
rs174626	P value	0.086	0.122	0.0001	0.403	0.171	0.110	0.437	3.828e-06	0.227	1.157e-05					
	Diff.			0.081					0.110		-0.137					
rs174627	P value	0.890	0.605	0.0006	0.400	0.132	0.781	0.313	7.468e-05	0.090	0.043					
	Diff.			-0.105					-0.138	0.015	0.093					
rs7482316	P value	0.0082	0.015	0.458	0.733	0.120	0.032	0.201	0.094	0.669	0.007					
	Diff.			0.092			0.236		-0.076		0.158					
rs174464	P value	0.625	0.274	2.859e-05	0.026	0.154	0.754	0.402	0.0082	0.373	0.073					
	Diff.			-0.106					-0.069		0.060					
rs174468	P value	0.140	0.904	0.0003	0.041	0.619	0.059	0.695	9.431e-06	0.136	0.0002					
	Diff.			0.080					0.106		-0.115					

P value and difference of the additive coded SNP (MM/Mm/mm) for the respective outcome (PUFA) in a simple regression model.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 2. Cont.

SNP	Mother SNPs										Child SNPs				
	n-3/n-6 ratios					FADS 1 FADS 2 ELOVL5					n-3/n-6 ratios			FADS 1 FADS 2 ELOVL5	
	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA	ln(EPA/AA)	ln(DHA/AA)	AA/DGLA	DGLA/LA	DGLA/GLA
rs3734397	P value	0.834	0.946	0.482	0.354	0.654					0.485	0.522	0.650	0.557	0.464
	Diff.														
rs953413	P value	0.971	0.683	0.408	0.802	0.974					0.509	0.730	0.371	0.269	0.739
	Diff.														
rs10498676	P value	0.585	0.702	0.158	0.875	0.494					0.130	0.652	0.071	0.656	0.279
	Diff.											-0.064			
rs6936315	P value	0.458	0.256	0.016	0.129	0.191					0.291	0.052	0.758	0.863	0.625
	Diff.			0.074											
rs3798719	P value	0.881	0.679	0.595	0.813	0.855					0.623	0.315	0.931	0.412	0.212
	Diff.														
rs13204015	P value	0.483	0.367	0.171	0.635	0.765					0.664	0.653	0.928	0.242	0.417
	Diff.														
rs17544159	P value	0.471	0.694	0.546	0.802	0.034					0.300	0.314	0.834	0.613	0.713
	Diff.					-0.145									
rs2281274	P value	0.244	0.404	0.144	0.8110	0.484					0.354	0.873	0.388	0.776	0.699
	Diff.														
rs2294859	P value	0.888	0.685	0.311	0.720	0.339					0.480	0.087	0.980	0.656	0.638
	Diff.														
rs761179	P value	0.255	0.270	0.993	0.513	0.748					0.727	0.698	0.368	0.409	0.220
	Diff.														
rs9395855	P value	0.949	0.495	0.918	0.417	0.046					0.379	0.710	0.164	0.180	0.026
	Diff.					-0.069									-0.070
rs11968589	P value	0.472	0.182	0.961	0.820	0.748					0.777	0.324	0.554	0.732	0.626
	Diff.														
rs2397142	P value	0.180	0.172	0.889	0.677	0.762					0.947	0.735	0.428	0.456	0.199
	Diff.														
rs12207094	P value	0.192	0.343	0.680	0.640	0.407					0.238	0.093	0.332	0.423	0.518
	Diff.														

P value and difference of the additive coded SNP (MM/Mm/mm) for the respective outcome (PUFA) in a simple regression model.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 3. Association of cord blood fatty acids levels and eczema at age 4 years.

Fatty acid	Unadjusted				Adjusted			
	N cases/controls	OR	95% CI	p value	N cases/controls	OR	95% CI	p value
n-6								
LA ln(18:2)	57/234	0.64	0.11-3.54	0.615	45/178	0.89	0.11-6.87	0.991
GLA ln(18:3)	57/234	0.69	0.27-1.75	0.441	45/178	0.71	0.26-2.00	0.525
Ln (20:2)	57/234	0.57	0.21-1.50	0.257	45/178	0.51	0.17-1.49	0.217
DGLA (20:3)	57/234	1.18	0.073-1.90	0.492	45/178	1.00	0.55-1.81	0.997
AA (20:4)	57/234	0.95	0.81-1.11	0.562	45/178	0.93	0.77-1.12	0.445
A (22:4)	57/234	2.89	0.51-16.25	0.227	45/178	2.77	0.35-21.9	0.334
Ln (22:5)	57/234	0.84	0.38-1.85	0.676	45/178	0.59	0.22-1.56	0.288
n-3								
ALA ln (18:3)	57/234	0.91	0.55-1.48	0.712	45/178	0.96	0.54-1.69	0.887
EPA ln(20:5)	57/234	1.19	0.73-1.95	0.468	45/178	1.24	0.70-2.19	0.459
DPA ln (22:5)	57/234	1.43	0.85-2.41	0.171	45/178	1.70	0.94-3.10	0.079
DHA ln(22:6)	57/234	1.37	0.44-4.22	0.583	45/178	1.81	0.48-6.79	0.379
Ratios								
EPA/AA	57/234	1.20	0.76-1.89	0.431	45/178	1.26	0.74-2.14	0.401
DHA/AA	57/234	1.55	0.52-4.66	0.427	45/178	2.04	0.60-6.92	0.251
AA/DGLA	57/234	0.69	0.23-2.10	0.522	45/178	0.92	0.24-3.51	0.909
DGLA/LA	57/234	3.67	0.05-261.94	0.549	45/178	0.67	0.004-124.95	0.885
DGLA/GLA	57/234	1.54	0.66-3.62	0.312	45/178	1.24	0.48-3.17	0.653
DTA/AA	57/234	1.74	0.78-3.87	0.170	45/178	1.70	0.66-4.35	0.266

Results of the logistic regression models. Adjustment for child's sex, maternal education, maternal smoking in pregnancy and duration of predominant breastfeeding.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 4. Association of cord blood fatty acids levels and wheezing at age 4 years.

Fatty acid	Unadjusted					Adjusted				
	N cases/controls	OR	95% CI	P value	N cases/controls	OR	95% CI	P value		
n-6										
LA ln(18:2)	53/235	1.81	0.35-9.50	0.478	40/181	3.48	0.38-31.50	0.266		
GLA ln(18:3)	53/235	2.06	0.93-4.56	0.075	40/181	1.85	0.75-4.56	0.180		
Ln (20:2)	53/235	1.85	0.67-5.09	0.236	40/181	2.28	0.72-7.24	0.163		
DGLA (20:3)	53/235	1.21	0.74-1.97	0.444	40/181	1.27	0.67-2.39	0.464		
AA (20:4)	53/235	1.05	0.89-1.23	0.567	40/181	1.04	0.86-1.26	0.697		
A (22:4)	53/235	2.57	0.43-15.2	0.297	40/181	3.05	0.33-28.6	0.327		
Ln (22:5)	53/235	0.92	0.41-2.09	0.846	40/181	0.81	0.29-2.24	0.690		
n-3										
ALA ln (18:3)	53/235	1.02	0.62-1.67	0.940	40/181	0.99	0.55-1.79	0.981		
EPA ln(20:5)	53/235	1.03	0.62-1.70	0.915	40/181	1.06	0.58-1.91	0.852		
DPA ln (22:5)	53/235	1.05	0.62-1.79	0.847	40/181	1.05	0.56-1.96	0.870		
DHA ln(22:6)	53/235	1.10	0.35-3.48	0.873	40/181	1.07	0.26-4.46	0.922		
Ratios										
EPA/AA	53/235	0.98	0.61-1.58	0.946	40/181	1.02	0.58-1.77	0.950		
DHA/AA	53/235	0.87	0.28-2.72	0.806	40/181	0.88	0.23-3.36	0.857		
AA/DGLA	53/235	0.86	0.28-2.66	0.793	40/181	0.84	0.20-3.53	0.815		
DGLA/LA	53/235	0.78	0.009-65.4	0.912	40/181	0.58	0.002-157.2	0.848		
DGLA/GLA	53/235	0.60	0.28-1.28	0.187	40/181	0.62	0.26-1.49	0.286		
DTA/AA	53/235	1.32	0.61-2.87	0.482	40/181	1.34	0.52-3.42	0.545		

Results of the logistic regression models. Adjustment for child's sex, maternal education, maternal eczema, maternal smoking in pregnancy and duration of predominant breastfeeding.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 5. Associations of the maternal or child variants rs174626 and rs7482316 with child outcomes at 4 years controlling for maternal/child variants.

		Mother SNP ¹		Child SNP ²	
rs174626 vs. Eczema 4y	OR (95% CI)	0.23	(0.05-1.13)	0.48	(0.14-1.68)
	P value		0.039		0.232
rs7482316 vs. Wheeze 4y	OR (95% CI)	0.25	(0.06-1.09)	0.36	(0.11-1.22)
	P value		0.028		0.076

P value and OR (95% CI) of the additive coded SNP (MM/Mm/mm) for the respective outcome (eczema and wheeze) in a simple regression model. All models were adjusted for sex, maternal social class, maternal education, maternal smoking during pregnancy, breastfeeding and maternal blue fish intake during pregnancy. Results with $p < 0.05$ are marked in bolds. ¹ Controlling for child genotype. ² Controlling for maternal genotype.

Publicación 5

Gene expression of Desaturase (FADS1 and FADS2) and Elongase (ELOVL5) enzymes in peripheral blood: Association with polyunsaturated fatty acid levels and atopic eczema in 4-year-old children

.....

Expresión génica de los genes de desaturasas (FADS1 y FADS2) y elongasas (ELOVL5) en sangre periférica: asociación con los niveles de ácidos grasos poliinsaturados y eczema atópico en niños de 4 años de edad

Autores: Aida Maribel Chisaguano, Rosa Montes, Teresa Pérez-Berezo, Ana Isabel Castellote, Marcela Guerendiain, Mariona Bustamante, Eva Morales, Raquel García-Esteban, Jordi Sunyer, Àngels Franch, M. Carmen López-Sabater.

Revista: PLOS ONE

Año: 2013

Volumen: 8

Páginas: e78245

.....

RESUMEN:

Antecedentes y Objetivos: En el plasma o suero de niños atópicos se han detectado altos niveles de LA y bajos niveles de GLA, DGLA e incluso AA en comparación con los no atópicos. Se ha sugerido que un defecto a nivel genético en las enzimas implicadas en la síntesis de AGPI-CL podría estar relacionado con las menores concentraciones de los metabolitos del LA; sin embargo, hasta el momento se desconoce si los cambios en la expresión de los genes *FADS* y *ELOVL* están asociados con las alteraciones en el metabolismo de los AG de la serie n-6 que padecen los niños atópicos. El objetivo de este estudio fue analizar si los cambios de expresión de los genes *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5* se asocian con los niveles plasmáticos de AG y con el riesgo de eczema atópico en niños de 4 años de edad.

Metodología: Se seleccionó una submuestra de niños que cumplieron 4 años de edad de la Cohorte de INMA-Sabadell, 20 niños diagnosticados con eczema atópico y 104 niños no atópicos fueron incluidos en este estudio. Se determinó la composición de AGPI n-3 y n-6 de los fosfolípidos del plasma de los niños. La expresión génica (ARN mensajero) se analizó con la técnica RT-PCR utilizando tarjetas microfluídicas con tecnología Taqman. Las asociaciones entre los niveles de expresión génica y los niveles de AGPI y actividad enzimática (medida por los ratios producto:sustrato) se determinaron mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson. Modelos de regresión logística, ajustados por los factores de confusión más influyentes, se aplicaron para analizar las asociaciones entre niveles de expresión génica y riesgo de eczema atópico.

Resultados: Los niveles de expresión génica del gen que codifica a la D6D (*FADS2*) están fuertemente asociados con los niveles de DGLA y la actividad enzimática de D6D. Los niños atópicos tienen bajos niveles de expresión de *FADS2* y *ELOVL5*. No se detectaron diferencias en el gen que codifica a la enzima D5D (*FADS1*).

Conclusión: Los resultados de este estudio sugieren que bajos niveles de expresión de *FADS2* y *ELOVL5* podrían estar asociados con un mayor riesgo de padecer eczema atópico en los primeros 4 años de vida.

Gene Expression of Desaturase (*FADS1* and *FADS2*) and Elongase (*ELOVL5*) Enzymes in Peripheral Blood: Association with Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Atopic Eczema in 4-Year-Old Children

Aida Maribel Chisaguano^{1,2}, Rosa Montes^{1,2}, Teresa Pérez-Berezo³, Ana Isabel Castellote^{1,2}, Marcela Guerendiain¹, Mariona Bustamante^{4,5,6,8}, Eva Morales^{4,5,6}, Raquel García-Esteban^{4,5,6}, Jordi Sunyer^{4,5,6,7}, Àngels Franch³, M. Carmen López-Sabater^{1,2*}

1 Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Government, Madrid, Spain, **3** Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Center for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain, **5** Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain, **6** CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Government, Madrid, Spain, **7** Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain, **8** Center for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

Abstract

Background: It is unknown if changes in the gene expression of the desaturase and elongase enzymes are associated with abnormal n-6 long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) levels in children with atopic eczema (AE). We analyzed whether mRNA-expression of genes encoding key enzymes of LC-PUFA synthesis (*FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5*) is associated with circulating LC-PUFA levels and risk of AE in 4-year-old children.

Methods: AE (n=20) and non-AE (n=104) children participating in the Sabadell cohort within the Infancia y Medio Ambiente (INMA) Project were included in the present study. RT-PCR with TaqMan Low-Density Array cards was used to measure the mRNA-expression of *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5*. LC-PUFA levels were measured by fast gas chromatography in plasma phospholipids. The relationship of gene expression with LC-PUFA levels and enzyme activities was evaluated by Pearson's rank correlation coefficient, and logistic regression models were used to study its association with risk of developing AE.

Results: Children with AE had lower levels of several n-6 PUFA members, dihomo- γ -linolenic (DGLA) and arachidonic (AA) acids. mRNA-expression levels of *FADS1* and 2 strongly correlated with DGLA levels and with D6D activity. *FADS2* and *ELOVL5* mRNA-expression levels were significantly lower in AE than in non-AE children (-40.30% and -20.36%; respectively), but no differences were found for *FADS1*.

Conclusions and Significance: Changes in the mRNA-expression levels of *FADS1* and 2 directly affect blood DGLA levels and D6D activity. This study suggests that lower mRNA-expressions of *FADS2* and *ELOVL5* are associated with higher risk of atopic eczema in young children.

Citation: Chisaguano AM, Montes R, Pérez-Berezo T, Castellote AI, Guerendiain M, et al. (2013) Gene Expression of Desaturase (*FADS1* and *FADS2*) and Elongase (*ELOVL5*) Enzymes in Peripheral Blood: Association with Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Atopic Eczema in 4-Year-Old Children. PLoS ONE 8(10): e78245. doi:10.1371/journal.pone.0078245

Editor: Alberico Catapano, University of Milan, Italy

Received: April 29, 2013; **Accepted:** September 10, 2013; **Published:** October 22, 2013

Copyright: © 2013 Chisaguano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The following sources of funding supported the work: The Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support given to the research project AGL2009-09730/ALI. www.micinn.es. The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the financial support given to the research project BUF2012-40254-C03-02. www.mineco.gob.es. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mclopez@ub.edu

Introduction

Atopic eczema (AE) is a multifactorial skin disease occurring most frequently in early childhood. It is caused by a complex interplay between immunological, genetics, biochemical,

psychological and environmental factors. AE currently affects 15 to 30% of children and 1 to 3% of adults in industrialized countries, with 85% of cases beginning before the age of five [1,2].

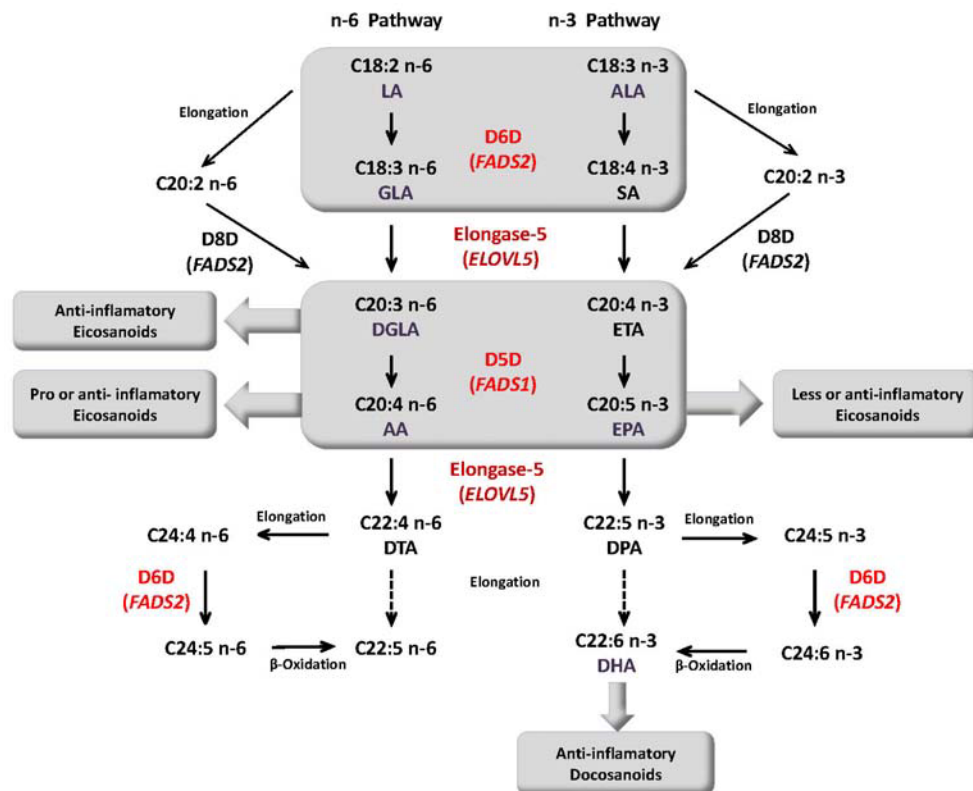


Figure 1. n-6 and n-3 pathways of long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis from essential fatty acids (EFAs). Modified from [10,14,33]. LA, linoleic acid; GLA, γ -linolenic acid; DGLA, dihomo- γ -linolenic acid; AA, arachidonic acid; DTA, docosatetraenoic acid ALA, α -Linolenic acid; SA stearidonic acid; ETA eicosatetraenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid. D5D (Δ 5-desaturase), D6D (Δ 6-desaturase) and Elongase-5 enzymes are encoded by *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5*, respectively.

doi: 10.1371/journal.pone.0078245.g001

Many studies suggest that AE is associated with impairment in the metabolism of n-6 essential fatty acids (EFAs) and long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs). Deficits in n-6 EFAs are related to the severity of AE through changes in skin barrier function and cutaneous inflammation [3-6]. Higher levels of linoleic acid (LA, C18:2 n-6) and significantly lower levels of γ -linolenic (GLA, C18:3 n-6), dihomo- γ -linolenic (DGLA, C20:3 n-6) and arachidonic (AA, C20:4 n-6) acids have been noted in the plasma or serum of AE children compared to healthy control [3,4,7,8]. The synthesis of LC-PUFAs from LA involves enzyme-mediated desaturation and elongation steps. Δ 6-desaturase (D6D, encoded by the *FADS2* gene) catalyzes the conversion of LA into GLA, which is then elongated into DGLA by elongase-5 (encoded by the *ELOVL5* gene). Moreover, DGLA can be converted into AA by Δ 5-desaturase (D5D, encoded by the *FADS1* gene) (summarized in Figure 1) [9-13].

According to findings of different studies, defects in the activity of enzymes involved in LC-PUFAs biosynthesis could be related to lower concentrations of LA metabolites [7,14]. Recent studies report an association between genetic variants (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) of the *FADS1* and *FADS2* gene cluster and LC-PUFA levels in serum, plasma

phospholipids and erythrocyte membranes. Subjects carrying the minor alleles have higher LA and DGLA levels, and lower AA concentrations [10,15-17]. Furthermore, a link between *FADS* SNPs and atopic outcomes in children, such as AE and asthma, has been investigated with controversial results. Rzehak et al. [14], using two population-based birth cohorts, found that PUFA composition in young children's blood was strongly controlled by the *FADS* gene cluster. These authors reported that SNPs were significantly associated with eczema in the LISA, but not the KOALA cohort. On the other hand, Standl et al. [11] and Sigman et al. [18] concluded that there was no association between *FADS* polymorphisms and atopic diseases in children.

To date, it is unclear whether changes in the expression of *FADS1* and *FADS2*, and consequently, LC-PUFA levels in children and adults determine risk of atopic diseases in humans. To our knowledge, only one study developed by Saaf et al. [19] reports a reduced gene expression of *FADS1* (D5D) and *FADS2* (D6D) in the AE skin of adults. Their results support the hypothesis that low LC-PUFA levels are due to impaired desaturase activity and thus, impaired synthesis of these fatty acids [7]. As far as we know, there are no scientific

studies focusing on the mRNA-expression of these genes in children.

Combining measurements of gene expression, enzyme activity and polyunsaturated fatty acid levels is essential in explaining the differences in blood lipid levels of children who develop atopic diseases. Thus, the aim of this study was to investigate whether mRNA-expression of genes encoding key enzymes of LC-PUFA synthesis (*FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5*) is associated with circulating LC-PUFA levels and risk of AE in 4-year-old children.

Methods

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all participant parents and the study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Municipal Institute of Health Care (CEIC-IMAS) and the Hospital of Sabadell, Spain.

Study population and design

Data for this report come from a population-based pregnancy cohort set up in Sabadell, Spain as part of the INMA Project [Cohort Profile: The INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project] [20]. A detailed description of the Sabadell cohort has been provided elsewhere [21,22]. A total of 657 children were enrolled between 2004 and 2006. At 4 years of age a subset of 124 children were included in the present study.

During pregnancy and the first 4 years postpartum, information on maternal education, gender, breastfeeding and atopic outcomes was collected through questionnaires administered to the mothers at various time points (12 and 32 weeks of gestation, as well as follow-up at 6 and 14 months and 4 years postpartum).

Definition of eczema

Information about AE was obtained from the parents through two questionnaires completed when the child was 14 months [22] and 4 years old. Three questions were addressed to the parents: at 14 months old, "has your child ever experienced atopic eczema since birth to 14 months?" and at 4 years, "has the child ever experienced atopic eczema in the last 12 months?" and "has the child taken any medication for atopic eczema in the last 12 months?" AE was defined as recurrent atopic eczema (reported symptoms during the first year of life and at 4 years old) and having medication for eczema at age 4 (n=20). Non-AE had no personal history of AE (n=104).

RNA isolation and cDNA synthesis

Venous peripheral blood samples obtained from 4-year-old children were collected in PAXgene (TM) Blood RNA tubes (BD company, Germany) to ensure RNA preservation and stored at -20 and then at -80°C before RNA extraction. Total RNA was isolated from whole blood using the PAXgene Blood RNA Kit following the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was determined using a spectrophotometer (Nanodrop) and quality (percentage of

miRNAs and RIN) was determined by the Bioanalyzer system (Agilent, USA). 700 ng of total RNA was reverse-transcribed in the thermal cycler PTC-100 into cDNA using the SuperScript cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, USA). The reaction mixture was incubated at 25°C for 10 min and then at 42°C for 60 min. Finally, the mixture was heated at 85°C for 5 min. cDNA samples were stored at -80°C prior to analysis.

PCR using TaqMan low-density array cards (TLDA)

To identify altered gene expression in peripheral blood, we used PCR with TaqMan Low-Density Array (TLDA) microfluidic cards (Applied Biosystems, USA). Each port was preloaded with specific user-defined TaqMan primers and probes. This technology has been shown to be sensitive and reproducible for assessing gene expression [23,24]. Although the TLDA cards were redesigned to measure 24 genes, we only used it for the genes related to the elongation and desaturation of LC-PUFAs. Thus, each card contained the target genes *ELOVL5* [Hs 01094704_m1, inventoried], *FADS1* [Hs 00203685_m1, inventoried] and *FADS2* [Hs 00188654_m1, inventoried]. Additionally, each card contained five endogenous control genes, *PPIB* [Hs 00168719_m1, inventoried], *FPGS* [Hs 00191956_m1, inventoried], *TRAP1* [Hs00212474_m1, inventoried], *GAPDH* [Hs99999905_m1 inventoried] and $\beta 2M$ [Hs99999907_m1, inventoried]. The full RT-PCR data set is available at The NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) Database (GEO accession: GSE48310).

A total of 100 μ L of reaction mixture, with 16 μ L of cDNA (560 ng), 34 μ L of H₂O and 50 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), was added to each TLDA port after vortexing. The card was centrifuged for 1 min x 2 at 1900 rpm to distribute the samples from the loading port to each well. The TLDA was sealed with a TaqMan low-density array sealer (Applied Biosystems, USA) and the PCR amplification was performed using an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, USA). The thermal cycler conditions were as follows: 2 min at 50°C, then 10 min at 94.5°C, followed by 40 cycles for 30 s at 97°C and 1 min at 59.7°C. Each sample was measured in duplicate in the same TLDA card. The SDS software (version 2.4) was used to analyze the expression data.

The amount of target mRNA relative to the endogenous control expression and relative to values from the reference group was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described [25]. mRNA-expression levels were normalized using the expression of peptidylpropyl isomerase B (*PPIB*) as the endogenous housekeeping gene, since this gene presented the highest stability in all the samples. Results were expressed as the mean of the percentage of these values for the experimental group (AE children) compared to the reference group (non-AE children), which represented 100% gene expression.

Plasma phospholipid fatty acid analysis

The fatty acid composition of plasma phospholipids was determined according to the method described by Chisaguano et al. [26]. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared

with sodium methylate in 0.5M methanol and boron trifluoride methanol solution (14% v/v). They were then separated and quantified by fast gas chromatography with flame ionization detection (FID). FAMES were identified by comparing the peak retention times of the FAME samples with those of the standard FAME mix solutions. Data acquisition and processing were performed with the Shimadzu-Chemstation software for GC systems. The relative amount of each fatty acid quantified was expressed as the percentage of the total amount of fatty acids (% total fatty acids).

Enzyme activities were calculated using relevant fatty acid product:precursor ratios, as previously described [16,21,27]. Thus, the ratios C20:4 n-6/C20:3 n-6 (AA:DGLA) for D5D, C20:3 n-6/C18:2 n-6 (DGLA:LA) for D6D; C20:3 n-6/C18:3 n-6 (DGLA:GLA) and C22:4 n-6/C20:4 n-6 (DTA:AA) for Elongase-5 were used.

Statistical analysis

Means and standard deviations (SDs) were used to describe continuous variables. The Kolmogorov-Smirnov test was used to study the normal distribution of data and non-normally distributed data were naturally log-transformed. The differences in gene expression between the groups were evaluated by unpaired Student t-test. Correlations between fatty acids, enzyme activities and mRNA-expression levels were determined by Pearson's rank correlation coefficient, while logistic regression was applied to evaluate the association between mRNA levels and AE. The confounding variables were selected based on previous literature data and were gender, maternal education and breastfeeding [14,21]. All statistical analyses were performed on SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Results

Population characteristics, PUFA levels and enzyme activity

The basic population characteristics, n-6 and n-3 LC-PUFA levels of plasma phospholipids, as well as enzyme activities (determined as fatty acid ratios) are summarized in Table 1. No statistical differences were found between AE and non-AE children for sex, predominant breastfeeding and maternal education ($p > 0.05$).

AE children tended to have higher LA levels, but this was not statistically significant ($p = 0.282$). Moreover, DGLA and AA levels were significantly lower in AE children than in controls ($p = 0.014$ and $p = 0.046$, respectively) (Table 1). We observed no significant differences in the levels of n-3 LC-PUFAs (EPA, DPA and DHA) between the two groups.

There were no significant differences in D5D activity (AA:DGLA, $p = 0.962$) between AE children and control. However, AE children displayed lower D6D activity (DGLA:LA, $p = 0.002$) than controls. On the other hand, there were significant differences in elongase-5 activity (DTA:AA, $p = 0.049$) between the two groups.

Table 1. Characteristics of the Sabadell cohort subsample composed of 4-year-old children.

Characteristics	Atopic eczema		p*
	Control (n=104)	(n=20)	
Gender [% male]	49	60	0.369 ^a
Predominant breastfeeding for at least 2 weeks [%]	77.7	70	0.460 ^a
Maternal education [†] [%]	77.7	66.7	0.313 ^a
[†] Fatty acids (mean % of total FA) [†]			
Linoleic (LA, C18:2 n-6)	25.21 ± 2.26	25.84 ± 2.30	0.282 ^b
γ-Linolenic (GLA, C18:3 n-6)	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.06	0.545 ^b
Dihomo-γ-Linolenic (DGLA, C20:3 n-6)	2.72 ± 0.66	2.40 ± 0.42	0.014 ^b
Arachidonic (AA, C20:4 n-6)	9.48 ± 2.45	8.46 ± 1.77	0.046 ^b
Adrenic (DTA, C22:4 n-6)	0.38 ± 0.10	0.38 ± 0.11	0.920 ^b
α-Linolenic (ALA, C18:3 n-3) [‡]	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.423 ^b
Eicosapentaenoic (EPA, C20:5 n-3) [‡]	0.31 ± 0.16	0.30 ± 0.39	0.723 ^b
Docosapentaenoic n-3 (DPA, C22:5 n-3)	0.48 ± 0.13	0.46 ± 0.19	0.680 ^b
Docosahexanoic (DHA, C22:6 n-3)	2.35 ± 0.90	2.29 ± 1.03	0.811 ^b
[†] Enzyme activities (fatty acid ratios)			
Elongase 5 (ELOVL5)			
DGLA:GLA	36.26 ± 17.10	34.14 ± 16.23	0.628 ^b
DTA:AA ^b	4.09 ± 0.76	4.49 ± 0.79	0.049 ^b
D5D activity (FADS1)			
AA:DGLA	3.57 ± 0.91	3.58 ± 0.82	0.962 ^b
D6D activity (FADS2)			
DGLA:LA ^b	10.96 ± 3.13	9.35 ± 1.61	0.002 ^b

[†] Secondary and university. [†] Fatty acids and enzyme activities (control, n= 94; atopic eczema, n=18). [†] Mean±SD. [‡] Natural log- transformation. ^b Fatty acid ratios x 100. ^a Significance for Pearson's chi-squared test. ^b Significance for Student t- test.* $p < 0.05$.

doi: 10.1371/journal.pone.0078245.t001

Relationship between gene expression and fatty acid levels

There was a positive relationship between the mRNA-expression levels of *FADS1* and *FADS2* ($r = 0.527$, $p = 4.37E-10$), suggesting that both genes are coexpressed. *FADS2* and *FADS1* expression positively correlated with DGLA and GLA levels and with the DGLA:LA ratio.

In contrast, no correlation was found between *ELOVL5* (gene not located in the *FADS* cluster) and *FADS1* or *FADS2* mRNA-expressions. In addition, there was no observed correlation between *ELOVL5* gene expression and LC-PUFA levels or enzyme activities (Table 2).

Association between activity/mRNA-expression of enzymes and atopic eczema

Reduced mRNA-expression of the *ELOVL5* (-20.36%, $p = 0.005$) and *FADS2* (-40.30%, $p = 0.013$) genes was observed in the peripheral blood of AE children relative to controls. *FADS1* mRNA-expression was detected in AE children, but its

Table 2. Relationship between the mRNA-expression level of each enzyme and enzyme activity in the peripheral blood of children.

	Peripheral whole blood mRNA expression		
	<i>FADS1</i>	<i>FADS2</i> [‡]	<i>ELOVL5</i>
<i>FADS1</i>		0.527	**
<i>ELOVL5</i>	0.160	0.078	
GLA	0.194 *	0.179	- 0.003
DGLA	0.255 **	0.332 **	0.031
AA	- 0.073	- 0.172	0.027
Enzyme activity			
Δ 5-desaturase (<i>FADS1</i>)			
AA:DGLA	- 0.342 **	- 0.480 **	- 0.082
Δ 6-desaturase (<i>FADS2</i>)			
DGLA:LA	0.218 *	0.328 **	0.014
Elongase-5 (<i>ELOVL5</i>)			
DGLA:GLA	-0.081	0.030	0.014
DTA:AA	- 0.038	0.170	0.088

[‡] Natural log- transformation. Associations are presented as Pearson's rank correlation coefficients. *p<0.05. ** p<0.01.

doi: 10.1371/journal.pone.0078245.t002

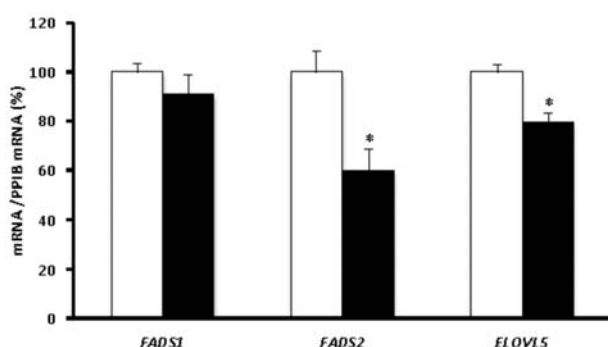


Figure 2. Fatty acid desaturase and elongase mRNA-expression (mRNA/PPIB mRNA) in peripheral blood. Expression levels were normalized using the expression of *PPIB* as the endogenous housekeeping gene. Black bars correspond to the AE children (n=20), and white bars correspond to the non-AE children (n=104). *FADS1* encodes Δ 5-desaturase (-9.40%, D5D), *FADS2* Δ 6-desaturase (-40.30%, D6D) and *ELOVL5* elongase-5 (-20.36%). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of the percentage of gene expression in AE children compared to the reference group, which showed 100% expression. *p<0.05.

doi: 10.1371/journal.pone.0078245.g002

level was not significantly different from that of control (-9.40%, p=0.308) (Figure 2).

Table 3 gives the results of the regression logistic models. There was no significant association between D5D activity (AA:DGLA) [OR=1.11, IC-95 (0.60-2.05), p=0.750] and atopic eczema. D6D activity (DGLA:LA) showed a marginal association with atopic eczema [OR=0.82, IC-95 (0.66-1.00),

p=0.057]. On the other hand, elongase-5 activity determined by DTA:AA ratio showed significant association with atopic eczema [OR=2.32, IC-95 (1.09-4.92), p=0.029].

There was a significant association between *FADS2* [OR=0.20, IC-95 (0.05-0.74), p=0.017] or *ELOVL5* [OR=0.97, IC-95 (0.95-0.99), p=0.016] mRNA-expression and the prevalence of AE in young children. Furthermore, a positive, but not significant, trend was found for *FADS1* [OR=0.99, IC-95 (0.97-1.00), p=0.089].

Discussion

This is the first study to explore the gene expression of enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis in whole peripheral blood, its relationship with enzyme activities and association with AE in 4-year-old children. We studied a subsample of children who developed AE in their first year of life (16.1% of total samples analyzed n=124).

First, differences in LC-PUFA levels between AE and non-AE children were examined. It is known that the skin is the target organ in patients with atopic eczema; however, previous studies suggested that the GLA, DGLA and AA present in epidermal phospholipids are biosynthesized endogenously elsewhere and transported by the bloodstream to the epidermis, where phospholipid etherification takes place. Consequently, serum or plasma phospholipid levels of n-6 PUFAs may reflect their epidermal concentrations [4,28]. Our results confirmed that children with AE had lower DGLA levels in their blood than controls. DGLA is a direct precursor of the series-1 prostaglandins, such as PGE1. This prostaglandin has potent anti-inflammatory effects and is important for maintaining healthy skin by regulating water loss and protecting the skin from injury and infection [29-33]. Accordingly, we found that GLA was not effectively converted into DGLA in AE children, therefore indicating a reduction in the amounts and beneficial effects by action of PGE1. Furthermore, levels of AA, which is a direct precursor of anti- and pro-inflammatory mediators, were lower in AE children [3,34-36]. Our results suggest that an alteration in the endogenous biosynthesis of DGLA and AA leads to their decreased plasma levels. Regarding blood n-3 LC-PUFA levels, no changes were observed in the levels of ALA, EPA and DHA in AE children compared to controls. The differences in the associations of n-3 and n-6 LC-PUFAs with AE might be due to the fact that the former are more dependent on nutritional influences while the latter rely more on endogenous biosynthesis. These results are consistent with those reported by other authors in previous publications [37,38].

It has been hypothesized that the lower levels of n-6 LC-PUFAs in the serum, plasma or tissues of AE patients are related to defects in the D6D enzyme (encoded by *FADS2*) [3,7,39]. In this study, we observed decreased *FADS2* expression in AE children, in accordance with the results of Saaf et al. [19], who undertook genome-wide expression profiling in AE. Those authors analyzed the most important genes in lipid metabolism in the skin of adult AE patients (aged between 21 and 43 years), and found reduced *FADS1* and 2 expressions in AE patients relative to controls. In contrast to

Table 3. Association between enzyme activities, mRNA expression of each enzyme and atopic eczema.

	N (AE/control)	OR unadjusted	95%-CI	p-value	N (AE/control)	OR adjusted ¹	95%-CI	p-value
Enzyme activities								
D5D (AA/DGLA)	18/94	1.01	0.58 - 1.79	0.962	16/92	1.11	0.60 - 2.05	0.750
D6D(DGLA/LA)	18/94	0.82	0.67 - 0.99	0.041	16/92	0.82	0.66 - 1.00	0.057
ELOVL5 (DGLA/GLA)	18/93	0.63	0.20 - 2.04	0.444	16/91	0.98	0.26 - 3.64	0.970
ELOVL5 (DTA/AA)	18/94	1.90	0.99 - 3.64	0.054	16/92	2.32	1.09 - 4.92	0.029
mRNA expression								
<i>FADS1</i> (D5D)	20/104	0.99	0.98 - 1.01	0.306	18/99	0.99	0.97 - 1.00	0.089
<i>FADS2</i> (D6D)	19/103	0.42	0.17 - 1.04	0.061	17/98	0.20	0.05 - 0.74	0.017
<i>ELOVL5</i> (Elongase-5)	20/104	0.97	0.97 - 0.99	0.006	18/99	0.97	0.95 - 0.99	0.016

Odd ratios (OR) of measured mRNA expression and enzyme activities on eczema atopic are estimated by logistic regression. ¹Adjusted for maternal education, sex and predominant breastfeeding (> 2 weeks).

doi: 10.1371/journal.pone.0078245.t003

that study, we observed no significant differences in the expression levels of the *FADS1* gene; however, the results had a similar direction with Saaf (lower *FADS1* in AE). Taken together, these findings suggest that the activity of local desaturases is predominantly localized in the skin of patients with severe AE, as seen with the activity of some markers of chronic inflammation and Th1 response, which are presented predominantly in the skin but not in the blood of AE patients [40]. Regarding elongase-5 expression, AE children had lower *ELOVL5* mRNA levels in their blood than their healthy counterparts. Therefore, these results could explain why AE children have lower levels of DGLA and AA, since D6D and elongase-5 directly participate in the biosynthesis of these fatty acids.

Assessing the relationship between gene expression and fatty acid levels, we found that DGLA levels and D6D activity (DGLA:LA ratio) were directly associated with *FADS1* and *FADS2* gene expression. However, we did not find any relationship between activity (estimated by DTA:AA ratio) and mRNA-expression of elongase-5. This might be explained by the participation of other enzymes in the elongation of AA into DTA. Indeed, recent studies in several transgenic mouse models and cell cultures suggest that elongase-2 (encoded by *ELOVL2*) also participate in the elongation of AA [41]. Accordingly, in our study, AE and non-AE children displayed similar plasma levels of DTA, but different AA levels. We also measured elongase-5 activity using the DGLA:GLA ratio; however, there was no link between mRNA-expression and enzyme activity. In summary, the fatty acid ratios can be used to estimate D5D and D6D activities, but not that of elongase-5 in peripheral blood.

Our results suggested that decreased *FADS2* and *ELOVL5* mRNA-expression in the blood could contribute to the development of AE in the first 4 years of life. Lower DGLA:LA ratios were associated with AE in an unadjusted multiple logistic regression model. When the regression was adjusted for the confounders (maternal education, predominant breastfeeding and sex), this relationship became non-significant as these confounders also modulated plasma fatty acids levels, as already demonstrated in previous studies [14,22]. Collectively, these data support the conclusion that the

n-6 LC-PUFA deficits observed in 4-year-old AE children could be due to the reduced expression of the genes encoding $\Delta 6$ -desaturase and elongase-5.

The main limitation of this study was the sample size because we analyzed only a subsample of the Sabadell cohort (in total, 657 neonates were recruited at birth between 2004 and 2006). However, for this study we selected only severe cases of AE. Thus, we consider the size of the subsample enough, since the cases of children affected with this skin disorder represented the 16.1 % of the total cases studied. Moreover, complementary studies regarding the impact of different genetic variants (*FADS* and *ELOVL* SNPs genotypes) on gene expression would be of great interest. Therefore, the results from our study need to be interpreted with caution and further replications in other cohorts are required to support our conclusions.

Conclusion

This is the first study to confirm that *FADS2* and *ELOVL5* mRNA-expression is significantly lower in the peripheral blood of young children with atopic eczema. These changes in gene expression may explain the low concentration of n-6 LC-PUFAs in children who develop this skin disorder in their early childhood.

Acknowledgements

We are grateful to Silvia Fochs, Anna Sánchez, Maribel López and Nuria Pey for their assistance in contacting the families and administering the questionnaires. Moreover, we thank the participants for their generous collaboration.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JS MCLS. Performed the experiments: AMC RM TP MG AIC EM MB. Analyzed the data: AMC TP RM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AIC AF MCLS JS. Wrote the manuscript: AMC. Provided additional expertise: TP RG.

Critical revision of the manuscript: AMC RM TP AIC MG MB EM RG JS AF MCLS. Obtained funding: JS MCLS.

References

- Bieber T (2008) Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 358: 1483-1494. doi: 10.1056/NEJMra074081. PubMed: 18385500.
- Williams HC (2005) Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 352: 2314-2324. doi:10.1056/NEJMcp042803. PubMed: 15930422.
- Sala-Vila A, Miles EA, Calder PC (2008) Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clin Exp Allergy* 38: 1432-1450. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03072.x. PubMed: 18665842.
- Yen C-H, Dai Y-S, Yang Y-H, Wang L-C, Lee J-H et al. (2008) Linoleic acid metabolite levels and transepidermal water loss in children with atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 100: 66-73. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60407-3. PubMed: 18254485.
- Dunder T, Kuikka L, Turtinen J, Räsänen L, Uhari M (2001) Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy* 56: 425-428. doi: 10.1034/j.1398-9995.2001.056005425.x. PubMed: 11350306.
- Focke M, Sesztak-Greinecker G, Brannath W, Götz M, Jarisch R et al. (2005) Plasma levels of polyunsaturated fatty acids in children with atopic dermatitis and in atopic and nonatopic controls. *Wien Klin Wochenschr* 117: 485-491. doi:10.1007/s00508-005-0394-z. PubMed: 16091876.
- Calder PC (2006) Abnormal fatty acid profiles occur in atopic dermatitis but what do they mean? *Clin Exp Allergy* 36: 138-141. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02433.x. PubMed: 16433850.
- Laitinen K, Sallinen J, Linderborg K, Isolauri E (2006) Serum, cheek cell and breast milk fatty acid compositions in infants with atopic and non-atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 36: 166-173. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02417.x. PubMed: 16433853.
- Glaser C, Lattka E, Rzehak P, Steer C, Koletzko B (2011) Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr* 7: 27-40. doi:10.1111/j.1740-8709.2010.00274.x. PubMed: 21366865.
- Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J (2010) Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 21: 64-69. doi:10.1097/MOL.0b013e3283327ca8. PubMed: 19809313.
- Standl M, Sausenthaler S, Lattka E, Koletzko S, Bauer CP et al. (2011) FADS gene variants modulate the effect of dietary fatty acid intake on allergic diseases in children. *Clin Exp Allergy* 41: 1757-1766. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03833.x. PubMed: 21793953.
- Jacobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 45: 237-249. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004. PubMed: 16564093.
- Merino DM, Ma DW, Mutch DM (2010) Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease. *Lipids Health Dis* 9: 63. doi:10.1186/1476-511X-9-63. PubMed: 20565855.
- Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C et al. (2010) Variants of the FADS1 FADS2 Gene Cluster, Blood Levels of Polyunsaturated Fatty Acids and Eczema in Children within the First 2 Years of Life. *PLOS ONE* 5: e13261. doi:10.1371/journal.pone.0013261. PubMed: 20948998.
- Xie L, Innis SM (2008) Genetic Variants of the FADS1 FADS2 Gene Cluster Are Associated with Altered (n-6) and (n-3) Essential Fatty Acids in Plasma and Erythrocyte Phospholipids in Women during Pregnancy and in Breast Milk during Lactation. *J Nutr* 138: 2222-2228. doi:10.3945/jn.108.096156. PubMed: 18936223.
- Bokor S, Dumont J, Spinneker A, Gonzalez-Gross M, Nova E et al. (2010) Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res* 51: 2325-2333. doi:10.1194/jlr.M006205. PubMed: 20427696.
- Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ et al. (2006) Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 15: 1745-1756. doi:10.1093/hmg/ddl117. PubMed: 16670158.
- Singmann P, Rzehak P, Berdel D, Wichmann HE, Heinrich J (2010) No association between FADS polymorphisms and atopic diseases in children from the GINI and LISA birth cohorts. *Allergy* 65: 1627-1629. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02457.x. PubMed: 20716318.
- Sääf AM, Tengvall-Linder M, Chang HY, Adler AS, Wahlgren C-F et al. (2008) Global Expression Profiling in Atopic Eczema Reveals Reciprocal Expression of Inflammatory and Lipid Genes. *PLOS ONE* 3: e4017. doi:10.1371/journal.pone.0004017. PubMed: 19107207.
- Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO et al. (2012) Cohort Profile: The INMA-Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol* 41: 930-940. doi: 10.1093/ije/dyr054. PubMed: 21471022.
- Morales E, Bustamante M, Gonzalez JR, Guxens M, Torrent M et al. (2011) Genetic Variants of the FADS Gene Cluster and ELOVL Gene Family, Colostrums LC-PUFA Levels, Breastfeeding, and Child Cognition. *PLOS ONE* 6: e17181. doi:10.1371/journal.pone.0017181. PubMed: 21383846.
- Morales E, Garcia-Esteban R, Guxens M, Guerra S, Mendez M et al. (2012) Effects of prolonged breastfeeding and colostrum fatty acids on allergic manifestations and infections in infancy. *Clin Exp Allergy* 42: 918-928. PubMed: 22909163.
- Goulter AB, Harner DW, Clark KL (2006) Evaluation of low density array technology for quantitative parallel measurement of multiple genes in human tissue. *BMC Genomics* 7: 34. doi: 10.1186/1471-2164-7-34. PubMed: 16504128.
- Mesko B, Poliska S, Szegedi A, Szekanez Z, Palatka K et al. (2010) Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets. *BMC Med Genomics* 3: 15. doi:10.1186/1755-8794-3-15. PubMed: 20444268.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262. PubMed: 11846609.
- Chisaguano AM, Lozano B, Molto-Puigmarti C, Castellote AI, Rafecas M et al. (2013) Elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid (c9,t11-CLA) determination in human plasma phospholipids and human milk by fast gas chromatography. *Anal Methods* 5: 1264-1272. doi:10.1039/c2ay26236c.
- Warensjö E, Rosell M, Hellenius M-L, Vessby B, De Faire U et al. (2009) Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis* 8: 37. doi: 10.1186/1476-511X-8-37. PubMed: 19712485.
- Khnykin D, Miner JH, Jahnson F (2011) Role of fatty acid transporters in epidermis: implications for health and disease. *Dermatoendocrinol* 3: 53-61. doi:10.4161/derm.3.2.14816. PubMed: 21695012.
- Ziboh VA, Miller CC, Cho Y (2000) Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr* 71: 361s-366s. PubMed: 10617998.
- van Gool CJAW, Thijs C, Henquet CJM, van Houwelingen AC, Dagnelie PC et al. (2003) -Linolenic acid supplementation for prophylaxis of atopic dermatitis: a randomized controlled trial in infants at high familial risk. *Am J Clin Nutr* 77: 943-951. PubMed: 12663296.
- Calder PC, Miles EA (2000) Fatty acids and atopic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 11: 29-36. doi:10.1034/j.1399-3038.2000.00508.x. PubMed: 11048769.
- Umeda-Sawada R, Fujiwara Y, Ushiyama I, Sagawa S, Morimitsu Y et al. (2006) Distribution and Metabolism of Dihomo-gamma-linolenic Acid (DGLA, 20:3n-6) by Oral Supplementation in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 2121-2130. doi:10.1271/bbb.60057. PubMed: 16960355.
- Xiaoping W, Huanping L, Yan G (2012) Multiple roles of dihomogamma-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis* 11: 25-25. doi:10.1186/1476-511X-11-25. PubMed: 22333072.
- Fan Y-Y, Monk JM, Hou TY, Callway E, Vincent L et al. (2012) Characterization of an arachidonic acid-deficient (Fads1 knockout) mouse model. *J Lipid Res* 53: 1287-1295. doi:10.1194/jlr.M024216. PubMed: 22534642.
- Church RJ, Jania LA, Koller BH (2012) Prostaglandin E2 Produced by the Lung Augments the Effector Phase of Allergic Inflammation. *J Immunol* 188: 4093-4102. doi:10.4049/jimmunol.1101873. PubMed: 22412193.
- Dorris SL, Peebles RS (2012) PGI2 as a Regulator of Inflammatory Diseases. *Mediat Inflamm* 9: 926968. PubMed: 22851816.
- Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA (2010) Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent*

- Fatty Acids 83: 61-68. doi:10.1016/j.plefa.2010.04.001. PubMed: 20573490.
38. Thijs C, Müller A, Rist L, Kummeling I, Snijders BEP et al. (2011) Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy* 66: 58-67. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02445.x. PubMed: 20659079.
39. Lattka E, Klopp N, Demmelmair H, Klingler M, Heinrich J et al. (2012) Genetic Variations in Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism - Implications for Child Health? *Ann Nutr Metab* 60: 8-17. doi: 10.1159/000337308.
40. Fedenko ES, Elisyutina OG, Filimonova TM, Boldyreva MN, Burmenskaya OV et al. (2010) Cytokine gene expression in the skin and peripheral blood of atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Self/Nonself* 2: 120-124.
41. Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49: 186-199. doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.002. PubMed: 20018209.

DISCUSIÓN GENERAL

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de cohorte INMA es prospectivo y su principal interés es el de encontrar asociaciones entre el medio ambiente y determinadas patologías. Nuestros resultados muestran las asociaciones entre los niveles plasmáticos de AG, en el embarazo y el recién nacido y el riesgo de sufrir enfermedades atópicas durante la primera etapa de la vida. De manera especial nos focalizamos en el estudio del eczema atópico, ya que es la primera enfermedad que se manifiesta en la infancia, junto con uno de los síntomas que predice el desarrollo de asma en la infancia tardía como son las sibilancias.

La discusión de los resultados de esta tesis se expondrá estructurada en base al diseño experimental establecido. Por tanto, en primer lugar se discutirán los resultados derivados de la publicación sobre el **desarrollo y validación del método analítico** (Publicación 1), en segundo lugar los resultados relativos a las dos publicaciones que estudiaron **la influencia de la composición plasmática de ácidos grasos en el desarrollo de enfermedades atópicas** (publicaciones 2 y 3) y, por último, los resultados de los estudios que analizan la **influencia de factores genéticos sobre la composición de ácidos grasos y el desarrollo de enfermedades atópicas** (Publicaciones 4 y 5).

1. Metodología analítica.

La técnica más empleada hoy en día para el análisis de ácidos grasos es la cromatografía de gases (CG). La aparición de la CG rápida, mediante el uso de columnas más cortas, un menor diámetro y grosor de la fase estacionaria, combinadas con equipos que permiten rampas de temperatura y enfriamientos muy rápidos, ha permitido que se pueda obtener un perfil completo de AG en las muestras biológicas en un tiempo realmente corto comparado con la CG convencional donde se utilizan columnas largas. Debido a que la determinación de isómeros *trans* de los ácidos grasos ha cobrado un gran interés en el campo de la nutrición y la salud, por los posibles efectos fisiológicos como ya se ha comentado en los antecedentes bibliográficos, actualmente se ha planteado un nuevo reto a la hora de conseguir métodos más rápidos tanto en lo que respecta a la preparación de la muestra como a su posterior análisis cromatográfico.

Desarrollo y validación de un método analítico rápido y directo que permita determinar los ácidos grasos *trans* en los fosfolípidos del plasma humano y en leche humana por cromatografía de gases rápida

En base a los buenos resultados del método desarrollado para el análisis de isómeros del CLA en la leche humana publicado anteriormente por nuestro grupo de investigación, se propuso el desarrollo posterior y validación de un método que permitiera determinar también los principales isómeros *trans* del ácido oleico, el ácido elaídico y el ácido *t*-vaccénico, siempre en el contexto de un perfil completo de ácidos grasos. El método debería ser aplicable además a otras muestras biológicas, como los fosfolípidos del plasma humano, debido al interés que tienen los AG de esta fracción lipídica como marcadores de la ingesta.

Para realizar un análisis correcto de los AGT, principalmente se debe considerar la columna y las condiciones cromatográficas empleadas. La mayoría de métodos descritos en literatura utilizan columnas cromatográficas largas (100 m x 0.25 mm x 0.20 μ m) y programas de temperatura con isotermas largas, la combinación de estos parámetros provoca que el tiempo de análisis se enlentezca considerablemente, llegando a registrarse tiempos de entre 60 y 120 minutos. En estudios epidemiológicos donde se cuenta con elevados números de muestras de análisis, resulta imprescindible contar con técnicas analíticas que permitan obtener en el menor tiempo posible resultados sólidos y fiables.

En nuestro caso, para desarrollar el método se optimizaron tanto la preparación de la muestra como las condiciones cromatográficas. Posteriormente, se validó el método y se aplicó a muestras de plasma y leche humana

La optimización de la **preparación de la muestra** se realizó para cada matriz.

- Plasma humano: La optimización consistió en incorporar placas SPE de 96 pocillos (Aminopropil, NH₂) para acelerar la etapa de separación de la fracción de fosfolípidos de un mayor número de muestras.
- Leche humana: Se pudo optimizar el uso de reactivos y principalmente la cantidad de muestra, usando sólo 50 μ L de leche materna para cada determinación. Conseguir un método que utilice un bajo volumen de muestra es una gran ventaja para los estudios con muestras biológicas.

Para la **separación cromatográfica**, se utilizaron dos equipos diferentes, cada uno de ellos equipado con una columna capilar rápida distinta, la RTX-2330 y la SP-2560, ambas de elevada polaridad pero de distintas dimensiones (40 m x 0.18 mm i.d. x 0.10 μm y 75 m x 0.18 mm i.d. x 0.14 μm , respectivamente). En cada sistema se utilizaron patrones de los esteres metílicos de los AG (FAMEs, del inglés *Fatty Acids Methyl Esters*), muestras de fosfolípidos del plasma y leche humana, para optimizar las condiciones cromatográficas de cada columna. Posteriormente se compararon los dos sistemas en términos de resolución y tiempo de análisis, donde la columna RTX-2330 permitió obtener una buena separación de los AG de los patrones y de los fosfolípidos del plasma en un tiempo de 14.2 minutos; sin embargo, la columna SP-2560 gracias a su mayor longitud permitió conseguir una mejor separación de los isómeros *trans*-C18:1 en los patrones y en las dos matrices analizadas, en un tiempo total de análisis de 32.2 minutos; lo que supone una reducción de tiempo considerable respecto a otros métodos que tardan entre 60 y 120 minutos con las columnas tradicionales de 100 m de longitud; por tanto, esta columna fue elegida para validar el método.

La validación del método se realizó en términos de recuperación y precisión. El método desarrollado con el uso de placas SPE demostró tener una alta recuperación de los AG (95.8 y 103.7%), ser preciso (con coeficientes de variación para la repetibilidad y reproducibilidad de entre 0.76 y 8.87%) y tener una alta sensibilidad gracias a los picos más estrechos que permiten una mejor separación y cuantificación. Finalmente, se aplicó el método validado al análisis de AG de muestras de leche humana y plasma obtenidos de voluntarios adultos sanos, confirmando la idoneidad del mismo para separar los isómeros *trans* estudiados tanto si estos se encuentran en proporciones bajas (plasma humano) como elevadas (leche materna).

2. Estudios sobre la influencia de la composición plasmática de ácidos grasos en el desarrollo de enfermedades atópicas

Se considera que el origen de las enfermedades atópicas en los niños se inicia muy temprano en la vida, posiblemente en el útero, de ahí la importancia de saber si el suministro de AG al feto durante el embarazo puede influir a largo plazo en el fenotipo alérgico.

Como se ha expuesto en los antecedentes bibliográficos, los resultados sobre la influencia de la composición de ácidos grasos del plasma materno y del recién nacido sobre el riesgo de desarrollar enfermedades atópicas en la infancia todavía son inconsistentes. Esta inconsistencia puede deberse al hecho de que los estudios han determinado los niveles de AG en diferentes momentos del embarazo, dando la posibilidad de que en cada estudio se puedan detectar distintas asociaciones entre los niveles de AGPI y el desarrollo de las enfermedades atópicas. Las diferencias de los resultados también pueden explicarse por las diferentes matrices de análisis, que varían desde el análisis de fosfolípidos del plasma hasta el análisis de los fosfolípidos de los glóbulos rojos de la sangre.

Al revisar la bibliografía se descubren aún ciertos vacíos, entre ellos se destacan: Primero, se conoce muy poco acerca del efecto que podrían provocar los niveles plasmáticos maternos de ácidos grasos *trans* en el metabolismo de los AGE y en el desarrollo de enfermedades en el niño y segundo, la mayoría de estudios evalúan el efecto de la dieta y no el efecto de los niveles circulantes de AGPI de las series n-3 y n-6 en el plasma materno y en cordón umbilical como principal fuente de alimentación del feto hasta el nacimiento.

Efecto de la composición de AGT del plasma materno durante el embarazo sobre el metabolismo de los AGPI y sobre el desarrollo de eczema atópico y sibilancias en el primer año de vida.

Se conoce que el grupo más abundante de AGT en la dieta humana es el grupo de isómeros *trans* del ácido oleico. En la grasa de fuente industrial el **ácido elaídico** (*t*9-C18:1) es el AG predominante, mientras que en la grasa de fuente natural es el **ácido t-vaccénico** (*t*11-C18:1); por tanto, consideramos a estos AG como marcadores de la ingesta de AGT ya que sólo pueden ser introducidos a nuestro organismo a través de la dieta. Por otro lado, existen otros AGT, como el **ácido ruménico** (*c*9,*t*11-C18:2, CLA) que se encuentra principalmente en los productos derivados de animales rumiantes, y junto con el ácido *t*-vaccénico son utilizados como marcadores de la ingesta de grasa de fuente natural. El ácido ruménico tiene la característica especial de que también puede ser sintetizado por los humanos tal cómo se ha expuesto en los antecedentes bibliográficos; sin embargo, los niveles plasmáticos de este AG están más influidos por la dieta.

Se cree que los AGT de origen industrial, y no los de origen natural, producen efectos adversos sobre la salud; no obstante, hasta el momento los datos en la literatura acerca

de la relación entre los AGT clasificados de acuerdo a su fuente de origen y los AGPI-CL son escasos, y además los resultados relacionados con el desarrollo de enfermedades atópicas no están claros.

Para evaluar si existen diferencias entre los isómeros *trans* de las dos principales fuentes de consumo en la cohorte general, en este trabajo analizamos primero la relación de los AGT con el metabolismo de los AGE y sus metabolitos de cadena larga, así se pudo comprobar que sólo niveles elevados de ácido elaídico en la fracción de fosfolípidos del plasma materno (marcador de la ingesta de grasa industrial) se asocia negativamente con el metabolismo de los AGPI de la serie n-3, principalmente con EPA y DHA. Los AGPI-CL como el DHA son esenciales en la formación del sistema nervioso del feto, por tanto, si no existe un aporte adecuado de este AG podría producir alteraciones en el normal crecimiento fetal. Por otro lado, se pudo observar que el ácido ruménico se correlaciona positivamente con los AGPI-CL de las dos series, n-3 y n-6; excepto con el AA, indicando el posible efecto beneficioso del consumo de este ácido graso en la activación, ya sea de la síntesis o de una mejor distribución en las membranas celulares de los AGPI-CL.

Finalmente, exploramos la posible asociación entre los niveles de AGT en el desarrollo del eczema atópico y la presencia de sibilancias en el primer año de vida, para ello se distribuyó la población de estudio en terciles, considerando el tercil que contenía los niveles bajos de los AG de interés como referencia. Se agregaron a los modelos de regresión logística factores de confusión que pudieran afectar la respuesta de cada análisis, madres que sufrieran algún tipo de alergia o alguna manifestación atópica, así como su nivel de educación y si fumaron durante el embarazo, además el sexo del niño y el tiempo de la lactancia materna fueron considerados como potentes factores confusores. La estimación de las posibles asociaciones reveló que niveles altos de ácido *t*-vaccénico, están asociados con un menor riesgo de sufrir eczema atópico en el primer año de vida. Nuestros resultados podrían apoyar la hipótesis de que un mayor consumo de alimentos ricos en ácido *t*-vaccénico y/o ácido ruménico podrían tener un efecto beneficioso en la salud del feto y a largo plazo en la salud del niño, tal como han sugerido diferentes investigadores. Por un lado, el ácido ruménico favorece el metabolismo de los AGPI-CL de la serie n-3, y por otro lado, el ácido *t*-vaccénico ayuda a proteger al niño del riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida. Los mecanismos de acción por los que actuaría el ácido *t*-vaccénico todavía no están del todo claros.

En el caso de las sibilancias como posible indicador de desarrollo de asma, no se encontraron asociaciones con ningún isómero *trans* estudiado, esto puede deberse a que la mayoría de casos que presentan sibilancias en el primer año de vida, están relacionadas con infecciones respiratorias y no propiamente al hecho que pueda desencadenarse en asma.

Asumimos el hecho de que estos resultados deben ser interpretados con cautela, porque a pesar de que se llevó a cabo un análisis extenso por asociaciones, y que esto lleva consigo la probabilidad de ocurrencia y, por tanto, resultados estadísticamente significativos, no se puede hablar de una relación causal directa. Por otra parte, no contamos con los datos de la dieta del niño durante el primer año de vida, lo que hace que sea menos probable que los resultados puedan atribuirse únicamente sólo a la ingesta materna, estimada en niveles plasmáticos de los isómeros *trans*. La compleja relación entre los niveles plasmáticos de AGT en la madre y los resultados de eczema atópico en el niño, requiere ser confirmada con más estudios.

Efecto de la composición de AGE y AGPI del plasma materno y del plasma del cordón umbilical sobre el desarrollo de eczema atópico

El eczema atópico es la primera enfermedad atópica que se manifiesta en los dos primeros años de vida, donde el metabolismo de los AGE y especialmente los AGPI-CL cumplen un papel muy importante, ya que a partir de ellos se desencadenan una serie de reacciones que provocan como resultado la sintomatología característica de esta enfermedad. Por un lado, algunos AGPI-CL de la serie n-6, como el DGLA están involucrados en el mantenimiento de la permeabilidad de las membranas celulares de las células que protegen la barrera de la epidermis, mientras que AG como el AA son sustratos en la síntesis de mediadores químicos que provocan los síntomas como el picor y la quemazón. Por otro lado, derivados de los AGPI-CL de la serie n-3 contrarrestan, por competencia, la producción de mediadores lipídicos inflamatorios y, por tanto, ayudan a reducir la inflamación. La mayoría de estos resultados han sido obtenidos en estudios que utilizan modelos animales, o estudios de suplementación con los AG específicos, hasta el momento la relación causal real entre los niveles plasmáticos de los AG en periodos críticos como el embarazo en humanos se ha explorado con resultados todavía controvertidos. Varios estudios encuentran asociaciones inversas entre los niveles de AGPI-CL n-3 y el eczema atópico; sin embargo, otros no encontraron asociaciones

causales. De ahí la necesidad de continuar estudiando las potenciales asociaciones con el desarrollo de la enfermedad.

En este estudio se incluyeron a mujeres sanas y sus hijos de la Cohorte de INMA-Sabadell que presentaron niveles bajos de IgE específicas frente a los tres alérgenos analizados en el proyecto (IgE < 0.35 KU/L para caspa de gato, gramíneas y ácaros). El grupo de estudio se fijó para evitar la influencia de la atopía materna y de esta forma analizar de manera más directa el efecto de los niveles plasmáticos de AGE y AGPI sobre el desarrollo del eczema atópico. El feto se alimenta a través del cordón umbilical, por tanto, el análisis de la composición de los AG del plasma del cordón umbilical proporciona una gran cantidad de información sobre el estado de los AG iniciales del niño hasta su nacimiento. Por otro lado, la composición de AG del plasma materno está íntimamente relacionada con el aporte de éstos a través de la dieta, por lo que se ha sugerido en varios estudios que podría proporcionar información para realizar posibles recomendaciones dietéticas.

Las madres de niños que en los primeros 14 meses de vida desarrollaron eczema atópico presentaron niveles más bajos de la suma de los AGPI-CL, en comparación con el plasma de las madres cuyos hijos no tenían eczema atópico. Al analizar las asociaciones ajustando los modelos por los factores de confusión más relevantes, se pudo constatar que niveles altos de la suma de AGPI-CL tienen efectos protectores frente al riesgo de que los niños desarrollen eczema atópico.

En cuanto a la composición de AG del cordón umbilical, los niños sanos presentaron mayores concentraciones de AGPI-CL de la serie n-3, especialmente EPA y DHA respecto a los niños atópicos. Los modelos logísticos mostraron que los AG de la serie n-3 y especialmente el DHA podrían proteger al niño del riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida.

Parece ser que cumpliendo las recomendaciones del consumo especialmente de DHA (pescados y productos marinos) en las mujeres embarazadas, junto con un adecuado aporte al feto de los AGE, ayudarían a proteger a los niños frente al riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida.

En resumen nuestros resultados confirman la importancia del consumo de alimentos ricos en AGT de origen natural y alimentos ricos en DHA en la prevención del desarrollo de las enfermedades atópicas.

3. Estudios de la influencia de factores genéticos sobre la composición de ácidos grasos y enfermedades atópicas

El suministro suficiente de AGPI-CL durante el embarazo y la lactancia se considera muy importante para el desarrollo adecuado y la salud prenatal y la infancia. Por esta razón, el análisis genético de las diferencias interindividuales en los niveles de AG de la madre durante el embarazo, y los niveles de AG del recién nacido es de especial interés para comprender y en consecuencia optimizar el suministro de los AG al bebé.

Además de la dieta, un factor muy importante para la determinación de la composición de los AGPI-CL en los tejidos humanos, es la síntesis *de novo* de estos AG. En este proceso las enzimas desaturasas y elongasas, son la clave en la biosíntesis endógena de los AGPI-CL.

Dadas las diferencias encontradas en los niveles plasmáticos de AG en niños e incluso en adultos atópicos, varias investigaciones sugirieron que alteraciones ya sea a nivel estructural (presencia de polimorfismos) o a nivel transcripcional en las enzimas (expresión génica), podrían ser la causa y condicionar fuertemente la síntesis de AGPI-CL. Hasta el momento los estudios que han analizado cohortes de madres embarazadas y sus niños coinciden en que las personas portadoras del alelo minoritario de los polimorfismos (SNPs) en el clúster *FADS* están asociados con una baja capacidad de sintetizar AGPI-CL de la serie n-6, especialmente AA, se indica que los SNPs están asociados con altas concentraciones de los sustratos y bajas concentraciones de los productos en cada una de las enzimas; sin embargo, todavía hay resultados poco concluyentes respecto AG como el DGLA, EPA y DHA, por tanto, más estudios son necesarios en esta área.

Estudio del efecto de las variantes genéticas de los genes que codifican a las desaturasas (*FADS*) y elongasas (*ELOVL*) de la madre y del niño sobre la composición de ácidos grasos del niño y, exploración de la posible asociación con el eczema atópico y sibilancias en los primeros 4 años de vida.

En este estudio evaluamos las asociaciones entre los polimorfismos de los genes que codifican a las desaturasas (genes *FADS*) y elongasas (genes *ELOVL*), enzimas que participan en la síntesis de los AGPI-CL.

La mayoría de los SNPs estudiados del clúster *FADS*, tanto de la madre como del cordón umbilical del niño, están fuertemente asociados con los niveles de AGPI del cordón umbilical, especialmente madres/hijos portadores de alelos minoritarios de los SNPs están asociados con altas concentraciones de LA y DGLA y con bajas concentraciones de AA. Además encontramos que algunos SNPs de la madre (rs174537, rs2072114 y rs174464) están asociados con bajos niveles de AGPI-CL de la serie n-3, DPA y DHA del cordón umbilical y algunos SNPs del niño (rs17427 y rs174464) también están asociados con bajos niveles de DHA. Los requerimientos del DHA durante el embarazo son muy altos, principalmente en el último trimestre del embarazo, tal como se expuso en los antecedentes bibliográficos, por lo que es importante comprender los factores que afectan sus niveles durante los periodos pre y postnatal.

Estudiamos también las asociaciones de los SNPs del clúster *FADS* con las actividades enzimáticas, estimadas por la relación producto:sustrato, para cada enzima. Se pudo observar que la mayoría de SNPs maternos están asociados con la actividad enzimática de la D5D y que no tiene mayor influencia sobre la actividad enzimática de la D6D.

Respecto a las asociaciones de los SNPs con el riesgo de enfermedad atópica, los resultados hasta ahora obtenidos son inconsistentes, algunos estudios encuentran asociaciones entre los alelos minoritarios y el riesgo de sufrir eczema en la población adulta; sin embargo, otros no encontraron asociaciones estadísticamente significativas en la población infantil. Al analizar las asociaciones de los SNPs del clúster *FADS* y el riesgo de que los niños sufran alguna enfermedad atópica en los primeros 4 años de vida, encontramos que los hijos de madres y los niños portadores de los alelos minoritarios del SNP rs174627 tienen un bajo riesgo de sufrir eczema atópico en los primeros 4 años de vida. Asociaciones similares se detectaron para el SNP rs7482316 y las sibilancias. Cuando los SNPs madre/hijo fueron introducidos en los mismos modelos, sólo las asociaciones de los SNPs maternos siguieron siendo significativas, lo que nos indica que el genotipo materno tiene un mayor impacto en el desarrollo del eczema y las sibilancias en los niños. Es importante recalcar que, el SNP rs174627 se relacionó con mayores cantidades de DGLA en sangre del cordón umbilical, así como niveles más bajos de AA. Se observó la misma tendencia para el SNP rs174602. Por lo tanto, se puede inferir que algunos alelos minoritarios que se asociaron con menores niveles de AA, también se asociaron con un menor riesgo de eczema y sibilancias. Las variantes genéticas de la

madre y del niño si influyen en el aporte de AGPI al niño y también influyen en el riesgo de sufrir alguna enfermedad atópica, resultados que se asemejan a los obtenidos en investigaciones previas realizadas en adultos.

Respecto a los resultados obtenidos de las variantes genéticas de los genes *ELOVL* que codifican a la Elongasa-2 (*ELOVL2*) y Elongasa-5 (*ELOVL5*), pudimos observar que principalmente los niveles de EDA (C20:2 n-6) están influidos por algunos de los SNPs de los genes *ELOVL*. Por un lado, se encontró que las madres/hijos portadores de los alelos minoritarios de algunos SNPs del gen *ELOVL2* (rs953413, rs10498676 y rs3798719) están asociados con altas concentraciones de EDA, mientras que por otro lado, sólo los niños portadores del alelo minoritario del SNPs rs12207094 del gen *ELOVL5* están asociados con bajas concentraciones de EDA. Nuestros resultados difieren del estudio realizado por Tanaka et al (2009), quienes encontraron que los portadores de alelos minoritarios del SNP rs953413 están asociados con altas cantidades de EPA en su estudio de GWAS (del inglés *Genome-Wide Association Study*); sin embargo, consideramos que las diferencias se deben principalmente al tamaño de muestra, nuestro estudio tiene un tamaño de muestra pequeño comparado con el GWAS, por lo que se requieren más estudios con poblaciones grandes para establecer la influencia genética real de las variantes genéticas de los genes *ELOVL* sobre el metabolismo de los AGPI-CL.

Al analizar las posibles asociaciones directas entre las variantes genéticas de los genes *ELOVL* y el riesgo de enfermedad, encontramos que los niños de madres portadoras de los alelos minoritarios de los SNPs rs2294859 y rs111968589 tienen un menor riesgo de sufrir eczema atópico a los 4 años de edad. Además, los niños portadores del alelo minoritario del SNP rs12207094, relacionado con bajas cantidades de EDA, fue el único SNP que mostro tener una fuerte asociación con un mayor riesgo de sufrir eczema.

Por otro lado, encontramos que no existe asociación causal entre los niveles de AGPI del plasma del cordón umbilical con el riesgo de enfermedad a los 4 años de vida. En nuestro estudio previo (publicación 3) si encontramos asociación entre los niveles de EPA y DHA y el riesgo de eczema atópico en los primeros 14 meses de vida, resultados que nos indican que los niveles de AGPI del recién nacido influyen sobre la salud infantil, sólo en el primer año de vida, y que estos efectos están modulados por la presencia de algunas variantes genéticas que modifican y condicionan el metabolismo de los ácidos grasos.

Estudio del efecto de los cambios de expresión génica de los genes que codifican a las desaturasas y elongasas en niños de 4 años de edad sobre el desarrollo de eczema atópico.

En este estudio queríamos explorar los posibles cambios de expresión de los genes *FADS* y *ELOVL* de un subgrupo de niños de la Cohorte INMA-Sabadell que sufrieron eczema atópico durante los primeros 4 años de vida. Identificar las posibles alteraciones, como los cambios de expresión de los genes que codifican a las proteínas que posteriormente harán su función como enzimas, pueden ayudar a comprender de mejor manera los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.

Hasta el momento no se cuenta con resultados de estudios realizados en la población infantil que sufra esta enfermedad, sólo se conoce que en la población adulta, los pacientes con eczema atópico tienen bajos niveles de expresión de los genes *FADS1* y *FADS2* en comparación con los adultos sanos, estos genes codifican la síntesis de las desaturasas D5D y D6D, respectivamente. Una baja expresión de estas enzimas condiciona la síntesis de AGPI y por tanto la liberación de los mediadores lipídicos que participan en el desencadenamiento de la sintomatología del eczema atópico.

Nuestros resultados permitieron observar que los niveles de expresión de los genes que codifican a las desaturasas *FADS1* (D5D) y *FADS2* (D6D) están fuertemente asociados a los niveles de DGLA en plasma y la actividad enzimática de la D6D (DGLA:LA) de los niños. Además, se pudo conocer que los niños atópicos tienen bajos niveles circulantes de DGLA en plasma, lo que podría estar influido por la baja expresión de *FADS2* y *ELOVL5*, genes que codifican las enzimas Elongasa-5 y D6D, respectivamente. Estas enzimas participan activamente en la síntesis de este ácido graso. Considerando que el DGLA ha demostrado tener un papel fundamental en la protección de la barrera de la epidermis y que a partir de él se sintetizan mediadores lipídicos antiinflamatorios, resulta de gran importancia tomar medidas que ayuden a mantener los niveles adecuados de este ácido graso una vez se hayan identificados los factores que modifican su metabolismo.

A diferencia del estudio desarrollado en adultos que se realizó en muestras de piel, en nuestro estudio realizado en muestras de sangre no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *FADS1* (gen que codifica a la enzima

D5D) esto podría indicar que la piel al ser el órgano diana de la enfermedad los genes se expresan más que en sangre.

En conjunto nuestros resultados avalan la hipótesis de que los niveles plasmáticos de algunos AGPI-CL de la serie n-6, están fuertemente asociados con los bajos niveles de expresión de los genes que codifican a las enzimas principales que participan en la biosíntesis de estos AG, y que esto repercute significativamente en un mayor riesgo de sufrir eczema atópico en los primeros 4 años de vida.

CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la realización de esta tesis doctoral proporcionan un soporte científico novedoso y han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado y validado un método analítico rápido para la determinación por cromatografía de gases rápida de los principales ácidos grasos *trans* (ácido elaídico, ácido *t*-vaccénico y ácido ruménico) de los fosfolípidos del plasma y de la leche materna. El nuevo método permite la separación de 53 ácidos grasos en un tiempo total de análisis de 32.2 minutos.
- El plasma materno presenta correlaciones inversas entre el ácido elaídico, AGT marcador de la ingesta de grasa industrial, y las concentraciones de los AGPI-CL de la serie n-3, especialmente con el DHA, ácido graso fundamental en el desarrollo del sistema nervioso fetal. Nuestros resultados indican que el ácido elaídico puede reducir el suministro de los AGPI-CL en el primer trimestre del embarazo.
- Altas concentraciones de ácido *t*-vaccénico, AGT marcador de la ingesta de grasa natural, en el plasma materno pueden proteger al niño del riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida.
- Altos niveles de AGPI n-3, especialmente DHA, en el plasma del cordón umbilical pueden ayudar a disminuir el riesgo de desarrollar eczema atópico en el primer año de vida.
- El estatus de los ácidos grasos DGLA, AA y DHA del plasma del cordón umbilical está condicionado por el genotipo materno e infantil de los polimorfismos de un solo nucleótido en el clúster genético *FADS1/FADS2*.
- Las variantes genéticas de los genes *FADS* y *ELOVL* de la madre y del niño están asociadas con el riesgo de sufrir eczema atópico y sibilancias en los primeros 4 años de vida.

- Portadores del alelo minoritario de algunos SNPs del clúster *FADS*, relacionados con altas cantidades de DGLA y bajas cantidades de AA, tienen un bajo riesgo de sufrir eczema atópico (rs174627) y un bajo riesgo de sufrir sibilancias (rs7482316) en los primeros 4 años de vida.
- Los niños portadores del alelo minoritario del SNP rs12207094 en el gen *ELOVL5*, relacionado con bajas cantidades de EDA, tienen un mayor riesgo de sufrir eczema en los primeros 4 años de edad.
- El efecto protector de los AGPI-CL de la serie n-3, como el EPA y DHA del cordón umbilical frente al desarrollo de eczema atópico, se limita sólo al primer año de vida y no en la infancia tardía cuando el niño alcanza los 4 años de edad.
- Los niños que desarrollaron eczema atópico en los primeros 4 años de vida tienen bajos niveles plasmáticos circulantes de DGLA y una baja actividad enzimática de la D6D.
- Este es el primer estudio en niños que confirma que una baja expresión de los genes *FADS2* y *ELOVL5* incrementa el riesgo de sufrir eczema atópico en los primeros 4 años de vida.

BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur. Respir. J.* 1997; 10:6-12.
2. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115:1109-1117.
3. Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Markert UR. Impact of PUFA on early immune and fetal development. *Br. J. Nutr.* 2008; 100:1158-1168.
4. Xie L, Innis SM. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J. Nutr.* 2008; 138:2222-2228.
5. Das U. A defect in Δ^6 and Δ^5 desaturases may be a factor in the initiation and progression of insulin resistance, the metabolic syndrome and ischemic heart disease in South Asians. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:130.
6. Calder PC. Abnormal fatty acid profiles occur in atopic dermatitis but what do they mean? *Clin. Exp. Allergy.* 2006; 36:138-141.
7. Glaser C, Heinrich J, Koletzko B. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism.* 2010; 59:993-999.
8. Bryk D. Trans fatty acids induce a proinflammatory response in endothelial cells through ROS-dependent nuclear factor- κ B activation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011; 62:229-238
9. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354:1601-1613.
10. Dhaka V, Gulia N, Ahlawat K, Khatkar B. Trans fats-sources, health risks and alternative approach-A review. *J. Food Sci. Tech.* 2011; 48:534-541.
11. Gebauer SK, Baer DJ. Trans-fatty acids: Health effects, recommendations, and regulations. En: Caballero B (ed) *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. Academic Press, Waltham. 2013: 288-292.

12. Stender S, Astrup A, Dyerberg J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids - health aspects. *Food Nutr. Res.* 2008; 52:10.3402/fnr.v3452i3400.1651.
13. Enke U, Jaudszus A, Schleussner E, Seyfarth L, Jahreis G, et al. Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: special focus on individual *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:247.
14. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113:832-836.
15. Greer FR, Sicherer SH, Burks AW, and the Committee on Nutrition and Section on Allergy and I. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: The role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics.* 2008; 121:183-191.
16. Wahn HU. Strategies for atopy prevention. *J Nutr.* 2008; 138:1770S-1772S.
17. Burks AW, Palmer KP, Haith MM, Benson JB. Allergies. En: Haith MM, Benson JB (eds). *Encyclopedia of Infant and Early Childhood Development.* Academic Press, San Diego. 2008: 41-51.
18. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, RF L (eds). *World Allergy Organization (WAO). White Book on Allergy.* WAO, Milwaukee. 2011: 1-220.
19. Beasley R. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet.* 1998; 351:1225-1232.
20. Barnetson RSC, Rogers M. Childhood atopic eczema. *Br. Med. J.* 2002; 324:1376-1379.
21. Patrizi A, Pileri A, Bellini F, Raone B, Neri I, et al. Atopic dermatitis and the atopic march: What is new? *J. Allergy.* 2011; 2011.
22. Bieber T. Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358:1483-1494.
23. Watson W, Kapur S. Atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2011; 7:S4.

24. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2010; 3:67-73.
25. Archer CB. Atopic eczema. *Medicine.* 2013; 41:341-344.
26. La Academia Española de Dermatología y Venereología. <http://www.aedv.es/>
27. Grupo ISSAC (España). Prevalencia de síntomas sugestivos de rinitis alérgica y de dermatitis atópica en adolescentes. *An. Esp. Pediatr.* 1999; 51:369-376.
28. Carvajal-Urueña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suárez-Varela M, García de Andoin N, et al. Variaciones geográficas en la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) fase III España. *Arch. Bronconeumol.* 2005; 41:659-666.
29. Chong Neto HJ, Rosário NA. Wheezing in infancy: Epidemiology, investigation, and treatment. *J. Pediatr. (Rio J.)*. 2010; 86:171-178.
30. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125:S81-S94.
31. Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol. Int.* 2013; 62:21-28.
32. Becker AB. Is primary prevention of asthma possible? *Pediatr. Pulmonol.* 2000; 30:63-72.
33. Alford SH, Zoratti E, Peterson EL, Maliarik M, Ownby DR, et al. Parental history of atopic disease: Disease pattern and risk of pediatric atopy in offspring. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114:1046-1050.
34. Wen HJ, Chen PC, Chiang TL, Lin SJ, Chuang YL, et al. Predicting risk for early infantile atopic dermatitis by hereditary and environmental factors. *Br. J. Dermatol.* 2009; 161:1166-1172.
35. Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick J-S, et al. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br. J. Nutr.* 2006; 96:774-790.

36. Apfelbacher CJ, Diepgen TL, Schmitt J. Determinants of eczema: population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy*. 2011; 66:206-213.
37. Bjerg A, Hedman L, Perzanowski MS, Platts-Mills T, Lundbäck B, et al. Family history of asthma and atopy: In-depth analyses of the impact on asthma and wheeze in 7- to 8-year-old children. *Pediatrics*. 2007; 120:741-748.
38. Sääf AM, Tengvall-Linder M, Chang HY, Adler AS, Wahlgren C-F, et al. Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. *PLoS ONE*. 2008; 3:e4017.
39. Dunder T, Kuikka L, Turtinen J, Räsänen L, Uhari M. Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy*. 2001; 56:425-428.
40. Seaton A, Godden DJ, Katrina B. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax*. 1994; 49:171-174.
41. Prescott SL. The influence of early environmental exposures on immune development and subsequent risk of allergic disease. *Allergy*. 2011; 66:4-6.
42. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet*. 2013; 8:253 - 262.
43. von Mutius E. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc. Am. Thorac. Soc*. 2007; 4:212-216.
44. Sala-Vila A, Miles EA, Calder PC. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clin. Exp. Allergy*. 2008; 38:1432-1450.
45. Ratnayake WMN, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Ann. Nutr. Metab*. 2009; 55:8-43.
46. Mena F, Mena A, Mena B, Tréton J. Trans-fatty acids, dangerous bonds for health? A background review paper of their use, consumption, health implications and regulation in France. *Eur. J. Nutr*. 2013; 52:1289-1302.
47. International Union of Pure and Applied Chemistry. <http://www.iupac.org/>

48. Vemuri M, Kelley DS. The effects of dietary fatty acids on lipid metabolism. En: Kuang CC eds. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. CRC Press, Boca Raton. 2007:1-15.
49. Mataix Verdú J. Lípidos. En: Mataix Verdú J eds. *Nutrición y Alimentación*. ERGON Madrid. 2002:61-93.
50. Lobb K, Chow CK. Fatty acid classification and nomenclature. En: Kuang CC eds. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. CRC Press, Boca Raton. 2007:1-15.
51. Calder PC, Kremmyda L-S, Vlachava M, Noakes PS, Miles EA. Is there a role for fatty acids in early life programming of the immune system? *Proc. Nutr. Soc.* 2010; 69:373-380.
52. Dirix CEH, Kester AD, Hornstra G. Associations between neonatal birth dimensions and maternal essential and trans fatty acid contents during pregnancy and at delivery. *Br. J. Nutr.* 2009; 101:399-407.
53. Boué C, Combe N, Billeaud C, Entressangles B. Nutritional implications of trans fatty acids during perinatal period, in French pregnant women. *OCL-OI Corp Gras Li.* 2001; 8:68-72.
54. Albuquerque TG, Costa HS, Castilho MC, Sanches-Silva A. Trends in the analytical methods for the determination of *trans* fatty acids content in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 2011; 22:543-560.
55. Turpeinen AM, Mutanen M, Aro A, Salminen I, Basu S, et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76:504-510.
56. Mosley EE, McGuire MK, Williams JE, McGuire MA. Cis-9, Trans-11 Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized from Vaccenic Acid in Lactating Women. *J. Nutr.* 2006; 136:2297-2301.
57. Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linolenic acid in ruminants. *J. Anim. Sci.* 2000; 77:1-15.

58. Kramer JKG, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, et al. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:1137S-1145S.
59. Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, et al. The role of D9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* 2001; 12:622-630.
60. Churruca I, Fernández-Quintela A, Portillo MP. Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects. *Biofactors.* 2009; 35:105-111.
61. Müller A, Ringseis R, Düsterloh K, Gahler S, Eder K, et al. Detection of conjugated dienoic fatty acids in human vascular smooth muscle cells treated with conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1737:145-151.
62. Banni S, Carta G, Angioni E, Murru E, Scanu P, et al. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.* 2001; 42:1056-1061.
63. Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth-A Review. *Placenta.* 2002; 23, Supplement A:S28-S38.
64. Larqué E, Demmelmair H, Gil-Sánchez A, Prieto-Sánchez MT, Blanco JE, et al. Placental transfer of fatty acids and fetal implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94:1908S-1913S.
65. Cunningham P, McDermott L. Long chain PUFA transport in human term placenta. *J. Nutr.* 2009; 139:636-639.
66. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin. Nutr.* 2008; 27:685-693.
67. Gil-Sánchez A, Larqué E, Demmelmair H, Acien MI, Faber FL, et al. Maternal-fetal in vivo transfer of [¹³C]docosahexaenoic and other fatty acids across the human placenta 12 h after maternal oral intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 92:115-122.
68. Larqué E, Demmelmair H, Berger B, Hasbargen U, Koletzko B. In vivo investigation of the placental transfer of ¹³C-labeled fatty acids in humans. *J. Lipid Res.* 2003; 44:49-55.

69. Haggarty P, Ashton J, Joynson M, Abramovich DR, Page K. Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta. *Neonatology*. 1999; 75:350-359.
70. Duttaroy AK. Transport of fatty acids across the human placenta: A review. *Prog. Lipid Res.* 2009; 48:52-61.
71. Gil-Sánchez A, Koletzko B, Larqué E. Current understanding of placental fatty acid transport. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2012; 15:265-272
72. Innis SM. Fatty acids and early human development. *Early Hum. Dev.* 2007; 83:761-766.
73. Larqué E, Zamora S, Gil A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. *Early Hum. Dev.* 2001; 65:S31-S41.
74. Larqué E, Pérez-Llamas F, Puerta V, Girón MD, Suárez MD, et al. Dietary *trans* fatty acids affect docosahexaenoic acid concentrations in plasma and liver but not brain of pregnant and fetal rats. *Pediatr. Res.* 2000; 47:278-283.
75. Moore CE, Dhopeswarkar GA. *Trans* Fatty Acids: Transport and positional specificity in rat placental lecithin. *Neonatology*. 1982; 42:138-144.
76. Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta*. 2005; 26:S70-S75.
77. Elias SL, Innis SM. Infant plasma *trans*, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73:807-814.
78. Craig-Schmidt M. Isomeric fatty acids: Evaluating status and implications for maternal and child health. *Lipids*. 2001; 36:997-1006.
79. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25:317-340.
80. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 2009; 91:791-795.
81. De Pablo MA, De Cienfuegos GÁ. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol.* 2000; 78:31-39.

82. Harizi H, Corcuff J-Bt, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 2008; 14:461-469.
83. Kremmyda L-S, Vlachava M, Noakes P, Diaper N, Miles E, et al. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: A systematic review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2011; 41:36-66.
84. Dennis EA. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161:S32-S35.
85. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001; 294:1871-1875.
86. Calder P, Grimble R. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002; 56:S14-S19.
87. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* 2008; 79:101-108.
88. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. *J. Immunol.* 2012; 188:21-28.
89. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83:S1505-1519S.
90. Honma Y, Arai I, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, et al. Prostaglandin D₂ and prostaglandin E₂ accelerate the recovery of cutaneous barrier disruption induced by mechanical scratching in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 518:56-62.
91. Nicolaou A. Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* 2013; 88:131-138.
92. Trak-Fellermeier MA, Brasche S, Winkler G, Koletzko B, Heinrich J. Food and fatty acid intake and atopic disease in adults. *Eur. Respir. J.* 2004; 23:575-582.
93. Sausenthaler S, Kompauer I, Borte M, Herbarth O, Schaaf B, et al. Margarine and butter consumption, eczema and allergic sensitization in children. The LISA birth cohort study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2006; 17:85-93.

94. Bolte G, Frye C, Hoelscher B, Meyer I, Wjst M, et al. Margarine consumption and allergy in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163:277-279.
95. Calder PC, Miles EA. Fatty acids and atopic disease. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2000; 11:29-36.
96. Ziboh VA, Miller CC, Cho Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71:361s-366s.
97. Kawashima H, Tateishi N, Shiraishi A, Teraoka N, Tanaka T, et al. Oral administration of dihomo-g-linolenic acid prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Lipids.* 2008; 43:37-43.
98. Horrobin DF. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71:367s-372s.
99. Yen C-H, Dai Y-S, Yang Y-H, Wang L-C, Lee J-H, et al. Linoleic acid metabolite levels and transepidermal water loss in children with atopic dermatitis. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 2008; 100:66-73.
100. Xiaoping W, Huanping L, Yan G. Multiple roles of dihomo-g-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:25-25.
101. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, et al. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83:331-342.
102. Hong S, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Front. Immunol.* 2013; 4:13.
103. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* 2011; 111:5922-5943.
104. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol.* 2007; 28:176-183.
105. Gottrand Fdr. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Influence the Immune System of Infants. *J Nutr.* 2008; 138:1807S-1812S.

106. Decsi T, Koletzko B. Do trans fatty acids impair linoleic acid metabolism in children? *Ann. Nutr. Metab.* 1995; 39:36-41.
107. Innis SM. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. *Atheroscler. Suppl.* 2006; 7:17-20.
108. Weiland SK, von Mutius E, Hijsing A, Asher MI. Intake of *trans* fatty acids and prevalence of childhood asthma and allergies in Europe. *The Lancet.* 1999; 353:2040-2041.
109. Kummerow FA, Zhou Q, Mahfouz MM, Smiricky MR, Grieshop CM, et al. Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. *Life Sci.* 2004; 74:2707-2723.
110. Meijer GW, van Tol A, van Berkel TJ, Weststrate JA. Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster. *Atherosclerosis.* 2001; 157:31-40.
111. Crumb DJ, Vatter DA. Conjugated linoleic acid (CLA)-An Overview. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2011; 4:12-15.
112. O'Shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede ICM. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:1199S-1206S.
113. Dilzer A, Park Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012; 52:488-513.
114. MacRedmond R, Dorscheid DR. Conjugated linoleic acid (CLA): Is it time to supplement asthma therapy? *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2011; 24:540-548.
115. Lee Y. Isomer specificity of conjugated linoleic acid (CLA): 9E,11E-CLA. *Nutr. Res. Pract.* 2008; 2:326-330.
116. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22:505-531.
117. Tanaka K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Anim. Sci. J.* 2005; 76:291-303.
118. Reynolds CM, Roche HM. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* 2009; 82:199-204.

119. Park Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad *trans* fat? *J. Food. Comp. Anal.* 2009; 22, Supplement:S4-S12.
120. Sun X, Zhang J, MacGibbon AKH, Black P, Krissansen GW. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic dermatitis in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 2011; 41:729-738.
121. Kanwar RK, MacGibbon AK, Black PN, Kanwar JR, Rowan A, et al. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38:208-218.
122. Bassett CMC, Edel AL, Patenaude AF, McCullough RS, Blackwood DP, et al. Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr^{-/-} mice. *J. Nutr.* 2010; 140:18-24.
123. Field CJ, Blewett HH, Proctor S, Vine D. Human health benefits of vaccenic acid. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009; 34:979-991.
124. Fournier N, Attia N, Rousseau-Ralliard D, Védie Bt, Destailats Fdr, et al. Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821:303-312.
125. Gebauer SK, Chardigny J-M, Jakobsen MU, Lamarche B, Lock AL, et al. Effects of ruminant *trans* fatty acids on cardiovascular disease and cancer: A comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Adv. Nutr.* 2011; 2:332-354.
126. Clarke SD, Gasperikova D, Nelson C, Lapillonne A, Heird WC. Fatty acid regulation of gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 967:283-298.
127. Masi LN, Rodrigues AC, Curi R. Fatty acids regulation of inflammatory and metabolic genes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013; 16:418-424
128. Lampen A, Leifheit M, Voss J, Nau H. Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: Effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1735:30-40.
129. Benjamin S, Flotho S, Börchers T, Spener F. Conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids regulate peroxisome proliferator-activated receptor

- subtypes and major peroxisome proliferator responsive element-bearing target genes in HepG2 cell model. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2013; 14:115-123.
130. Hodge L, Peat JK, Salome C. Increased consumption of polyunsaturated oils may be a cause of increased prevalence of childhood asthma. *Aust. N. Z. J. Med.* 1994; 24:727.
131. Chatzi L, Garcia R, Roumeliotaki T, Basterrechea M, Begiristain H, et al. Mediterranean diet adherence during pregnancy and risk of wheeze and eczema in the first year of life: INMA (Spain) and RHEA (Greece) mother-child cohort studies. *Br. J. Nutr.* 2013; 110:2058-2068.
132. Maslova E, Halldorsson TI, Strøm M, Olsen SF. Low-fat yoghurt intake in pregnancy associated with increased child asthma and allergic rhinitis risk: a prospective cohort study. *J. Nutr. Sci.* 2012; 1:e5.
133. Erkkola M, Nwaru BI, Kaila M, Kronberg-Kippilä C, Ilonen J, et al. Risk of asthma and allergic outcomes in the offspring in relation to maternal food consumption during pregnancy: A finnish birth cohort study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2012; 23:186-194.
134. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Hirota Y. Dairy food, calcium and vitamin D intake in pregnancy, and wheeze and eczema in infants. *Eur. Respir. J.* 2010; 35:1228-1234.
135. Willers SM, Wijga AH, Brunekreef B, Kerkhof M, Gerritsen J, et al. Maternal food consumption during pregnancy and the longitudinal development of childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178:124-131.
136. Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, et al. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85:530-537.
137. Willers SM, Devereux G, Craig LCA, McNeill G, Wijga AH, et al. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax.* 2007; 62:773-779.

138. Romieu I, Torrent M, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Ribas-Fitó N, et al. Maternal fish intake during pregnancy and atopy and asthma in infancy. *Clin. Exp. Allergy*. 2007; 37:518-525.
139. Fitzsimon N, Fallon U, O'Mahony D, Loftus BG, Bury G, et al. Mothers' dietary patterns during pregnancy and risk of asthma symptoms in children at 3 years. *Ir. Med. J.* 2007; 100:S27-S32.
140. Nwaru BI, Erkkola M, Lumia M, Kronberg-Kippilä C, Ahonen S, et al. Maternal intake of fatty acids during pregnancy and allergies in the offspring. *Br. J. Nutr.* 2012; 108:720-732.
141. Lumia M, Luukkainen P, Tapanainen H, Kaila M, Erkkola M, et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and the risk of asthma in the offspring. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2011; 22:827-835.
142. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Ohfuji S, Hirota Y. Maternal fat consumption during pregnancy and risk of wheeze and eczema in Japanese infants aged 16-24 months: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Thorax*. 2009; 64:815-821.
143. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res.* 2008; 47:348-380.
144. Newson RB, Shaheen SO, Henderson AJ, Emmett PM, Sherriff A, et al. Umbilical cord and maternal blood red cell fatty acids and early childhood wheezing and eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114:531-537.
145. Notenboom ML, Mommers M, Jansen EHJM, Penders J, Thijs C. Maternal fatty acid status in pregnancy and childhood atopic manifestations: KOALA birth cohort study. *Clin. Exp. Allergy*. 2011; 41:407-416.
146. Pike KC, Calder PC, Inskip HM, Robinson SM, Roberts GC, et al. Maternal plasma phosphatidylcholine fatty acids and atopy and wheeze in the offspring at age of 6 years. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:13.
147. Decsi T, Burus I, Molnár S, Minda H, Veitl V. Inverse association between *trans* isomeric and long-chain polyunsaturated fatty acids in cord blood lipids of full-term infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74:364-368.

148. Decsi T, Campoy C, Demmelmair H, Szabó E, Marosvögyi T, et al. Inverse association between trans isomeric and long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnant women and their newborns: data from three European countries. *Ann. Nutr. Metab.* 2011; 59:107-116.
149. Decsi Ts, Boehm G. Trans isomeric fatty acids are inversely related to the availability of long-chain PUFAs in the perinatal period. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013; 98:543S-548S.
150. MacRedmond R, Singhera G, Attridge S, Bahzad M, Fava C, et al. Conjugated linoleic acid improves airway hyper-reactivity in overweight mild asthmatics. *Clin. Exp. Allergy.* 2010; 40:1071-1078.
151. Thijs C, Müller A, Rist L, Kummeling I, Snijders BEP, et al. Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy.* 2011; 66:58-67.
152. Suárez-Varela MM, Álvarez LG-M, Kogan M, Ferreira JC, Gimeno AM, et al. Diet and prevalence of atopic eczema in 6 to 7-year-old schoolchildren in Spain: ISAAC phase III. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010; 20:469-475.
153. Kankaanpää P, Nurmela K, Erkkilä A, Kalliomäki M, Holmberg-Marttila D, et al. Polyunsaturated fatty acids in maternal diet, breast milk, and serum lipid fatty acids of infants in relation to atopy. *Allergy.* 2001; 56:633-638.
154. Laitinen K, Sallinen J, Linderborg K, Isolauri E. Serum, cheek cell and breast milk fatty acid compositions in infants with atopic and non-atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy.* 2006; 36:166-173.
155. Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* 2010; 83:61-68.
156. Duchén K, Björkstén B. Polyunsaturated n-3 fatty acids and the development of atopic disease. *Lipids.* 2001; 36:1033-1042.
157. Das UN. Polyunsaturated fatty acids and atopic dermatitis. *Nutrition.* 2010; 26:719-720.
158. Wikipedia, the free encyclopedia. <http://www.wikipedia.com>

159. Hwang I, Cha A, Lee H, Yoon H, Yoon T, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids and atopy in Korean preschoolers. *Lipids*. 2007; 42:345-349.
160. Focke M, Sesztak-Greinecker G, Brannath W, Götz M, Jarisch R, et al. Plasma levels of polyunsaturated fatty acids in children with atopic dermatitis and in atopic and nonatopic controls. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2005; 117:485-491.
161. Leichsenring M, Kochsiek U, Paul K. (n-6)-Fatty acids in plasma lipids of children with atopic bronchial asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1995; 6:209-212.
162. Galli E, Picardo M, Chini L, Passi S, Moschese V, et al. Analysis of polyunsaturated fatty acids in newborn sera: A screening tool for atopic disease? *Br. J. Dermatol.* 1994; 130:752-756.
163. Genetics Home Reference website. <http://ghr.nlm.nih.gov/>
164. Wang Z, Moulton J. SNPs, protein structure, and disease. *Hum. Mutat.* 2001; 17:263-270.
165. Shastry B. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J. Hum. Genet.* 2007; 52:871-880.
166. The International HapMap Project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
167. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function and dietary regulation of D6, D5, and D9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 2004; 24:345-376.
168. Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 2010; 21:64-69
169. Marquardt A, Stöhr H, White K, Weber BHF. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics.* 2000; 66:175-183.
170. Koletzko B, Lattka E, Zeilinger S, Illig T, Steer C. Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 93:211-219.

171. Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ, et al. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15:1745-1756.
172. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 2006; 45:237-249.
173. Warensjo E, Rosell M, Hellenius M-L, Vessby B, De Faire U, et al. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 2009; 8:37.
174. Bokor S, Dumont J, Spinneker A, Gonzalez-Gross M, Nova E, et al. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J. Lipid Res.* 2010; 51:2325-2333.
175. Morales E, Bustamante M, Gonzalez JR, Guxens M, Torrent M, et al. Genetic variants of the FADS gene cluster and ELOVL gene family, colostrums LC-PUFA levels, breastfeeding, and child cognition. *PLoS ONE.* 2011; 6:e17181.
176. Merino D, Ma D, Mutch D. Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:63.
177. Steer CD, Hibbeln JR, Golding J, Davey Smith G. Polyunsaturated fatty acid levels in blood during pregnancy, at birth and at 7 years: their associations with two common FADS2 polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21:1504-1512.
178. Lattka E, Rzehak P, Szabó É, Jakobik V, Weck M, et al. Genetic variants in the FADS gene cluster are associated with arachidonic acid concentrations of human breast milk at 1.5 and 6 mo postpartum and influence the course of milk dodecanoic, tetracosenoic, and trans-9-octadecenoic acid concentrations over the duration of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 93:382-391.
179. Moltó-Puigmartí C, Plat J, Mensink RP, Müller A, Jansen E, et al. FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91:1368-1376.

180. Lattka E, Koletzko B, Zeilinger S, Hibbeln JR, Klopp N, et al. Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (FADS) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Br. J. Nutr.* 2012; FirstView:1-15.
181. Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, et al. Variants of the *FADS1* *FADS2* gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS ONE.* 2010; 5:e13261.
182. Rzehak P, Heinrich J, Klopp N, Schaeffer L, Hoff S, et al. Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (*FADS1* *FADS2*) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *Br. J. Nutr.* 2009; 101:20-26.
183. Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, Kisiailiou A, Ordovas JM, et al. Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI study. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000338.
184. Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L, Klopp N, Trabetti E, et al. SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids.* 2008; 43:289-299.
185. Baylin A, Ruiz-Narvaez E, Kraft P, Campos H. α -Linolenic acid, $\Delta 6$ -desaturase gene polymorphism, and the risk of nonfatal myocardial infarction. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85:554-560.
186. Plaisier CL, Horvath S, Huertas-Vazquez A, Cruz-Bautista I, Herrera MF, et al. A systems genetics approach implicates *USF1*, *FADS3*, and other causal candidate genes for familial combined hyperlipidemia. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000642.
187. Chiara Sabatti, Susan K Service, Anna-Liisa Hartikainen, Anneli Pouta SR, Jae Brodsky, et al. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat. Genet.* 2009; 41:35-46.
188. Singmann P, Rzehak P, Berdel D, Wichmann HE, Heinrich J. No association between FADS polymorphisms and atopic diseases in children from the GINI and LISA birth cohorts. *Allergy.* 2010; 65:1627-1629.

189. Standl M, Sausenthaler S, Lattka E, Koletzko S, Bauer CP, et al. FADS gene variants modulate the effect of dietary fatty acid intake on allergic diseases in children. *Clin. Exp. Allergy*. 2011; 41:1757-1766.
190. Lattka E, Klopp N, Demmelmair H, Klingler M, Heinrich J, et al. Genetic variations in polyunsaturated fatty acid metabolism -Implications for child health? *Ann. Nutr. Metab*. 2012; 60:8-17.
191. Standl M, Sausenthaler S, Lattka E, Koletzko S, Bauer CP, et al. FADS gene cluster modulates the effect of breastfeeding on asthma. Results from the GINIplus and LISAplus studies. *Allergy*. 2011; 67:83-90.
192. Nguyen DV, Bulak Arpat A, Wang N, Carroll RJ. DNA microarray experiments: Biological and technological aspects. *Biometrics*. 2002; 58:701-717.
193. Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, et al. Cohort Profile: The INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol*. 2012; 41:930-940.
194. INMA – Infancia y Medio Ambiente <http://www.proyectoinma.org/>

ANEXOS

XI. ANEXOS

1. Participación en otras publicaciones

- 1.1. Publicación 6:** Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk
- 1.2. Publicación 7:** Consumption of olive oil affects the phenolic content and fatty acid profile of human high-density lipoproteins.

Publicación 6

Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk

.....

Efectos de 1 año de intervención con la dieta Mediterránea sobre la composición de ácidos grasos y el síndrome metabólico en una población de alto riesgo cardiovascular

Autores: Jordi Mayneris-Perxachs, Aleix Sala-Vila, Maribel Chisaguano, Ana I. Castellote, Ramón Estruch, María Isabel Covas, Montserrat Fitó, Jordi Salas-Salvadó, Miguel A. Martínez-González, Rosa Lamuela-Raventós, Emilio Ros y M. Carmen López-Sabater, Investigadores del estudio PREDIMED

Revista: *PLOS ONE*

Año: 2014

Volumen: 9

Páginas: e85202

.....

Effects of 1-Year Intervention with a Mediterranean Diet on Plasma Fatty Acid Composition and Metabolic Syndrome in a Population at High Cardiovascular Risk

Jordi Mayneris-Perxachs^{1,9}, Aleix Sala-Vila^{2,7,9}, Maribel Chisaguano^{1,7}, Ana I. Castellote^{1,7}, Ramón Estruch^{3,7}, María Isabel Covas^{4,7}, Montserrat Fitó^{4,7}, Jordi Salas-Salvadó^{5,7}, Miguel A. Martínez-González^{6,7}, Rosa Lamuela-Raventós^{1,7}, Emilio Ros^{2,7}, M. Carmen López-Sabater^{1,7*}, for PREDIMED Study Investigators[†]

1 Department of Nutrition and Food Science-XARTA-INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service, Biomedical Research Institute August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain, **3** Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, **4** Cardiovascular Epidemiology Unit, Municipal Institut for Medical Research, Barcelona, Spain, **5** Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine, IISPV, University Rovira i Virgili, Reus, Spain, **6** Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain, **7** Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Madrid, Spain

Abstract

Background & Aims: Metabolic syndrome (MetS) has become an important public concern due to its increasing prevalence. An altered fatty acid composition has been associated with MetS, but the Mediterranean diet has been shown to have a protective effect. The aim of the present study was to analyze the influence of a Mediterranean dietary pattern, as assessed by the biomarkers of food supplied, on the plasma fatty acid composition and its relation with MetS after 1 year of intervention.

Methods: A total of 424 subjects were randomly selected from the PREDIMED randomized dietary trial after completing a 1-year intervention program. Participants aged 55 to 80 years and at high risk of cardiovascular disease were randomly assigned to three dietary interventions: Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts, or a low-fat diet.

Results: After 1 year of intervention participants in the virgin olive oil group showed significantly increased plasma concentrations of palmitic and oleic acids, but reduced proportions of margaric, stearic, and linoleic acids. In turn, subjects in the nut group showed significantly increased levels of palmitic, linoleic, and α -linolenic acids, but reduced proportions of myristic, margaric, palmitoleic, and dihomo- γ -linoleic acids. Increases in the biomarkers of foods supplied to the Mediterranean diet groups, i.e., oleic and α -linolenic acids, were beneficially associated with the incidence, reversion and prevalence of MetS. No weight changes were observed among participants.

Conclusions: The nut and olive oil diets induced a fatty acid composition that has been shown to be beneficial in the face of MetS. Therefore, a Mediterranean diet rich in fats of vegetable origin may be a useful tool for the management of MetS without the need for concerns over weight gain due to its high fat content.

Trial Registration: Controlled-Trials.com ISRCTN35739639

Citation: Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, Castellote AI, Estruch R, et al. (2014) Effects of 1-Year Intervention with a Mediterranean Diet on Plasma Fatty Acid Composition and Metabolic Syndrome in a Population at High Cardiovascular Risk. PLoS ONE 9(3): e85202. doi:10.1371/journal.pone.0085202

Editor: Stephen L. Atkin, Postgraduate Medical Institute & Hull York Medical School, University of Hull, United Kingdom

Received: May 31, 2013; **Accepted:** November 22, 2013; **Published:** March 20, 2014

Copyright: © 2014 Mayneris-Perxachs et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by national grants from the "Ministerio de Ciencia e Innovación" (AGL2008-04124 and AGL2009-09730). CIBEROBN, CIBERESP and RETIC Alimentación Saludable are initiative from the ISCIII, Government of Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mclopez@ub.edu

† These authors contributed equally to this work.

†† Membership of the PREDIMED Study Investigators are provided in the Acknowledgments.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is defined as a clustering of interrelated metabolic risk factors that include dyslipidemia, hypertension, elevated fasting glucose and abdominal obesity [1]. The condition is widespread among adults from developed

countries, with a prevalence of about 20 to 30%, or even higher, and with further increases in prevalence predicted due to the increasing incidence of obesity, diabetes and sedentary lifestyles [2,3]. As people with MetS are at increased risk of developing both cardiovascular disease (CVD) [4] and type 2 diabetes [5], it has become an important public health concern and several organi-

zations have attempted to formulate simple criteria for its diagnosis [3].

According to current guidelines, the first step in the management of MetS should emphasize therapeutic lifestyle modifications [6]. Although there is general agreement about reducing weight and increasing physical activity, a uniform consensus is lacking as to which diet is optimal [7]. However, epidemiological evidence suggests that individuals with MetS should adhere to a diet low in saturated and *trans* fats, cholesterol, sodium, and simple sugars, with an increased intake of fruits, vegetables, fish, and whole grains [6,7]. Interestingly, these features resemble the principles of the traditional Mediterranean diet (MD) [8].

During the last few decades the MD has gained in popularity worldwide due to its reported contribution to lower rates of morbidity (particularly CVD, certain types of cancer, and other chronic conditions) and mortality, and the better health and quality of life of those who adhere to it [8]. Only a few cross-sectional, cohort and intervention studies have analyzed the relationship between MD adherence and the prevalence or incidence of MetS. However, the results from these studies have provided some evidence of the beneficial role of the MD in MetS and its components [9].

Although the dietary guidelines suggested for people presenting with MetS are similar to those of the MD and other healthy dietary patterns, the MD has a peculiarity of its own: a high content of total fat. This is the most distinguishing feature of the MD, with virgin olive oil (VOO) being the primary source of fat (providing 70–80% of the total fat). Unlike other oils however, the health-giving properties of VOO are derived not solely from its MUFA content (70–80% due to oleic acid), but also from minor components with great biological activity, including squalene, sterols, tocopherol, and highly bioavailable phenolic compounds [10]. Due to this double set of benefits, VOO favors a better lipid profile, reduces blood pressure (BP) levels, endothelial dysfunction, and the inflammatory and prothrombotic environment [11].

Tree nuts that have a unique fatty acid (FA) profile characterized by a high (MUFA+PUFA)/SFA ratio are also typical of the MD pattern. Although only some epidemiological studies have reported the possible benefits of nut consumption for type 2 diabetes and some cancers, their results have been remarkably consistent regarding CVD [12]. Apart from their favorable lipid profile, nuts contain vegetable proteins, L-arginine, fiber, folic acid, magnesium, copper, and different types of antioxidants such as flavonoids, polyphenols and tocopherols, which contribute to the cardioprotective properties of nuts via several mechanisms [13].

Compliance with a diet is often assessed using dietary surveys, which are associated with substantial measurement errors, whereas biomarkers of intake are potentially independent of these errors [14]. Therefore, an objective and accurate way to monitor fat quality is to record the plasma FA composition [14]. Individual plasma FA are generally expressed as a percentage of total FA. Therefore, changes in one FA may affect the levels of several other FA. Hence, considering the overall pattern of plasma FA may be a more useful measure of dietary quality than individual FA.

There is increasing evidence that the plasma FA composition may be influenced by diet [15–18] which may be useful for primary prevention, since an altered FA composition has been associated in several cross-sectional and observational studies with insulin resistance and diabetes [18,19], obesity [20], CVD [21], and MetS [22]. However, studies assessing the effect that changes in the diet have on the FA profile and their relation with MetS remain scarce. Therefore, within the framework of a randomized controlled trial designed to compare the effects of two MD, one

supplemented with VOO and another supplemented with nuts, with those of a low-fat diet on the cardiovascular outcomes among subjects at high risk of CVD (PREDIMED Study) [23,24], the aim of this study was to analyze the effect of these diets on the plasma FA profile and its relation with MetS status after 1 year of intervention in participants recruited in the Barcelona north, Reus, and Pamplona centers.

Methods

Study design

The PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea) study is a large, parallel-group, multicenter, randomized, controlled, 5-year clinical trial aimed at assessing the effects of the Mediterranean diet on the primary prevention of cardiovascular disease. The main outcome is an aggregate of cardiovascular events (cardiovascular death, nonfatal myocardial infarction, or nonfatal stroke). The trial was registered with Current Controlled Trials, London (Identifier: ISRCTN35739639). The detailed protocol of the study has been published elsewhere [23,24]. The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Checklist S1 and Protocol S1, S2 and S3. The trial is currently ongoing with 7447 participants at high risk of CVD assigned randomly to three intervention groups: Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil (MD+VOO), Mediterranean diet supplemented with mixed nuts (MD+nuts), or low-fat diet (Control). The present substudy was designed to assess the effects of the dietary interventions on the plasma FA profile and MetS status, two of the secondary outcomes of the PREDIMED study. We report, the results after 1 year's intervention in a subset of participants recruited in three centers of the PREDIMED trial (Barcelona North, Reus, and Pamplona).

Ethics statement

The Institutional Review Board of the ten participating recruitment centers of the PREDIMED trial approved the study protocol and the participants signed an informed consent. In particular, the current substudy was approved by the Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Sant Joan, Reus (Tarragona), the Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, Pamplona (Navarra) and the Comitè d'Ètica e Investigació de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona (Barcelona).

Participants

Eligible participants for the PREDIMED Study were community-dwelling men, aged 55 to 80 years, and women, aged 60 to 80 years, who met at least one of the two following criteria: diagnosis of type 2 diabetes or presence of three or more CVD risk factors (smoking, hypertension, dyslipidemia, overweight or obesity, and family history of premature coronary heart disease (CHD)) [24]. For the present study, 2054 participants were recruited between June 2003 and May 2006 in the Barcelona (n=320), Reus (n=678) and Navarra (n=1056) centers, three of the ten recruitment nodes of the PREDIMED trial. After a screening visit, participants were randomly assigned to one of three diet groups by means of a computer-generated random-number sequence. The plasma FA composition was measured in 22% of the participants who entered this substudy at baseline (n=450). These participants were selected at random, and matched by age and sex. However, as some participants were lost during follow-up (Figure 1), the final number of participants studied was 424.

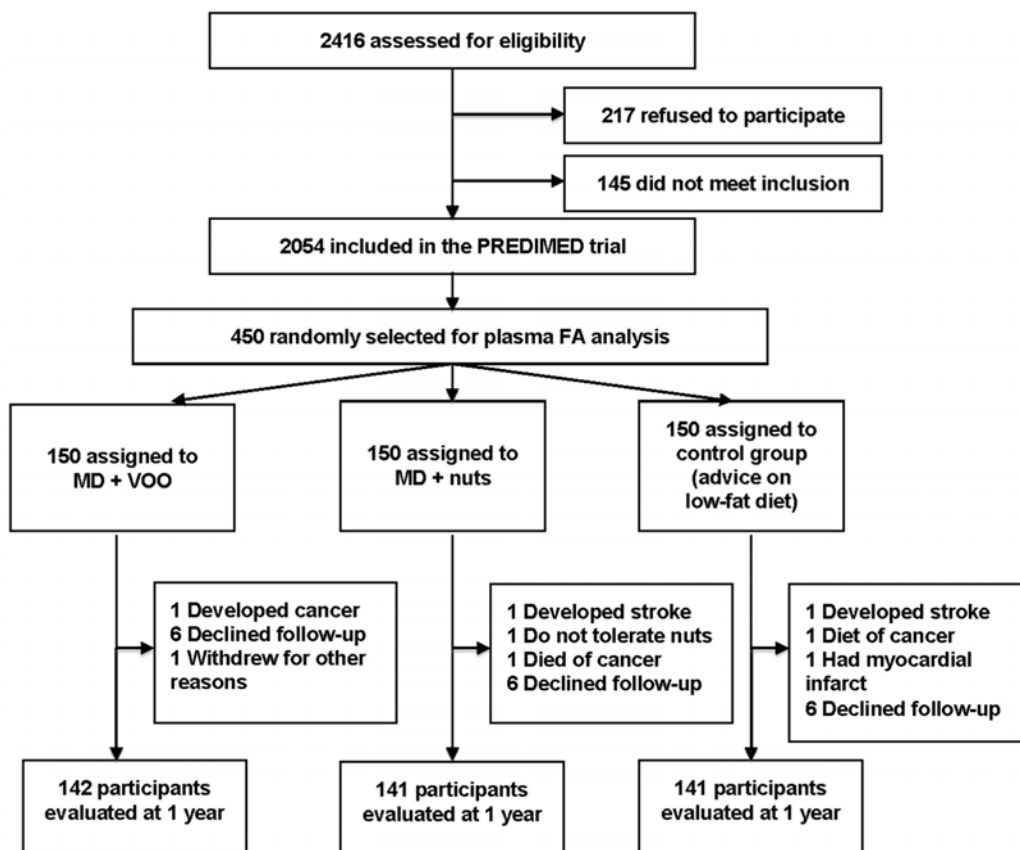


Figure 1. Trial flow-chart. Flow of patients through the present study involving three recruitment centres of the PREDIMED trial (Barcelona North, Reus, and Pamplona). FA indicates fatty acid; MD, Mediterranean diet; VOO, virgin olive oil.
doi:10.1371/journal.pone.0085202.g001

Interventions

Participants randomized to each of the three interventions had a face-to-face interview with the dietitian plus a group session. The same dietitian delivered the interventions to the three groups in each center. In the individual session, and based on the individuals' adherence to the MD or to the low-fat diet according to a 14-point score and 9-point score questionnaire, respectively, each participant received personal recommendations for changes to be introduced to their diet in order to achieve the goals of the assigned intervention group during a 30-min session. Positive recommendations for increasing the consumption of vegetables, fruits, legumes, fish and seafood, and white meats, were given to each group. Negative recommendations included limiting the consumption of red and processed meats, fat-rich dairy products, sweets and pastries, snacks and sweetened beverages. However, recommendations for total fat intake differed between the two MD groups and the low-fat diet groups. Therefore, whereas participants in the low-fat group were advised to reduce all types of fat, recommendations for the MD groups included increasing the intake of vegetable fats and oil. No energy restrictions were suggested for any of the intervention groups. Group sessions (up to 20 participants) were organized separately for each of the three intervention groups. The dietitian provided informative talks and written material, with descriptions of target foods, seasonal shopping lists, meal plans, and recipes. Participants in the MD groups were given a free 3-month supply of VOO (1 L/wk) or mixed nuts (30 g/d, as 15 g walnuts, 7.5 g hazelnuts and 7.5 g

almonds). The individual and group visits were repeated every 3 months with the same content, with the exception that shopping lists and recipes varied with the season of the year. All participants had free and continuous access to their center's dietitian throughout the study.

Measurements

At baseline participants were administered several questionnaires [23,24]: (a) a 14-item questionnaire assessing the degree of adherence to the MD (values of 0 to 1 were assigned to each item, so that a score of 14 points meant the maximum adherence); this was an extension of a previously validated questionnaire; (b) a general 47-item questionnaire about education, lifestyle, medical conditions, and medication use; (c) a 137-item food frequency questionnaire (FFQ) adapted from a previously validated FFQ; and (d) a validated Spanish version of the Minnesota Leisure-Time Physical Activity Questionnaire. Moreover, participants underwent anthropometric and BP measurements and collection of fasting blood samples. All examinations were repeated at 1 year, with the exception of the general questionnaire, which was substituted by a follow-up questionnaire.

Anthropometry

The anthropometric measures used in this study were height (m), weight (kg), body mass index (BMI, calculated as weight in kg/height² in m²) and waist circumference (WC). Height and weight (with light clothing and no shoes) were recorded using a

calibrated balance beam scale and a wall-mounted calibrated stadiometer, respectively. Waist circumference was measured using an anthropometric measuring tape, at a horizontal plane midway between the lowest rib and the iliac crest. Blood pressure was measured in triplicate with a validated semi-automatic sphygmomanometer after a minimum of 5 min rest in the seated position.

Laboratory measurements

Blood samples were collected after an overnight fast, coded, shipped to a central laboratory, and stored at -80°C until analyses. Laboratory technicians were blinded to the intervention. Plasma glucose level was analyzed using the glucose-oxidase method; total serum cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels were measured using enzymatic procedures; and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level was determined after precipitation with phosphotungstic acid and magnesium chloride [24]. The plasma FA profile was determined by fast gas chromatography with a previous derivatization to their corresponding fatty acid methyl esters [25]. Results were expressed as relative percentages of total FA. The average of two measures was used for the analysis of laboratory variables both at baseline and 1 year.

Metabolic syndrome definition

The recent definition of MetS proposed by six major organizations and societies (IDF, NHLBI, AHA, WHF, IAC, and IASO) [1] was used in the present study, such that the presence of any three of the five following risk factors constitutes a diagnosis of MetS: elevated WC, elevated TG (≥ 150 mg/dL), reduced HDL-C (< 40 mg/dL in men and < 50 mg/dL in women), elevated BP (SBP ≥ 130 mmHg and/or DBP ≥ 85 mmHg), and elevated fasting glucose (≥ 100 mg/dL). Drug treatment for these specific conditions is an alternative indicator. In this definition, it is possible to use either the IDF or the AHA/NHLBI cut-off limits for WC (≥ 94 cm for men and ≥ 80 cm for women, or > 102 cm for men and > 88 cm for women, respectively) in European populations. The latter was used in the present study.

Statistical analysis

All values are presented as mean \pm SD, unless otherwise indicated. Kolmogorov-Smirnov tests were carried out to check variable distribution. Since the statistical distribution of plasma FA concentrations was found to be skewed, geometric means were used to describe FA concentrations. Moreover, FA concentrations were log-transformed for analysis to improve normality. Analysis of variance (ANOVA) and the χ^2 test were used to determine differences in baseline characteristics in individuals with and without MetS for continuous and categorical variables, respectively. Besides the assignment to one MD group, participants were divided into four MetS groups: those who did not change their MetS status after the 1-year intervention (always/never) and those whose status changed (reversion/incidence). Within- and between-group changes in plasma FA concentrations were examined with paired *t* tests and ANOVA followed by the Duncan test, respectively. The relationship between these changes and 1-year changes in metabolic risk factors was determined by partial correlation analysis controlling for gender, age, smoking status, occupation, educational level, baseline energy intake, 1-year changes in energy intake, and medication for hypercholesterolemia, BP, and diabetes. To examine the associations between these changes and the incidence and reversion of MetS, participants were categorized by quartiles of 1-year changes in

plasma concentrations of FA. Then, a logistic regression analysis was carried out to calculate the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) of the incidence and reversion of MetS according to these quartiles. Finally, we used McNemar's test and logistic regression models to assess within- and between-quartile changes in the prevalence of MetS. All logistic regression models were adjusted for potential confounding factors (age, gender, baseline MetS status, baseline overweight/obesity, and 1-year changes in BMI), and the lowest quartile was used as the reference. For all analyses, two-sided significance was determined at $p < 0.05$. Analyses were performed using SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The baseline characteristics of the 424 participants (175 men and 249 women) that completed the intervention program at 1 year are detailed in Table 1 according to their MetS status. By design, participants were mostly overweight subjects with an elevated number of CVD risk factors. Of the total population, 92.7%, 84.2%, 68.4%, and 45.8% were overweight or obese, hypertensive, dyslipidemic, or had type II diabetes, respectively. The prevalence of MetS in the study population was 67.7%, whereas that of its components was 96.0%, 64.6%, 63.8%, 58.5%, and 55.7%, for elevated BP, WC, fasting glucose, TG, and reduced HDL-C, respectively. As expected, most of the characteristics associated with MetS were significantly higher among those who presented with this condition.

Table 2 shows the baseline plasma FA profile and 1-year changes according to the intervention group. Participants in the MD+VOO group showed significantly increased plasma concentrations of palmitic acid (PA, C16:0) and oleic acid (OA, C18:1*n*-9) but significantly reduced proportions of margaric acid (MGA, C17:0), stearic acid (SA, C18:0), and linoleic acid (LA, C18:2*n*-6). In contrast, subjects in the MD+nuts group showed a significant increase in the levels of PA, LA, and α -linolenic acid (ALA, C18:3*n*-3), but significantly reduced proportions of myristic acid (MA, C14:0), MGA, palmitoleic acid (POA, C16:1*n*-7), and dihomo- γ -linoleic acid (DGLA, C20:3*n*-6). Finally, those in the control group only showed a significant increase in the plasma levels of PA with a reduction in MGA and ALA after 1 year of intervention. Between-group differences were only significant for some MUFA (OA) and PUFA (LA, DGLA, and ALA).

The baseline plasma FA profile and 1-year changes according to the 1-year change in MetS status are shown in Table 3. Participants who never had MetS showed significantly higher proportions of PA, OA, and ALA, but reduced proportions of DGLA after 1 year of intervention. In turn, participants in the MetS reversion group showed significantly increased plasma levels of OA and ALA, whereas those in the MetS incidence group showed significantly increased plasma concentrations of MA and PA, but presented a reduction in the levels of MGA and ALA. Finally, participants that always had MetS during the intervention showed a significant increase in the proportions of PA and OA with a significant reduction in the plasma concentrations of MGA and SA. Between-group changes in FA concentrations were significantly different only in the case of OA.

After 1 year of intervention, changes in several specific FA were related to changes in various metabolic risk factors (Table 4). When significant, changes in most SFA and POA were adversely associated with changes in metabolic risk factors, whereas changes in most PUFA were associated in a beneficial way. In addition, we also calculated partial correlation coefficients to look for possible relationships between food groups and plasma FA composition.

Table 1. Baseline characteristics of participants completing 1-year intervention.^A

Characteristics	No MetS (n= 137)	MetS (n= 287)	p ^B
Age (years)	67.5±6.1	67.7±5.8	0.833
Men (%)	52.6	35.9	0.001
Weight (kg)	71.5±9.8	75.5±10.4	<0.001
BMI (kg/m ²)	27.9±3.0	30.0±3.1	<0.001
Overweight or obese (%) ^C	86.1	95.8	<0.001
Hypertension (%) ^D	84.7	84.0	0.854
Dyslipidemia (%) ^E	56.9	73.9	<0.001
Type 2 diabetes mellitus (%)	33.6	51.6	0.001
Family history of premature CHD (%) ^F	21.9	19.5	0.805
Current smoker (%)	18.2	12.5	0.118
MetS components (%) ^G			
Elevated WC	29.9	81.2	<0.001
Elevated TG	21.2	76.3	<0.001
Reduced HDL-C	19.7	72.8	<0.001
Elevated BP	90.5	98.6	<0.001
Elevated fasting glucose	36.5	76.9	<0.001
Medications (%)			
Aspirin or antiplatelet drugs	21.2	24.4	0.593
Antihypertensive agents	67.9	75.3	0.110
Hypolipidemic agents	19.0	56.4	<0.001
Insulin	6.6	6.3	0.783
Hypoglycemic agents	16.8	34.8	<0.001
Occupation (%)			
Worker	16.1	10.2	0.078
Unemployed or unfit	24.1	31.2	0.141
Retired	59.9	58.6	0.745
Education level (%)			
None	2.2	4.6	0.237
Primary school	64.4	72.3	0.116
Secondary school	25.9	15.6	0.012
University	7.4	7.4	0.995

MetS, Metabolic Syndrome; BMI, body mass index; CHD, coronary heart disease; WC, waist circumference; TG, triglycerides; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; BP, blood pressure.

^AValues are expressed as mean ± SD or percentage of participants.

^Bp value for comparison between groups calculated by one-factor ANOVA for continuous variables or χ^2 test for categorical variables.

^CBMI ≥ 25 kg/m².

^DSystolic BP ≥ 140 mmHg or diastolic BP ≥ 90 mmHg or antihypertensive medication.

^ELDL cholesterol ≥ 160 mg/dL or lipid-lowering therapy; HDL cholesterol ≤ 40 mg/dL in men or ≤ 50 mg/dL in women.

^FDefinite myocardial infarction or sudden death before 55 years in male first-degree relatives or before 65 years in female first-degree relatives.

^GThe metabolic syndrome components are defined according to the IDF, NHLBI, AHA, WHF, IAC, and IASO recent criteria.

doi:10.1371/journal.pone.0085202.t001

Since plasma concentrations of OA, LA, and ALA are good biomarkers of olive oil, seed oil, and walnut consumption, the 1-year changes reported indicate good adherence to the food supplied. The increase in plasma levels of OA and ALA in the MD+VOO and MD+nuts groups indicates good adherence to OO and nuts, respectively, whereas the decrease in the concentration of LA and the clear inverse relation found between OO consumption and *n*-6 PUFA levels suggests that people in the MD+VOO group replaced seed oils with VOO.

In logistic regression analyses, higher changes in the proportions of MA and PA were related to an increased incidence of MetS (*p* between quartiles = 0.037 and 0.046, respectively), with

an OR (95% CI) for the 1st, 2nd, 3rd, and 4th quartiles of changes of 1.00, 1.90 (0.44, 8.11), 2.70 (0.65, 11.24), and 6.43 (1.53, 27.03), and 1.00, 2.17 (0.46, 10.3), 4.06 (0.96, 21.20), and 8.65 (1.79, 41.78), respectively. On the other hand, both biomarkers of the foods supplied, OA and ALA, were found to be protective against MetS. Hence, changes in OA and ALA concentrations were inversely associated with the incidence of MetS (*p* between quartiles = 0.035 and 0.032, respectively) and showed a stronger direct relation with MetS reversion (*p* between quartiles = 0.005 and 0.020, respectively) (Figure 2). No other significant associations were found between changes in the levels of the remaining FA and the incidence or reversion of MetS. Finally, changes in the

Table 2. Plasma fatty acid levels at baseline and 1-year changes according to the intervention groups.^A

Fatty acid	MD+VOO (n=142)	p ^B	MD+Nuts (n=141)	p ^B	Control (n=141)	p ^B	p ^C
SFA							
MA (C14:0)							
Baseline	0.57±0.27		0.63±0.31		0.62±0.27		
Change	0.012 ^a ±0.28	0.573	-0.060 ^b ±0.33	0.008	-0.0087 ^{a,b} ±0.33	0.714	0.067
PA (C16:0)							
Baseline	21.55±2.20		21.37±2.06		21.96±2.45		
Change	0.51±2.00	0.002	0.37±1.98	0.024	0.67±2.57	0.001	0.517
MGA (C17:0)							
Baseline	0.27±0.34		0.30±0.35		0.28±0.33		
Change	-0.030±0.34	0.034	-0.037±0.42	0.048	-0.031±0.38	0.036	0.981
SA (C18:0)							
Baseline	6.76±1.16		6.90±1.09		6.74±1.26		
Change	-0.25±1.23	0.005	-0.15±1.20	0.101	-0.055±1.46	0.604	0.325
MUFA							
POA (C16:1n-7)							
Baseline	1.35±0.69		1.33±0.57		1.36±0.59		
Change	-0.012±0.49	0.766	-0.093±0.55	0.033	-0.034±0.58	0.410	0.221
OA (C18:1n-9)							
Baseline	25.29±4.45		26.42±3.98		26.75±4.48		
Change	2.62 ^a ±3.42	<0.001	-0.061 ^b ±3.34	0.830	-0.24 ^b ±4.40	0.520	<0.001
PUFA							
Series n-6 FA							
LA (C18:2n-6)							
Baseline	29.47±5.42		28.09±4.72		28.00±4.98		
Change	-1.94 ^a ±4.26	<0.001	1.81 ^b ±3.92	<0.001	0.82 ^b ±5.89	0.086	<0.001
GLA (C18:3n-6)							
Baseline	0.39±0.18		0.40±0.20		0.41±0.18		
Change	0.013±0.20	0.536	-0.0027±0.15	0.841	0.019±0.20	0.264	0.667
DGLA (C20:3n-6)							
Baseline	1.50±0.35		1.50±0.36		1.48±0.34		
Change	-0.040 ^{a,b} ±0.32	0.132	-0.077 ^a ±0.24	<0.001	0.030 ^b ±0.37	0.294	0.010
AA (C20:4n-6)							
Baseline	6.75±1.74		6.72±1.63		6.64±1.75		
Change	-0.22±1.23	0.057	-0.080±1.21	0.408	0.081±1.59	0.536	0.160
Series n-3 FA							
ALA (C18:3n-3)							
Baseline	0.33±0.16		0.32±0.12		0.33±0.15		
Change	-0.021 ^a ±0.18	0.101	0.15 ^b ±0.19	<0.001	-0.032 ^a ±0.19	0.020	0.028
EPA (C20:5n-3)							
Baseline	0.74±0.82		0.73±0.54		0.71±0.65		
Change	0.055 ^a ±0.78	0.196	0.084 ^a ±0.60	0.062	-0.065 ^b ±0.67	0.067	0.060
DHA (C22:6n-3)							
Baseline	2.51±0.95		2.48±0.81		2.43±0.69		
Change	0.012 ^{a,b} ±1.25	0.899	-0.081 ^a ±0.83	0.215	0.18 ^b ±1.07	0.068	0.073

MetS, Metabolic Syndrome; MA, myristic acid; PA, palmitic acid; MGA, margaric acid; SA, stearic acid; POA, palmitoleic acid; OA, oleic acid; LA, linoleic acid; GLA, γ -linolenic acid; DGLA, dihommo- γ -linoleic acid; AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

Values in the same row (Change) with different superscript letters (a,b) are significantly different ($p<0.05$ by Duncan test).

^AValues are expressed as geometric mean (% of total fatty acids) \pm SD.

^B p for within-group differences from baseline by paired t test.

^C p for between-group differences from baseline by one-factor ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0085202.t002

Table 3. Plasma fatty acid levels at baseline and 1-year changes according to the 1-year change in the MetS status.^A

Fatty acid	Never (n=97)	p ^B	Reversion (n=44)	p ^B	Incidence (n=40)	p ^B	Always (n=243)	p ^B	p ^C
SFA									
MA (C14:0)									
Baseline	0.53±0.21		0.58±0.31		0.56±0.26		0.65±0.30		
Change	-0.012 ^a ±0.22	0.552	-0.048 ^a ±0.34	0.212	0.089 ^b ±0.30	0.024	-0.034 ^a ±0.34	0.085	0.057
PA (C16:0)									
Baseline	20.70±1.86		21.77±2.66		21.49±2.24		22.00±2.22		
Change	0.58 ^{a,b} ±2.06	0.003	0.16 ^a ±2.65	0.666	0.98 ^b ±1.81	0.001	0.47 ^{a,b} ±2.22	0.001	0.314
MGA (C17:0)									
Baseline	0.27±0.28		0.26±0.31		0.30±0.34		0.29±0.36		
Change	-0.021±0.26	0.224	-0.039±0.32	0.088	-0.072±0.36	0.007	-0.029±0.44	0.028	0.428
SA (C18:0)									
Baseline	6.83±1.24		6.83±0.96		6.73±0.79		6.79±1.23		
Change	-0.073±1.40	0.535	-0.25±1.01	0.087	-0.19±0.80	0.136	-0.16±1.37	0.036	0.837
MUFA									
POA (C16:1n-7)									
Baseline	1.18±0.69		1.35±0.60		1.31±0.58		1.43±0.59		
Change	-0.067±0.51	0.147	-0.067±0.51	0.317	-0.00029±0.45	0.997	-0.034±0.57	0.296	0.783
OA (C18:1n-9)									
Baseline	24.96±4.02		25.16±4.82		26.31±4.20		26.79±4.29		
Change	1.12 ^{a,b} ±3.71	0.003	2.09 ^b ±4.32	0.003	-0.72 ^c ±3.49	0.219	0.63 ^{a,c} ±3.97	0.014	0.007
PUFA									
Series n-6 FA									
LA (C18:2n-6)									
Baseline	29.79±4.65		28.47±5.42		29.86±3.69		27.82±5.30		
Change	0.78±4.46	0.088	1.14±6.30	0.215	-0.31±3.51	0.582	-0.064±5.19	0.844	0.290
GLA (C18:3n-6)									
Baseline	0.39±0.18		0.41±0.14		0.40±0.22		0.40±0.19		
Change	-0.018±0.16	0.306	0.0078±0.19	0.726	0.014±0.20	0.643	0.021±0.19	0.145	0.437
DGLA (C20:3n-6)									
Baseline	1.48±0.34		1.48±0.36		1.53±0.36		1.49±0.35		
Change	-0.076±0.30	0.010	0.048±0.42	0.410	-0.044±0.30	0.306	-0.022±0.30	0.253	0.134
AA (C20:4n-6)									
Baseline	6.98±1.64		6.52±1.59		6.74±1.71		6.62±1.75		
Change	-0.24 ^a ±1.27	0.056	0.38 ^b ±1.21	0.050	-0.35 ^a ±1.31	0.063	-0.044 ^{a,b} ±1.41	0.622	0.036
Series n-3 FA									
ALA (C18:3n-3)									
Baseline	0.32±0.14		0.29±0.15		0.35±0.14		0.33±0.15		
Change	0.041 ^a ±0.20	0.010	0.087 ^a ±0.23	0.008	-0.061 ^b ±0.19	0.025	0.021 ^a ±0.21	0.052	0.009
EPA (C20:5n-3)									
Baseline	0.84±0.66		0.75±0.80		0.63±0.34		0.70±0.71		
Change	0.036±0.73	0.484	0.027±0.96	0.757	0.002±0.41	0.969	0.018±0.66	0.506	0.988
DHA (C22:6 n-3)									
Baseline	2.61±0.81		2.58±0.93		2.35±0.59		2.42±0.64		
Change	0.019±1.06	0.844	0.054±1.08	0.717	0.11±0.97	0.400	0.024±1.09	0.703	0.953

MetS, Metabolic Syndrome; MA, myristic acid; PA, palmitic acid; MGA, margaric acid; SA, stearic acid; POA, palmtoleic acid; OA, oleic acid; LA, linoleic acid; GLA, γ -linolenic acid; DGLA, dihommo- γ -linoleic acid; AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

Values in the same row (Change) with different superscript letters (a,b) are significantly different ($p < 0.05$ by Duncan test).

^AValues are expressed as geometric mean (% of total fatty acids) \pm SD.

^B p for within-group differences from baseline by paired t test.

^C p for between-group differences from baseline by one-factor ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0085202.t003

Table 4. Partial correlation coefficients between 1-year changes in plasma fatty acids and 1-year changes in metabolic risk factors ($n = 424$) and between food groups and plasma fatty acids.^A

Fatty acid	WC	BMI	TC	HDL-C ^B	LDL-C	TG ^B	SBP	DBP	glucose	Food groups
SFA										
MA (C14:0)	0.02	0.00	0.13*	0.01	0.10*	0.10*	0.06	0.03	0.06	cheese (0.10*)
PA (C16:0)	0.00	0.01	0.09	-0.01	0.02	0.17*	0.06	-0.01	0.07	
MGA (C17:0)	-0.06	-0.01	0.04	-0.12*	0.10	-0.04	-0.07	-0.09	-0.03	milk (0.11*)
SA (C18:0)	0.06	-0.02	-0.02	0.01	0.03	-0.13*	-0.06	-0.03	0.00	
MUFA										
POA (C16:1n-7)	0.03	0.14**	0.06	-0.02	0.00	0.21***	0.00	0.02	0.06	
OA (C18:1n-9)	-0.02	0.09	-0.03	0.02	-0.07	0.03	0.03	-0.03	-0.03	OO (0.17***), seed oils (-0.18***)
PUFA										
Series n-6										
LA (c18:2n-6)	-0.03	-0.06	0.04	0.02	0.07	-0.20**	-0.02	0.02	0.01	OO (-0.19***), seed oils (0.19***), total nuts (0.11*)
GLA (C18:3n-6)	-0.01	-0.02	0.05	-0.08	0.05	0.08	-0.04	0.03	0.01	
DGLA (C20:3n-6)	-0.08	0.05	0.01	0.03	0.04	-0.08	0.01	0.03	-0.14**	
AA (C20:4n-6)	-0.05	-0.04	-0.19**	0.02	-0.08	-0.32***	-0.08	-0.11*	-0.18***	
Series n-3										
ALA (C18:3n-3)	-0.12*	-0.09	0.05	0.07	0.07	-0.05	-0.06	0.04	-0.07	total nuts (0.10*), walnuts (0.17***)
EPA (C20:5n-3)	-0.07	-0.04	0.11*	0.10*	0.13*	-0.09	0.09	0.03	0.02	white fish (0.17***), blue fish (0.29***)
DHA (C22:6n-3)	0.02	-0.09	-0.05	-0.04	0.01	-0.13*	-0.05	-0.01	-0.02	white fish (0.15***), blue fish (0.25***)

WC, waist circumference; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MA, myristic acid; PA, palmitic acid; MGA, margaric acid; SA, stearic acid; POA, palmitoleic acid; OA, oleic acid; LA, linoleic acid; GLA, γ -linolenic acid; DGLA, dihomo- γ -linolenic acid; AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; OO, olive oil.

* $p < 0.05$,

** $p < 0.01$,

*** $p < 0.001$.

^AAdjusted for sex, age, smoking status, occupation, educational level, baseline energy intake, 1-year changes in energy intake, and medication for hypercholesterolemia, blood pressure, and diabetes.

^BLog-transformed for normality.

doi:10.1371/journal.pone.0085202.t004

prevalence of MetS according to the quartiles of change in OA and ALA were 10.4%, 5.7%, -5.7%, and -12.3% (p between quartiles = 0.002), and 10.4%, 4.7%, -9.4%, and -9.4% (p between quartiles = 0.002), respectively. Moreover, no significant weight changes were observed across the quartiles of changes in OA and ALA (p between quartiles = 0.931 and 0.745, respectively).

Discussion

To our knowledge, the present study is the first randomized controlled trial to have assessed the effect of a Mediterranean dietary pattern on the overall plasma FA profile of individuals at high risk of CVD and its relation with MetS. Our results show a robust association between two MD and changes in the FA composition after 1 year of intervention.

Participants in the MD+VOO group showed reduced plasma levels of MGA, SA, and LA but increased levels of PA and OA. The findings in the MD+VOO group (40% and 20.5% of energy from fats and MUFA, respectively) are consistent with those of other intervention studies using MUFA-enriched diets high in fat content and with a similar nutrient composition [26,27]. This is important

since total fat intake modifies the plasma FA composition [28]. In both studies, people receiving a MUFA diet (40%/20% and 39%/20.3% of energy from fats/MUFA, respectively) showed increased levels of PA and decreased levels of SA, although these changes were only significant in the former study; POA levels did not change significantly. In addition, the LA concentrations were significantly reduced with an increase in OA due to supplementation. In turn, the MD+nuts group showed reduced concentrations of MA, MGA, POA, and DGLA, while increasing the levels of LA and ALA. These results are consistent with a recent controlled dietary intervention that reported significantly lower serum proportions of PA, SA, POA, and DGLA, but significantly higher proportions of LA and ALA in slightly overweight and hyperlipidemic healthy subjects that consumed a rapeseed oil-based diet rich in MUFA and PUFA (particularly OA, LA, and ALA) compared to a diet high in saturated fat [15]. Interestingly, the MD+nuts group diet induced a FA composition that was beneficial in the face of cardiometabolic disease, since high proportions of PA, POA, and DGLA, and reduced levels of LA have been related to several cardiometabolic diseases [18–21], including MetS [22]. Consistently, we also found

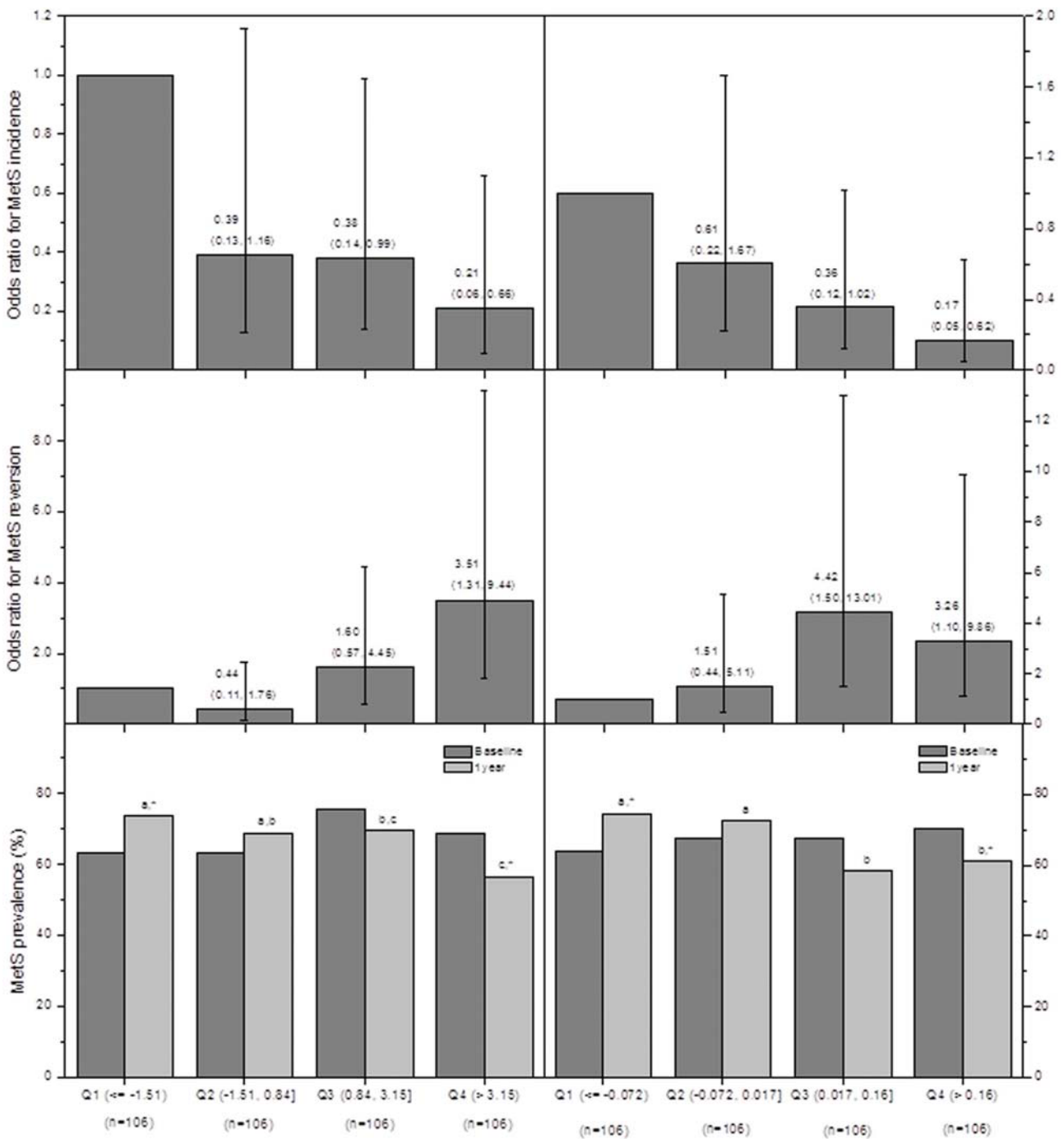


Figure 2. Odds ratios (95% confidence intervals) of 1-year MetS incidence and reversion, and MetS prevalence. Odds ratios at baseline and 1 year by quartiles of 1-year changes in plasma levels of oleic and α -linolenic acids are shown in the left and right panels, respectively. The lowest quartile was chosen as the reference for the odds ratio calculations. Different superscript letters indicate significantly different 1-year prevalence changes between quartiles ($p < 0.05$ by logistic regression model), while an * indicates a significant 1-year prevalence change within each quartile ($p < 0.05$ by McNemar's test). doi:10.1371/journal.pone.0085202.g002

that increases in individual SFA and POA correlated adversely with several metabolic risk factors.

We also examined the association between the adherence to a MD and the incidence, reversion, and changes in prevalence of MetS. Rather than performing analyses according to the intervention group, we used biomarkers of the foods supplied to

each group for two reasons. First, as inhabitants of a Mediterranean region, the participants in the control group consumed a lower amount of fatty foods characteristic of the Western diet but not a lower amount of VOO or nuts, which could have attenuated any differences between groups. Secondly, since biomarkers are potentially independent of the errors associated with self-report

methods [14], they provide an objective and accurate measure of the consumption of MD foods among participants independently of the assigned group. Some FA are considered to be indirect biomarkers of the consumption of individual foods or food groups. This is the case when the food source is the primary source of the FA and it is stable in the sampling medium [14]. According to the correlation analysis, plasma concentrations of OA and ALA were good biomarkers of OO and walnut intake, respectively. Walnuts are characterized by their high ALA content, which, in turn, cannot be synthesized endogenously. Therefore the correlation between ALA in plasma and walnut intake was expected. Regarding OA, being a MUFA, it can be synthesized endogenously from either carbohydrates (CHO) or SFA, particularly when MUFA intakes are lower. Moreover, although OO is the richest dietary source of OA, it is also a major component of most animal fats and makes up a sizable fraction of most vegetable oils. However, while animal fats rich in OA typically contribute considerably to its intake in other European countries, OO was the largest contributor of total fat (70%) in our Catalan population. Moreover, 70–80% of its MUFA content is due to OA. Therefore, OA was a good biomarker of OO consumption in our sample population. In fact, the plasma levels of OA have previously been related to their dietary source in Mediterranean populations [29]. Furthermore, tissue stores of OA were a marker of OO consumption in Spain, but not in the other four European centers of the EURAMIC study [30].

Using the biomarkers of foods supplied to the intervention groups we found that the incidence and reversion rates of MetS progressed inversely and in parallel, respectively, to increases in OA and ALA, which resulted in significant differences in the changes in prevalence of MetS across the quartiles of changes in both OA and ALA. Therefore, the beneficial effect of OO and nut consumption on the prevalence of MetS appears to be a consequence of the combination of incidence and reversion rates. However the reduction in the prevalence of MetS obtained in our study was much lower than that reported by other studies showing a beneficial effect of adherence to the MD in terms of MetS prevalence [9]. This could be due to several factors. Firstly, participants in the other intervention studies were younger and all had MetS or impaired glucose tolerance at baseline. Secondly, the CHO intake in those studies was higher than that of our study population (>55% of energy vs. 40%) and extensive research has achieved consensus that reducing dietary CHO is a critical approach to treating or managing the manifestations of MetS [31]. Finally, energy intake was reduced and physical activity increased in the previous studies so as to achieve weight loss, which is considered the number one priority when treating MetS [6]. However, no restrictions were prescribed in any of our groups, which resulted in a non-significant weight change across the quartiles of changes in OA and ALA. Indeed, a recent study reported that a MD without weight loss led to non-significant changes in the components or prevalence of MetS compared to the control diet, whereas only a small reduction in body weight (10%) reduced the prevalence of MetS by more than 50% [32]. However, the magnitude of the weight loss did not predict the degree of improvement in MetS components while on the MD and patients with the most deteriorated baseline MetS profile presented important cardiometabolic benefits even on a MD without weight loss, suggesting that the MD may achieve beneficial effects even in the absence of weight loss, as was our case.

Apart from the biomarkers of the food supplied, we found that MA and PA were adversely associated with the incidence of MetS. This supports the findings of previous studies about dietary fat quality and disease risk. Hence, substituting unsaturated fat or CHO for SFA impairs insulin sensitivity [33] and induces a FA

pattern similar to that observed in people with MetS [17], which is also caused by a diet rich in SFA [15]. Interestingly, we found that when participants were classified according to their change in MetS status, the changes in these two SFA and the two biomarkers of foods supplied evolved in the MetS incidence group in the opposite direction to that of the other groups, with the exception of PA. Thus, while the incidence group showed a significant increase in the proportions of MA and PA and a reduction in the levels of OA and ALA, subjects in the other groups presented a non-significant decrease in the proportions of MA but an increase in the OA and ALA levels. Importantly, although between-group changes in these four FA were not always significant, they differed significantly between the MetS incidence and reversion groups. In fact participants in the reversion group showed the highest reduction in MA, the lowest increase in PA, and the highest increase in both OA and ALA among the non-incident groups, which could explain the change in their MetS status. However, the increase in OA and ALA concentrations observed in participants who always had MetS was probably not enough compared with that of the MetS reversion group to experience a change in their MetS status after the intervention. Furthermore, participants who never had MetS during the intervention probably did not present MetS after 1 year of intervention because they had also significantly increased both OA and ALA.

Interestingly, all these effects were observed without a weight increase despite the high fat content of both MDs. In fact, a meta-analysis of 21 epidemiological studies regarding MD and obesity showed that no studies reported significantly increased obesity in response to a MD. Moreover, over half of the studies provided evidence that adherence to a MD was associated with less overweight/obesity or promoted weight loss [34]. This lack of weight gain and the improvement in overweight or obesity may be due to the increased postprandial fat oxidation, diet-induced thermogenesis and overall daily energy expenditure induced by OO [35] and nut [36] consumption, as well as to a satiating effect [36,37].

Since the primary endpoint for the treatment of MetS is to reduce the risk of CVD, traditional dietary recommendations such as those proposed by the NCEP, AHA and NHLBI essentially involve following a low-fat diet and achieving weight reduction by a combination of reduced caloric intake and increased physical activity. In our study, however, we found that a high-fat (>40% of energy) non-energy-restricted diet showed a reduction in MetS prevalence without the need for weight loss or prescribed physical activity. There are several important aspects to consider regarding the MD followed in this study. First of all, it is highly palatable, decreases hunger, and promotes satiety, hence improving long-term adherence compared to low-fat energy-restricted diets [31]. Secondly, no weight gain was observed in participants with high VOO or nut consumption. Finally, a usual consequence of low-fat diets is unrestricted CHO intake, which has been shown to result in reduced HDL-C levels and raised TG levels, thus exacerbating the MetS status [31]. Therefore, the results of this study suggest that there is no rationale for maintaining the fear that a MD rich in fats of vegetable origin may cause weight gain, and that it may be a useful alternative to traditional low-fat diets for the dietary treatment of MetS.

Supporting Information

Protocol S1 Predimed Study: Mediterranean diet in the primary prevention of cardiovascular disease. Amendments to the Research Protocol. (DOC)

Protocol S2 Predimed Study: Mediterranean diet in the primary prevention of cardiovascular disease. Research Protocol. 2009. (DOC)

Protocol S3 Predimed Study: Mediterranean diet in the primary prevention of cardiovascular disease. Research Protocol. 2003. (DOC)

Checklist S1 CONSORT checklist. (DOC)

Acknowledgments

The authors thank the participants for their enthusiastic collaboration, the PREDIMED personnel for excellent assistance and the personnel of all affiliated primary care centres.

The PREDIMED Study Investigators are: Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain: C. Viñas, R. Casas, J.M. Baena, M. Oller, J. Amat, I. Duso, Y. García, C.

References

- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, et al. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120: 1640–1645.
- Grundy SM (2008) Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 629–636.
- Desroches S, Lamarche B (2007) The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 23–32.
- Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, et al. (2007) Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 49: 403–414.
- Ford ES, Li C, Sattar N (2008) Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care* 31: 1898–1904.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, et al. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735–2752.
- Baxter AJ, Coyne T, McClintock C (2006) Dietary patterns and metabolic syndrome - a review of epidemiologic evidence. *Asia Pac J Clin Nutr* 15: 134–142.
- Pérez-López FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL (2009) Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 64: 67–79.
- Esposito K, Giugliano D (2010) Mediterranean diet and the metabolic syndrome: the end of the beginning. *Metab Syndr Relat Disord* 8: 197–200.
- Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS (2009) Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 218–236.
- López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, et al. (2008) Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 284–294.
- Sabaté J, Ang Y (2009) Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 89: 1643S–1648S.
- Sabaté J, Wien M (2010) Nuts, blood lipids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 19: 131–136.
- Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA (2008) Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* 47: 348–380.
- Warensjö E, Rísérus U, Gustafsson IB, Mohsen R, Cederholm T, et al. (2008) Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 683–690.
- Corpeleijn E, Feskens EJ, Jansen EH, Mensink M, Saris WH, et al. (2006) Improvements in glucose tolerance and insulin sensitivity after lifestyle intervention are related to changes in serum fatty acid profile and desaturase activities: the SLIM study. *Diabetologia* 49: 2392–2401.
- Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA (2004) Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23: 447–456.
- Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A (2002) Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci* 967: 183–195.
- Rísérus U, Willett WC, Hu FB (2009) Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res* 48: 44–51.
- Iglesias, and J. Benavent. University of Navarra, Primary Care Division Centres, Pamplona, Spain: A. Sánchez-Tainta, E. Toledo, P. Buil-Cosiales, M. Serrano-Martínez, J. Díez-Espino, A. García-Arellano, I. Zazpe, J. Basterra-Gortari, University Rovira i Virgili, Reus, Spain: R. González, C. Molina, M. Guasch-Ferré, A. Díaz-López, M. Sorli, J. García-Roselló, J. Basora, J. Fernández-Ballart.
- Institute de Recerca Hospital del Mar, Barcelona, Spain: S. Tello, J. Vila, M. Fitó, H. Schröder, R. University Hospital of Alava, Vitoria, Spain: F. Aros, del Hierro, J. Algorta. University of Málaga, Málaga, Spain: R. Benítez Pont, M. Bianchi Alba, J. Fernández-Crehuet Navajas, E. Gómez-Gracia. Department of Family Medicine, Primary Care Division of Sevilla, Sevilla, Spain: F.J. García, P. Roman, J.M. Santos, J. Lapetra. University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain: J. Álvarez-Pérez, E. Díez Benítez, I. Bautista Castaño, A. Sánchez-Villegas.

Author Contributions

Conceived and designed experiments: JMP ASV AIC MCLS. Performed the experiments: JMP ASV MC AIC. Analyzed the data: JMP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JMP ASV MC AIC RE MIC MF JSS MAMG RMLR ER MCLS. Wrote the manuscript: JMP.

Publicación 7

Consumption of olive oil affects the phenolic content and fatty acid profile of human high-density lipoproteins

.....
El consumo de aceite de oliva afecta el contenido de fenoles y el perfil de ácidos grasos de las lipoproteínas de alta densidad

Autores: Fernández-Ávila, C., Montes, R., Castellote, A.I., Chisaguano A.M., Fitó, M., Covas, M., Muñoz-Aguallo, D., Nyssönen, K., Zunft H.J., López-Sabater M.C.

Pendiente de publicación

.....

2. Comunicaciones presentadas en Congresos

2.1. Optimization and validation of a fast gas chromatographic method for the determination of elaidic acid, vaccenic acid and rumenic acid in plasma and human milk

Autores: A.I. Castellote Bargalló, A.M. Chisaguano Tonato, B. Lozano Miralles de Imperial, M.C. López-Sabater

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 13as Jornadas de Análisis Instrumental

Lugar: Barcelona

Año: 2011

2.2. Decreased $\Delta 6$ -Desaturase (FADS2) Gene Expression in Peripheral Blood of Atopic Eczema Children

Autores: A. M Chisaguano, A.I. Castellote Bargalló, E. Morales, R. García-Esteban, J. Sunyer & M.C. López-Sabater

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 10th Euro Fed Lipid Congress

Lugar: Cracovia (Polonia)

Año: 2012

2.3. Presence of elevated circulating HDL phenol levels in men who consumed olive oil with different antioxidant content

Autores: C Fernández-Ávila, R Montes, A Chisaguano, AI CastelloteBargalló, MI Covas, M Fitó, D Muñoz & MC López-Sabater

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 10th Euro Fed Lipid Congress

Lugar: Cracovia (Polonia)

Año: 2012

2.4. Elaidic, t-vaccenic and rumenic acid status during pregnancy and risk of atopic diseases in infants

Autores: A.M. Chisaguano, R. Montes, A. I. Castellote, J. Vioque; J. Sunyer and M. C. López-Sabater

Tipo de presentación: Póster

Congreso: The 2nd International Conference on Nutrition and Growth

Lugar: Barcelona

Año: 2014

2.5. Influence of the cord blood fatty acid composition related genetic variants on the development of atopic diseases in infancy

Autores: R. Montes, E. Morales, A.M. Chisaguano, M. Bustamante, A. I. Castellote, R. García-Esteban, J. Sunyer and M. C. López-Sabater

Tipo de presentación: Póster

Congreso: The 2nd International Conference on Nutrition and Growth

Lugar: Barcelona

Año: 2014