



## REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

**Olalla Bueno Fraile**

**Dipòsit Legal: T. 78-2014**

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

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

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

# **TESIS DOCTORAL**

## **REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO**

**Olalla Bueno Fraile**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública**

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI - Reus 2013**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

**Olalla Bueno Fraile**

**REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL  
DEL ESTADO EN FOLATOS  
EN UNA POBLACIÓN ADULTA  
NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO PROFILÁCTICO  
Y DURANTE EL EMBARAZO**

**TESIS DOCTORAL**

dirigida por el Prof. Joan Fernández Ballart  
y la Dra. Michelle Murphy

**Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques.**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Reus 2013**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

Joan Fernández-Ballart, catedrático del departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili, y Michelle Murphy, profesora agregada del departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili,

### **HACEN CONSTAR**

Que este trabajo titulado “Regulación genético-nutricional del estado en folatos en una población adulta no expuesta a ácido fólico profiláctico y durante el embarazo” que presenta Olalla Bueno Fraile para la obtención del título de Doctor, ha estado realizado bajo su dirección, en el departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de esta universidad y cumple con los requisitos para poder optar a este título.

Reus, 15 de julio de 2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## Agradecimientos

Debo agradecer su colaboración a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis. Por ello, gracias:

A los participantes y a las pacientes, sin cuya participación altruísta sería imposible pensar siquiera en ningún proyecto de investigación.

A todo el personal de los servicios de Obstetricia y Ginecología del *Hospital Universitari Sant Joan de Reus* y del *Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona*, en especial a sus responsables: Dres. Pere Cavallé Busquets, Ramon Miralles, Gerard Albaigès y Dra. Mónica Ballesteros.

Al personal del laboratorio central y a las auxiliares y enfermeras de extracciones del *Hospital Universitari Sant Joan de Reus*, del laboratorio de investigación del *Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona* y del Biobanco - *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*.

A Per Ueland de BeVital (Bergen) y a John Scott y Anne Molloy de Trinity College (Dublín) por su colaboración en las determinaciones bioquímicas y genéticas.

A todos los participantes de los estudios HOMFOL y GENUF y a las mujeres embarazadas del estudio NUTCIR, ya que sin su participación altruísta este trabajo no hubiera sido posible.

Al financiamiento de:

- Instituto de Salud Carlos III, FIS: PI10/00335
- CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB07/03/2004))
- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España, proyecto: SAF: 2005-05096
- Italfarmaco (2005-2008)
- AGAUR: 2009 SGR 1237
- Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili: 2010/IISPV/21

Gracias a todas aquellas personas que de una manera u otra han aportado su granito de arena en la elaboración de este proyecto, estoy segura que me perdonarán si no ven su nombre en este listado.

Gracias a Michelle y a Joan por dirigirme en esta difícil tarea de escribir una tesis. Por hacerlo con ganas y con cariño.

Gracias a mis compañeros de batallas durante estos años. Gracias a Pol, el relevo, y a Andrés, Marta y Pablo por regalarme tan buenos momentos cuando más los necesitaba. Gracias a Sílvia, a Martí y a Núria, por estar siempre ahí, desde un principio, compartiendo penas y alegrías. Conocerlos ha sido una de las experiencias más positivas que valoro de estos cuatro años.

Gracias a Toni, que ha vivido de cerca los sabores y sinsabores de esta experiencia, que ha secado lágrimas de todos los colores, mi apoyo y equilibrio en los momentos de flaqueza. Gracias por estar a mi lado.

Gracias a mis padres. Los mejores. Ellos siempre están ahí, siempre, no fallan nunca. Y quizá esa es la mejor lección que me llevo de estos cuatro años. No necesito más.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de tablas</b>	<b>19</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>21</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
<b>1. Nomenclatura y estructura</b>	<b>27</b>
<b>2. Funciones del folato</b>	<b>27</b>
2.1. Folato y desarrollo embrionario	30
2.2. Folato y reparación del ADN	30
2.3. Folato y función cardiovascular	31
2.4. Folato y función neurológica	32
<b>3. Fuentes de folato. Biodisponibilidad.</b>	<b>32</b>
<b>4. Necesidades de folato</b>	<b>33</b>
<b>5. Deficiencia de folato</b>	<b>34</b>
<b>6. Políticas de fortificación</b>	<b>35</b>
<b>7. Exceso de folato</b>	<b>37</b>
<b>8. Absorción y transporte</b>	<b>40</b>
8.1. Sistemas de transporte de folato	40
8.1.1. <i>Reduced folate carrier (RFC)</i>	40
8.1.2. <i>Proton coupled folate transporter (PCFT)</i>	41
8.1.3. <i>Receptores de folato</i>	41
8.1.4. <i>Proteínas transportadoras ligadas a ATP y otros transportadores</i>	43
8.2. Absorción y transporte intestinal	43
8.3. Transporte a los tejidos	44
<b>9. Metabolismo celular del folato</b>	<b>44</b>



<b>10. Polimorfismos implicados en el transporte y metabolismo del folato</b>	<b>45</b>
10.1. Reduced folate carrier ( <i>SLC19A1</i> )	46
10.2. Receptor de folato $\alpha$ ( <i>FOLR1</i> o <i>FR<math>\alpha</math></i> )	47
10.3. Metilentetrahidrofolato reductasa ( <i>MTHFR</i> )	48
10.4. MetilénTHF deshidrogenasa-MetenilTHF ciclohidrolasa-FormilTHF sintetasa ( <i>MTHFD1</i> )	49
10.5. Metionín sintasa reductasa ( <i>MTRR</i> )	50
10.6. Dihidrofolato reductasa ( <i>DHFR</i> )	50
<b>11. El folato durante el embarazo</b>	<b>51</b>
<b>12. Tabla resumen de conocimientos y carencias sobre el tema</b>	<b>55</b>

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

61

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

65

<b>1. Diseño y reclutamiento</b>	<b>65</b>
<b>2. Obtención de muestras biológicas</b>	<b>68</b>
<b>3. Procesado de muestras</b>	<b>69</b>
<b>4. Determinaciones bioquímicas</b>	<b>71</b>
<b>5. Determinaciones genéticas</b>	<b>72</b>
<b>6. Tratamiento de datos</b>	<b>72</b>
<b>7. Análisis estadístico</b>	<b>74</b>

## **RESULTADOS. ESTUDIO POBLACIONAL.**

79

<b>1. Características generales de la muestra</b>	<b>79</b>
<b>2. Estado en folatos de la muestra</b>	<b>82</b>
<b>3. Polimorfismos en la muestra</b>	<b>82</b>

<b>DISCUSIÓN. ESTUDIO POBLACIONAL.</b>	<b>93</b>
1. Estado en folatos de la muestra	93
2. Polimorfismos en la muestra	94
3. Polimorfismos y estado en folatos	94
4. Combinaciones de polimorfismos y estado en folatos	96
<b>RESULTADOS. ESTUDIO NUTCIR.</b>	<b>103</b>
1. Características de la muestra	103
2. Evolución del estado en folatos y suplementación con ácido fólico	107
3. Estado en folato de las gestantes	110
4. Polimorfismos en la muestra	111
5. Efecto del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C>T sobre las reservas de folato	113
<b>DISCUSIÓN. ESTUDIO NUTCIR.</b>	<b>117</b>
1. Características generales de la muestra	117
2. Estado en folato de las gestantes	118
3. Evolución del estado en folato y suplementación con ácido fólico	120
4. Polimorfismos en la muestra	123
5. Efecto del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C>T sobre las reservas de folato	123
<b>VISIÓN GLOBAL</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**139**

**APORTACIONES CIENTÍFICAS**

**169**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> RDA de folato según el IOM	<b>34</b>
<b>Tabla 2.</b> Cuestiones pendientes de resolver en esta tesis	<b>55</b>
<b>Tabla 3.</b> Categorías de uso de suplementos de ácido fólico	<b>73</b>
<b>Tabla 4.</b> Características generales de la muestra	<b>80</b>
<b>Tabla 5.</b> Ingesta de folato y concentraciones de homocisteína y folatos según edad y sexo	<b>81</b>
<b>Tabla 6.</b> Estado deficiente en folatos (folato plasmático <7nmol/L) según edad y sexo	<b>81</b>
<b>Tabla 7.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados	<b>82</b>
<b>Tabla 8.</b> Estado en folatos según el polimorfismo	<b>83</b>
<b>Tabla 9.</b> Estado en folatos según la combinación de polimorfismos	<b>84</b>
<b>Tabla 10.</b> Genotipos o combinaciones de genotipos y riesgo de tener el folato plasmático en el tercil más bajo (<9.1nmol/L)	<b>88</b>
<b>Tabla 11.</b> Genotipos o combinaciones de genotipos y riesgo de tener el folato eritrocitario en el tercil más bajo (<680 nmol/L)	<b>89</b>
<b>Tabla 12.</b> Características generales de las participantes según el tercil (nmol/L) de folato plasmático en el primer trimestre	<b>104</b>
<b>Tabla 13.</b> Marcadores bioquímicos de estado en folatos a las 24-27 SG según el tercil de folato plasmático (nmol/L) en el primer trimestre de gestación	<b>106</b>
<b>Tabla 14.</b> Estado en folato eritrocitario durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre	<b>107</b>
<b>Tabla 15.</b> Estado en folato plasmático durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre	<b>109</b>
<b>Tabla 16.</b> Estado en cobalamina plasmática durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre	<b>109</b>
<b>Tabla 17.</b> Gestantes en el tercil bajo de cobalamina plasmática según el patrón de suplementación durante el primer trimestre de embarazo	<b>110</b>
<b>Tabla 18.</b> Cantidad de gestantes (%) deficientes en folato plasmático (<7 nmol/L) según el tipo de suplementación utilizada durante el primer trimestre	<b>111</b>
<b>Tabla 19.</b> Cantidad de gestantes (%) deficientes en folato eritrocitario (<320 nmol/L) según el tipo de suplementación utilizada durante el primer trimestre	<b>111</b>
<b>Tabla 20.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en la muestra	<b>112</b>
<b>Tabla 21.</b> Frecuencias de dobles salvajes y dobles homocigotos para las parejas de polimorfismos creadas.	<b>112</b>
<b>Tabla 22.</b> Número de gestantes disponibles para los modelos multivariados ajustados	<b>113</b>
<b>Tabla 23.</b> Estado en folato eritrocitario en función del genotipo <i>MTHFR</i> 677 C>T en los diferentes terciles de folato plasmático.	<b>114</b>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del ácido fólico	<b>27</b>
<b>Figura 2.</b> Integración del metabolismo monocarbonado	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b> Integración del ciclo de los folatos y la metionina.	<b>45</b>
<b>Figura 4.</b> Polimorfismos a estudiar presentes en el ciclo de los folatos.	<b>46</b>
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo del reclutamiento de voluntarios en el estudio poblacional	<b>66</b>
<b>Figura 6.</b> Diagrama de flujo del estudio NUTCIR	<b>67</b>
<b>Figura 7.</b> Diseño del estudio NUTCIR	<b>68</b>
<b>Figura 8.</b> Pregunta sobre uso de suplementos en la encuesta de hábitos y estilo de vida que se realiza a las 20 semanas de gestación.	<b>74</b>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AI:** Ingesta adecuada

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BCRP:** Breast cancer resistance protein

**BHMT:** Betaína hidroximetiltransferasa

**Cbl:** Cobalamina

**DE:** Desviación estándar

**DFE:** Dietary folate intake

**DHF:** Dihidrofolato

**DHFR:** Dihidrofolato reductasa

**DRI:** Referencia de ingesta dietética

**DTN:** Defectos del tubo neural

**EAR:** Requerimiento medio estimado

**EUA:** Estados Unidos de América

**FR:** Receptor de folato

**GPI:** Glicosil fosfoinositol

**Hcy:** Homocisteína

**IC:** Intervalo de confianza

**IOM:** Institute of Medicine

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**MRP:** Multidrug associated protein

**MS:** Metionín sintasa

**MT:** Metiltransferasa

**MTHFD1:** MetilénTHF deshidrogenasa-metenilTHF ciclohidrolasa-formilTHF sintetasa

**MTHFR:** 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa

**MTRR:** Metionín sintasa reductasa

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PCFT:** Proton-coupled folate transporter

**RDA:** Ración dietética recomendada

**RFC:** Reduced folate carrier

**SAM:** S-Adenosilmetionina

**SAH:** S-Adenosilhomocisteína

**SEGO:** Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia



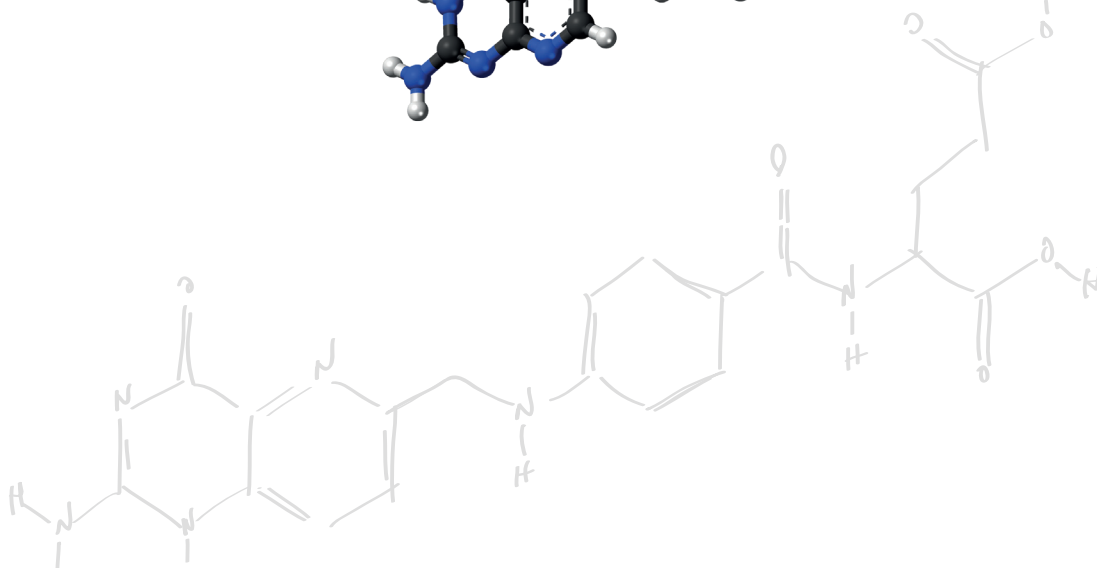
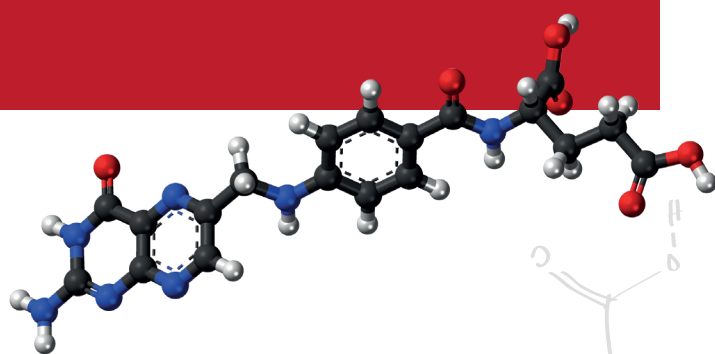
**SG:** Semanas de gestación

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas

**THF:** Tetrahydrofolato

**TYMS:** Timidilato sintetasa

**UL:** Límite tolerable de ingesta



# INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## 1. Nomenclatura y estructura

Los folatos son una familia de compuestos derivados del ácido pteroilglutámico que difieren en función del estado de oxidación de la molécula, los carbonos específicos unidos a ella y la longitud de la cadena lateral de glutamato<sup>1,2</sup>.

La estructura básica de esta vitamina hidrosoluble consiste en una 2-amino-4-hidroxi-pteridina unida mediante un grupo metileno al carbono 6 del ácido p-aminobenzoilglutámico<sup>3</sup>. Esta es la forma totalmente oxidada y monoglutamada del folato, conocida como ácido fólico (*Figura 1*). No obstante, la forma coenzimática de la vitamina es el tetrahidrofolato (THF). En esta molécula, que se halla reducida, la molécula final de glutamato se ha convertido en cadena de glutamatos añadiendo residuos glutamato unidos mediante un enlace  $\gamma$ -peptídico, a la vez que presenta unidades de carbono (metilo, metileno, metenil, formil...) en las posiciones N-5 y/o N-10<sup>2</sup>.

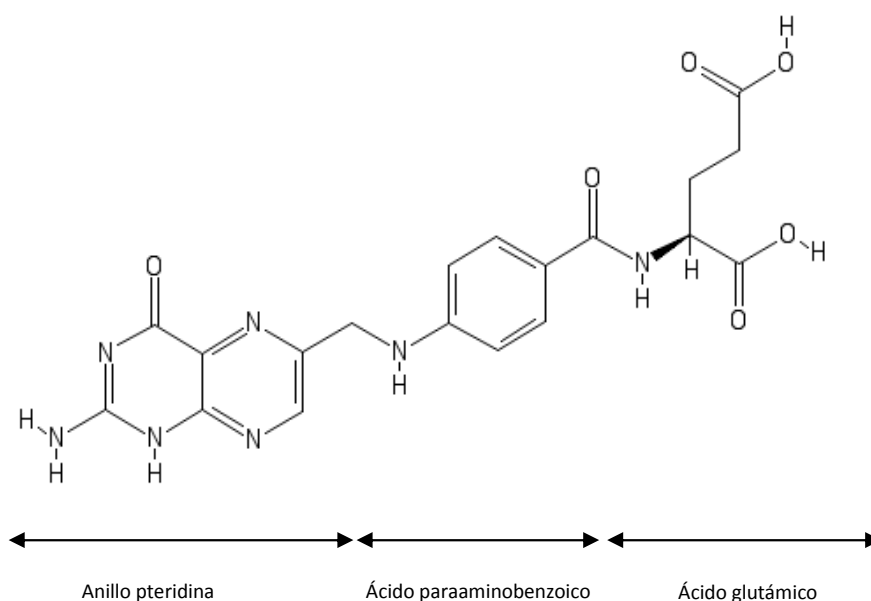


Figura 1. Estructura química del ácido fólico

## 2. Funciones del folato y su deficiencia

La principal función metabólica de los folatos es la transferencia de grupos metilo a aquellas reacciones que los necesitan. Estas reacciones se hallan implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de bases nitrogenadas y las reacciones de metilación del ADN y de las

proteínas. Esto es especialmente importante durante períodos de rápida división celular y crecimiento, o en tejidos de elevado recambio celular.

Por otro lado, el folato también proporciona los grupos metilo necesarios para la conversión de homocisteína (Hcy) a metionina. Este paso, conocido como remetilación de la Hcy, es precisamente el punto de conexión entre el metabolismo del folato y el de la metionina (*Figura 2*).

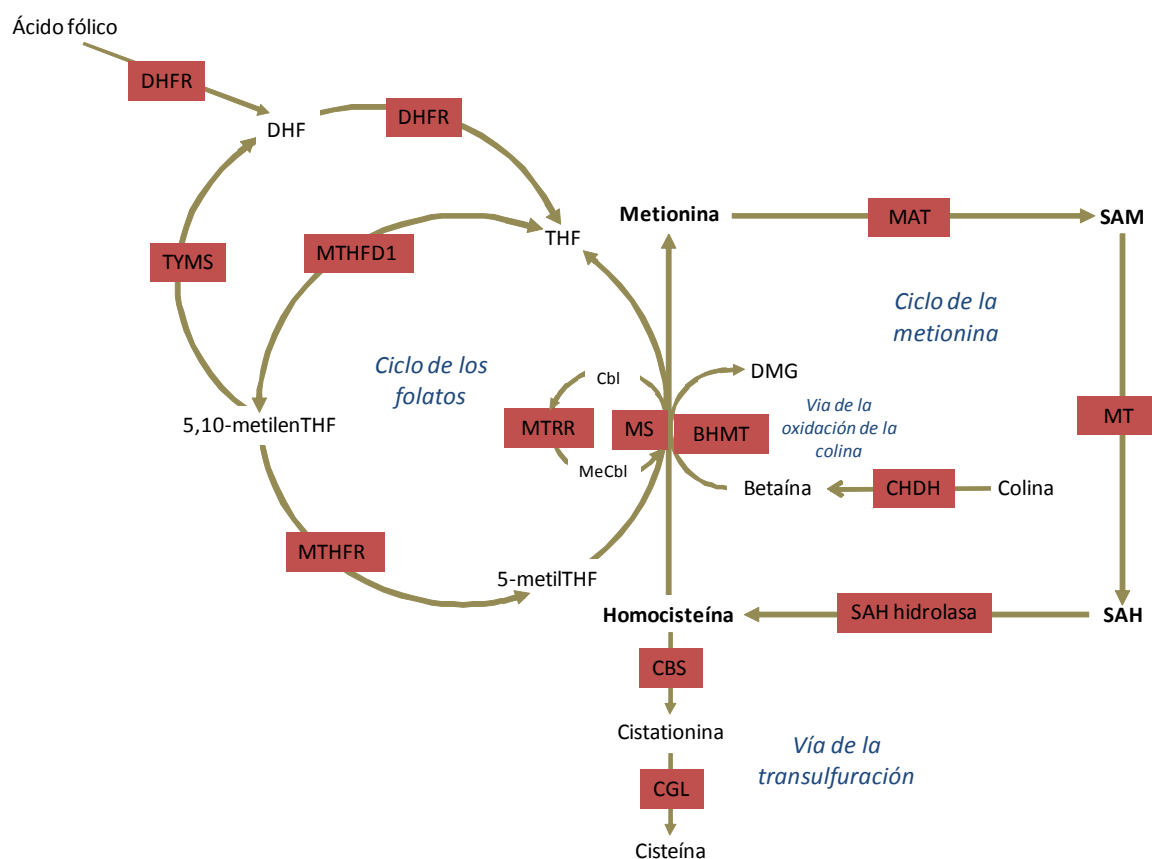
La Hcy es un aminoácido sulfurado que resulta tóxico cuando se halla en exceso, y por ello se puede encontrar en plasma gracias a un mecanismo de exporte celular que tiene como objetivo mantener baja su concentración intracelular para evitar así las consecuencias de sus efectos citotóxicos<sup>4,5</sup>. Este mecanismo protege a la célula de la toxicidad de la Hcy pero a cambio expone a los tejidos vasculares a los efectos indeseados de un exceso de ésta<sup>6,7</sup>. Por ello resulta imprescindible que a nivel intracelular exista un sistema para eliminar este aminoácido tóxico, que en este caso consiste en convertirlo en otro aminoácido, la metionina.

La metionina también es un aminoácido sulfurado, necesario para la síntesis proteica. En el metabolismo de la metionina se encuentran diversas reacciones de metilación. En primer lugar, la metionina se convierte en S-adenosilmetionina (SAM), que dona su grupo metilo a un aceptor de metilos para producir S-adenosilhomocisteína (SAH) mediante una metiltransferasa (MT). SAH se hidroliza a Hcy y adenosina. Esta secuencia de reacciones se conoce como transmetilación o ciclo de la metionina y se da en todas las células del organismo<sup>8</sup>.

La remetilación de la Hcy es una reacción esencial para el mantenimiento de la metionina y la producción de SAM. Existen tres enzimas que utilizan la Hcy como sustrato y cuya actividad depende del estado metabólico. Cuando el estado en folato es bajo, esta reacción también puede darse mediante la enzima betaína hidroximetiltransferasa (BHMT)<sup>10</sup> en la vía de la oxidación de la colina, aunque ésta solo está presente en hígado y riñón. Por otro lado, si el estado en metionina es el adecuado, la Hcy se convierte irreversiblemente en cisteína mediante las enzimas cistationina β-sintasa (CBS) y cistationina γ-liasa (CGL) en la vía de la transulfuración. Sin embargo, principalmente la Hcy se remetila a metionina mediante la enzima metionín sintasa (MS) presente en la mayoría de tejidos<sup>9</sup>.

Esta última reacción necesita como cofactor la metilcobalamina (MeCbl), y da como resultado tetrahidrofolato (THF), metionina y cobalamina (Cbl) desmetilada. La enzima metionín sintasa reductasa (MTRR) es la encargada de unir de nuevo un grupo metilo a la cobalamina, manteniendo de este modo la enzima MS en su forma activa<sup>11</sup>. La cobalamina es por tanto imprescindible en la utilización del 5-metilTHF, que aporta el grupo metilo necesario para la remetilación de la cobalamina (y por ende de la Hcy) al desmetilarse a THF<sup>12</sup>. Tanto la deficiencia en cobalamina como

en folatos llevan al mismo déficit metabólico, la falta de THF, y por tanto, de las formas de folato necesarias para las reacciones de síntesis de purinas y pirimidinas<sup>13</sup>.



**Figura 2. Integración del metabolismo monocarbonado.** DHFR: Dihidrofolato reductasa. DHF: Dihidrofolato. TYMS: Timidilato sintasa. MTHFD1: MetilénTHF deshidrogenasa - metenilTHF ciclohidrolasa - formilTHF sintetasa. THF: Tetrahidrofolato. Cbl: Cobalamina. DMG: Dimetilglicina. MTRR: Metionin sintasa reductasa. MS: Metionin sintasa. MeCbl: Metilcobalamina. BHMT: Betaína-homocisteína metiltransferasa. CHDH: Colina deshidrogenasa, MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. CBS: Cistationina β-sintasa. CGL: Cistationina γ-liasa.

Según la hipótesis de la “trampa de folatos”<sup>14</sup>, en ausencia de cobalamina, no se puede utilizar el 5-metilTHF, a pesar de tener suficiente cantidad disponible. Por tanto, la concentración de este metabolito aumenta, mientras que no se puede formar THF. Por otro lado, tampoco se produce la remetilación de la Hcy, por lo que la concentración de metionina disminuye, y con ella la de S-adenosilmetionina (SAM), eliminando por tanto la inhibición alostérica que ésta ejerce sobre la enzima MTHFR<sup>15</sup>, productora de 5-metilTHF. El resultado final es una gran acumulación de 5-metilTHF que paradójicamente no puede aportar los grupos metilo necesarios a aquellas reacciones que las requieren.

## 2.1. Folato y desarrollo embrionario

El folato es un nutriente esencial en el desarrollo embrionario. Los estudios de embarazo muestran que la suplementación con ácido fólico durante la preconcepción tiene un significativo efecto protector sobre los embriones durante el desarrollo temprano, resultando en una menor incidencia de malformaciones congénitas<sup>16-19</sup>. Las células multipotenciales a partir de las cuales se desarrollan los distintos sistemas del embrión tienen una elevada demanda de ácido fólico necesario para su crecimiento, diferenciación y migración. Por tanto, un déficit en el aporte de folato desemboca en graves malformaciones estructurales<sup>18,20</sup>, algunas de las cuales pueden ser fatales.

Las malformaciones congénitas más comunes son los defectos del tubo neural (DTN), labios leporinos y hendiduras palatinas, y anomalías cardíacas. Los DTNs son un grupo de malformaciones congénitas que se centran en el cerebro o la médula espinal afectando al desarrollo del sistema nervioso y que incluyen anencefalia, espina bífida y encefalocele. Están causadas por un fallo en el cierre del tubo neural que debería tener lugar entre 21 y 28 días tras la concepción. Los DTNs graves provocan siempre discapacidad e incluso la muerte, y son una causa importante de morbilidad y mortalidad, con una incidencia estimada de >300000 casos nuevos al año y 41000 muertes<sup>21</sup>. En la Unión Europea, la prevalencia de DTNs va de 0.4 a 2 por cada 1000 nacimientos, y unos 4500 embarazos se ven afectados por DTNs cada año<sup>22</sup>. No obstante, la ocurrencia de DTNs tiene una notable variabilidad en función del área geográfica, el nivel socioeconómico y los antecedentes étnicos. En Irlanda y Escocia se registran las tasas más altas del mundo occidental, con cerca de 10 casos por cada 1000 nacimientos<sup>23</sup>.

Los nacimientos afectados de DTNs han disminuido en general en los últimos 30 o 40 años, en parte a causa de la introducción de políticas de fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico y a la suplementación con ácido fólico durante el primer trimestre de embarazo, cuestiones clave que serán analizadas con más detalle en los siguientes capítulos. Sin embargo, esta disminución en la prevalencia de los DTNs también se debe al diagnóstico prenatal y al aborto selectivo, lo que puede confundir la interpretación de los datos epidemiológicos. A pesar de ello, se estima que anualmente nacen más de 2500 niños afectados de DTNs en los Estados Unidos, y que unos 30000 individuos conviven con la espina bífida<sup>23</sup>.

## 2.2. Folato y reparación del ADN

Los errores en la síntesis, reparación y metilación del ADN, se hallan íntimamente relacionados con los mecanismos mediante los cuales aparece el cáncer<sup>24</sup>. Un adecuado estado en folato puede conferir protección contra el cáncer principalmente mediante dos mecanismos: evitando la incorporación errónea de uracilo al ADN<sup>25</sup> y proporcionando los grupos metilo necesarios para mantener un correcto estado de metilación del genoma<sup>26,27</sup>.

El folato en su forma de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-metilenTHF) es necesario para la síntesis de timidina a partir de uracilo. Por lo tanto, la baja disponibilidad de folato provoca un incremento en la ratio intracelular de deoxiuridilato/deoxitimidilato que a su vez promueve la incorporación errónea de uracilo al ADN<sup>28-30</sup>. Aunque en condiciones normales se observa la presencia de uracilo en el ADN, cuando éste está presente en exceso puede resultar en varios tipos de inestabilidad genómica. Como las células de mamífero cuentan con diversos sistemas de reparación del ADN que son específicos para la escisión y sustitución de los residuos de uracilo<sup>31</sup>, cuando la incorporación de uracilo al ADN aumenta a causa de un mal estado en folato, las roturas en la cadena de ADN se acumulan. Estas roturas, especialmente las de doble cadena, son altamente mutagénicas<sup>32</sup> y pueden suponer la delección de genes supresores de tumores<sup>33</sup>, translocaciones cromosómicas<sup>34-36</sup> o amplificación de oncogenes<sup>37,38</sup>.

Por otro lado, las células neoplásicas, por su rápida tasa de replicación, tienen unos requerimientos muy elevados de folato debido a la necesidad de síntesis de ADN. En modelos de roedores a los que se les administraron abundantes cantidades de ácido fólico, se ha observado una fuerte predisposición a la carcinogénesis cuando los focos neoplásicos ya se hallaban formados<sup>39,40</sup>. A la inversa, se esperaría que un menor aporte de folato en aquellos individuos con focos neoplásicos establecidos atenuase la carcinogénesis, tal y como apuntan algunos estudios en animales<sup>41,42</sup> y en humanos<sup>43-45</sup>.

Por lo que vemos, la relación folato-cáncer resulta paradójica, pues esta vitamina ejerce un efecto dual sobre la carcinogénesis. Un aporte insuficiente de folato puede llevar a la incorporación errónea de uracilo a la cadena de ADN, con las consecuencias mutagénicas (y por tanto carcinogénicas) que ello conlleva<sup>25,39</sup>. No obstante, el administrar ácido fólico en exceso una vez iniciado el proceso neoplásico podría favorecer el avance de dicho proceso<sup>24,46</sup>.

### 2.3. Folato y función cardiovascular

Una de las principales funciones del folato es la de ser sustrato en la reacción de remetilación de la Hcy a metionina. La deficiencia de folato puede llevar a la hiperhomocisteinemia, que es un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular<sup>47</sup>. Si esta asociación es causal o no, es algo que continúa siendo un interrogante. Las vías alternativas de eliminación de la Hcy, como podrían ser la vía de la transulfuración o la vía de la oxidación de la betaína (*Figura 2*), no son activas en las células y tejidos cardiovasculares del adulto. Así pues parece que los tejidos del sistema cardiovascular son más vulnerables a incrementos en la concentración de Hcy<sup>48</sup>. Sin embargo, recientemente se ha publicado un meta-análisis realizado con 12 ensayos clínicos aleatorizados que sumaban un total de 47429 participantes con enfermedad cardiovascular o en riesgo de padecerla. La terapia de disminución de la homocisteína no redujo el riesgo de ocurrencia de infarto de



miocardio, accidente cerebrovascular o muerte por todas las causas. Los autores concluyeron que no había suficiente evidencia para sostener que la reducción de la homocisteína previene los eventos cardiovasculares<sup>49</sup>.

#### 2.4. Folato y función neurológica

Las complicaciones neurológicas que se pueden derivar de la deficiencia en folato pueden incluir depresión, alteraciones cognitivas, neuropatía periférica y mielopatía<sup>50-52</sup>. Existen diversos mecanismos a través de los cuales se puede relacionar deficiencia en folato y alteraciones neurológicas: una ratio SAM/SAH alterada con las alteraciones en la metilación que conlleva<sup>53,54</sup>, la incorporación errónea de uracilo al ADN<sup>55,56</sup> o las consecuencias derivadas de la hiperhomocisteinemia, como la disfunción endotelial<sup>57</sup>, la excitotoxicidad<sup>58</sup> o el estrés oxidativo<sup>59</sup>.

Sin embargo, resulta difícil extraer una conclusión sobre el papel del folato en la función cognitiva a partir de los estudios observacionales, pues muchos de ellos son de corta duración o con muestras pequeñas. Recientemente se han publicado dos ensayos clínicos aleatorizados, correctamente diseñados, cuyas conclusiones son contradictorias. Uno de ellos no encontró que la administración de vitaminas del grupo B (ácido fólico, cobalamina, y piridoxina) durante dos años supusiera ningún beneficio para la función cognitiva<sup>60</sup>. El otro estudio sin embargo, con más del triple de participantes, concluye que la suplementación con ácido fólico durante tres años mejora significativamente la función cognitiva<sup>61</sup>.

### **3. Fuentes de folato. Biodisponibilidad.**

El estado en folatos depende de la biodisponibilidad de la vitamina procedente de la dieta. Este término se refiere a la proporción de nutriente fisiológicamente disponible, algo que viene determinado por varios factores, a saber: forma química del folato, matriz de alimentos, forma de cocinar y preservar los alimentos, ambiente químico del tracto gastrointestinal y otros factores que afectan al destino metabólico postabsortivo<sup>1,62</sup>.

La estructura química del folato puede hallarse reducida u oxidada, monoglutamada o poliglutamada. El folato presente de forma natural en los alimentos consiste en una mezcla de formas reducidas de la vitamina y habitualmente poliglutamadas. El ácido fólico, es decir, la forma sintética de la vitamina que sólo se encuentra en alimentos fortificados y suplementos, está completamente oxidado y monoglutamado.

La biodisponibilidad de la forma sintética de la vitamina o ácido fólico (utilizado en suplementos y en alimentos fortificados) es superior a la observada en respuesta a los folatos de la dieta<sup>1,63,64</sup>. La biodisponibilidad del ácido fólico cuando se consume acompañado de alimentos es

aproximadamente del 85%, y del 100% si se toma en ayunas acompañado de agua<sup>65,66</sup>. En cambio, la biodisponibilidad media del folato de la dieta se ha estimado entre el 45%<sup>67</sup> y el 50%<sup>68</sup>, aunque también se ha propuesto que podría ser de alrededor del 80%<sup>69</sup>.

El folato procedente de la dieta se halla de forma natural concentrado en algunos alimentos como el zumo de naranja, las fresas, las verduras de hoja verde, los frutos secos y las legumbres. La carne en general no es una buena fuente de folato, con excepción del hígado. Sin embargo, toda la matriz de alimentos puede influir en la biodisponibilidad del folato si éste queda atrapado en el interior de las estructuras de los alimentos y no puede alcanzar totalmente la superficie absorbente del intestino durante la digestión. Dos estudios realizados con voluntarios sanos a los que se les administraban espinacas procesadas de diversas maneras, demostraron que la biodisponibilidad del folato era mayor cuando éstas se hallaban picadas, troceadas o licuadas que cuando se administraban las hojas enteras de espinaca<sup>70,71</sup>.

No obstante, gran parte del contenido de folato se pierde durante el proceso de cocción y procesado de los alimentos<sup>1</sup>. En verduras de hoja verde se han descrito pérdidas de folato de entre el 50% y el 80% tras el proceso de hervido<sup>72,73</sup>. Sin embargo, la presencia de ciertos ingredientes en la matriz de alimentos, como el ácido ascórbico o la leche, podrían potenciar la biodisponibilidad del folato incrementando la estabilidad del folato dietético durante el procesado y la digestión en el tracto digestivo<sup>74</sup>.

#### 4. Necesidades de folato

Los valores de referencia de ingesta dietética (DRI) establecidos por el Institute of Medicine (IOM) son un conjunto de valores que incluyen el requerimiento medio estimado (EAR), la ración dietética recomendada (RDA), la ingesta adecuada (AI) y el límite tolerable de ingesta (UL)<sup>75</sup>.

Los DRIs para folato (excepto el UL) se expresan en  $\mu\text{g}/\text{día}$  DFE. *Dietary folate equivalent* (DFE) es una unidad de expresión para los DRIs de folato que permite tener en cuenta las diferencias en cuanto a biodisponibilidad del folato procedente de los alimentos y del ácido fólico sintético procedente de los alimentos fortificados. Cuando se expresan como DFEs, todas las formas de folato de la dieta, incluso el ácido fólico de los alimentos fortificados, se convierten a una cantidad que es equivalente al folato de los alimentos. La cantidad de ácido fólico sintético presente en la dieta se multiplica primero por 1.7 y esta cantidad se añade a los microgramos de folato procedente de los alimentos.

Este factor de conversión se basa en la observación de que cuando el ácido fólico se consume durante una comida (que es lo habitual en el caso de los alimentos fortificados), el ácido fólico

añadido es disponible al 85%<sup>65</sup> y el folato propio del alimento lo es al 50%<sup>68</sup>; por este motivo la relación 85:50 lleva a multiplicar por 1.7<sup>76</sup>.

En la *Tabla 1* se muestra la RDA de folato establecida por el IOM para cada grupo de población, ya que ésta varía en función de la edad, el sexo y la situación fisiológica. En el caso de los niños menores de un año, el valor mostrado corresponde a la AI, ya que la falta de datos sobre la variabilidad de las necesidades no permite calcular con confianza qué porcentaje de individuos tendrían cubiertas sus necesidades con dicha ingesta. El UL para el ácido fólico se estableció en 1000 µg/día. Sin embargo, no existe UL para el folato procedente de la dieta.

**Tabla 1. RDA de folato según el IOM<sup>75</sup>**

Grupo/Situación fisiológica	Edad	RDA/AI <sup>a</sup> (µg/día DFE)
Bebés	0-6 meses	65
	7-12 meses	80
Niños	1-3 años	150
	4-8 años	200
	9-13 años	300
Adultos	≥14 años	400
Embarazo	Cualquiera	600
Lactancia	Cualquiera	500

<sup>a</sup> AI en el caso de los bebés

## 5. Deficiencia de folato

A menudo, la deficiencia en folatos no es diagnosticada si no se manifiesta alguna de sus consecuencias clínicas, como la anemia megaloblástica. Por este motivo, su prevalencia resulta difícil de establecer. Su causa más habitual es la ingesta inadecuada de la vitamina, aunque también puede aparecer como resultado de una mala absorción, desajustes metabólicos o un aumento en la demanda por parte de ciertos tejidos<sup>1</sup>.

La manera más directa de diagnosticar la deficiencia en folato es mediante la determinación de su concentración en plasma, suero o eritrocitos. Existen dos tipos de pruebas diagnósticas, el ensayo microbiológico y el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de unión a proteínas. El valor de referencia a utilizar depende de la técnica empleada. Para poder comparar las determinaciones de folato realizadas mediante ambas técnicas, debe aplicarse a los resultados obtenidos mediante RIA la corrección propuesta Fazili y colaboradores<sup>77</sup>. Cabe destacar que la realización de las determinaciones mediante radioinmunoensayo en los individuos homocigotos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T puede dar lugar a valores falsamente superiores de folato plasmático a los obtenidos mediante ensayo microbiológico<sup>78</sup>. Molloy y colaboradores<sup>78</sup> proponen que la causa de este fenómeno sea que la reducida actividad enzimática permita la acumulación de derivados o de productos de degradación del folato, que podrían ser detectados mediante el radioinmunoensayo pero que realmente no son biológicamente activos.

Se ha observado que el folato plasmático se halla muy influenciado por la ingesta reciente<sup>79,80</sup>. El folato eritrocitario en cambio, refleja más fielmente el estado en folato a largo plazo, pues la vida media de los eritrocitos es de 120 días y el contenido en folato de los mismos se establece durante la eritropoyesis<sup>81,82</sup>. Chanarin estableció el punto de corte para deficiencia en folato plasmático en 3ng/mL (7nmol/L) y en 140 ng/mL (320 nmol/L) para folato eritrocitario<sup>75,83</sup>.

Tanto el folato plasmático como el eritrocitario pueden hallarse disminuidos en casos de anemia perniciosa por deficiencia de cobalamina, lo que complica el correcto diagnóstico de la deficiencia ya que ambas deficiencias (la de folato y la de cobalamina) dan lugar a efectos hematológicos similares. Por otro lado, es extraño encontrar individuos con concentraciones realmente bajas de folato plasmático en países con fortificación obligatoria de los alimentos, lo que dificulta la tarea de establecer puntos de corte o concentraciones normales.

Aunque la prevalencia de deficiencia en folatos en la población mundial es algo que aún no ha sido totalmente esclarecido, los resultados del estudio NHANES II establecieron la prevalencia de dicha deficiencia en aproximadamente un 10% de la población adulta estadounidense, antes de la fortificación obligatoria de la harina con ácido fólico<sup>84</sup>.

## 6. Políticas de fortificación

Desde que Hibbard, en 1964, propusiera que un estado en folatos alterado se relaciona con diversas complicaciones del embarazo<sup>85</sup>, se realizaron diversos estudios que intentaban aclarar la relación entre consumo de ácido fólico durante el embarazo y los DTNs. Dos de ellos fueron claves en las posteriores decisiones en cuanto a las políticas de fortificación obligatoria de los alimentos.

El primero de ellos, realizado en 1991 por el Medical Research Council (MRC) del Reino Unido, pretendía determinar si la suplementación con ácido fólico alrededor del momento de la concepción podía prevenir la recurrencia de DTNs<sup>16</sup>. Fue un ensayo clínico aleatorizado y a doble ciego donde participaron 1195 gestantes. Aquellas que consumieron diariamente 4 mg de ácido fólico hasta la semana 12 de embarazo tuvieron un riesgo de volver a tener descendencia afectada de DTNs un 72% inferior en relación a las que no lo tomaron.

En 1992, se realizó otro ensayo clínico aleatorizado en Hungría, que tenía como objetivo evaluar si la suplementación con ácido fólico podía reducir el riesgo de aparición de DTNs<sup>86</sup>. Las mujeres fueron repartidas en 2 grupos: uno recibiría un cóctel de vitaminas con 800 µg de ácido fólico y el otro recibiría una mezcla de elementos-traza como cobre, manganeso, zinc, etc. desde un mes antes de la concepción hasta por lo menos los dos meses de gestación. El resultado fue que las malformaciones congénitas fueron más prevalentes en el grupo que recibía los elementos traза que en el que recibía ácido fólico, que redujo el riesgo de tener un embarazo afectado de DTNs a la mitad.

A raíz de estas publicaciones, el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) estableció que aquellas mujeres que hubieran tenido algún embarazo afectado por DTNs deberían consumir 4 mg diarios de ácido fólico desde el momento en que planearan quedarse embarazadas de nuevo<sup>87</sup>. El año siguiente, el USPHS (United States Public Health Service) instaba a todas las mujeres en edad fértil con posibilidades de quedarse embarazadas a consumir 400 µg diarios de ácido fólico con el objetivo de reducir el riesgo de tener un embarazo afectado con DTNs<sup>88</sup>.

En 1996, con la intención de asegurar que todas las mujeres en edad fértil estuvieran consumiendo la cantidad adecuada de ácido fólico para prevenir la aparición de DTNs, los Estados Unidos de América (EUA) establecieron una política de fortificación obligatoria con ácido fólico de los cereales y sus derivados, que finalmente fue implementada en 1998<sup>89</sup>. Esta política se ha extendido a más de 50 países en los últimos años<sup>90</sup>, aunque no todos fortifican con la misma cantidad de ácido fólico. Por ejemplo, en los EUA se añaden 140 µg de ácido fólico por cada 100 g de harina<sup>89</sup>, mientras que en Sudáfrica son 150 µg<sup>91</sup>, en Costa Rica 180 µg<sup>92</sup> y en Chile hasta 220 µg<sup>93</sup>.

A pesar de estas diferencias en cuanto a las dosis, la fortificación obligatoria de los alimentos ha conseguido aportar la cantidad recomendada de ingesta de ácido fólico a la población diana<sup>91,92,94,95</sup>. Y no solo a la población diana, sino a toda la población general. En el estudio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), entre los periodos 1988-1994 (pre-fortificación) y 1999-2004 (post-fortificación), la concentración de folato plasmático sufrió un incremento de 7.5 ng/mL<sup>96</sup>. De manera similar, en el Framingham Offspring Study el incremento fue de 5.4 ng/mL entre los

períodos 1991-1994 y 1997-1998 en los participantes de entre 32 y 80 años que no consumieron suplementos vitamínicos<sup>97</sup>.

## 7. Exceso de folato

Además de los alimentos fortificados que a menudo superan los 140 µg de ácido fólico por cada 100 g de producto<sup>98</sup> estipulados por ley, un 40% de la población estadounidense consume algún tipo de suplemento vitamínico<sup>99</sup>. No es difícil por tanto superar el UL para ácido fólico sintético, que se encuentra en 1 mg diario. Esta cantidad es la quinta parte de la cantidad más baja que produce efectos adversos, como el enmascaramiento de la deficiencia de cobalamina al retrasar la aparición de la anemia<sup>75</sup>. Dicho enmascaramiento podría retrasar su diagnóstico y por tanto permitir el progreso de las neuropatías asociadas a la deficiencia de cobalamina.

El análisis de la cobalamina plasmática, que permitiría distinguir a los individuos deficientes de los que tienen un buen estado en cobalamina, es la opción más utilizada para valorar el estado en cobalamina. El punto de corte para deficiencia es <148 pmol/L y para definir estrés sobre las reservas es <221 pmol/L. Estos puntos de corte están basados en la aparición de síntomas clínicos (neurológicos, cognitivos y/o hematológicos) que se dan normalmente por concentraciones de cobalamina sérica <148 pmol/L, o bien por la presencia de otros signos bioquímicos de insuficiencia como un aumento de las concentraciones de tHcy y/o de ácido metilmalónico (>271 nmol/L)<sup>100</sup>, un marcador sensible a la deficiencia funcional de cobalamina<sup>101</sup>, que suelen comenzar con concentraciones de cobalamina plasmática <221 pmol/L<sup>75</sup>.

Morris y colaboradores<sup>102</sup> exploraron las asociaciones entre folato sérico, deficiencia en cobalamina, anemia y alteraciones cognitivas en adultos de edad avanzada participantes en el estudio NHANES 1999-2000 (post-fortificación). Aquéllos con deficiencia de cobalamina fueron significativamente mayores y tuvieron menores concentraciones de folato sérico. Los autores hallaron una interacción significativa entre el estado en cobalamina y el estado en folato. El grupo deficiente en cobalamina con elevado estado en folato tenía dos veces más probabilidades de ser anémico en comparación con el grupo deficiente en cobalamina pero con un adecuado estado en folato. Además, en aquellos individuos con un correcto estado en cobalamina, una mayor concentración de folato se asoció con un mejor estado cognitivo, mientras que entre los participantes deficientes en cobalamina la prevalencia de alteraciones cognitivas fue casi el doble en aquéllos con elevado estado en folato en comparación con los que tenían un estado en folato normal.

Se ha puntualizado que los participantes de aquellos estudios que han concluido que elevadas concentraciones de ácido fólico exacerban la deficiencia en cobalamina podrían haber desarrollado la

combinación cobalamina baja - folato elevado a causa de la coexistencia de condiciones médicas que afectaban a la absorción de cobalamina, en particular anemia perniciosa.

Así pues, con la intención de evitar estos posibles efectos confusores, un grupo de investigadores llevó a cabo un estudio en una población joven (de estudiantes de universidad) de 2507 individuos sin comorbilidades asociadas<sup>103</sup>. Hallaron que el grupo con la combinación cobalamina baja – folato elevado no difería del grupo cobalamina baja – folato normal en cuanto a concentraciones de cobalamina sérica, ferritina o hemoglobina. Tras ajustar por edad, sexo, ferritina, creatinina, genotipo *MTHFR*, hábito tabáquico y consumo de alcohol, pertenecer al grupo cobalamina baja – folato elevado no resultó ser un predictor significativo de anemia en comparación con el grupo cobalamina baja – folato normal. Además, en ninguno de los grupos hubo sujetos con macrocitosis. Por lo tanto, los autores concluyen que tomar suplementos con ácido fólico o grandes cantidades de alimentos fortificados no exacerba la deficiencia en cobalamina, al menos no en una población joven sin problemas de salud subyacentes. Cabe destacar, que aunque los autores recogieron información sobre la edad, el sexo, talla, peso, uso de suplementos y hábitos tóxicos, no disponían de información sobre la dieta para completar el cuadro de exposición al folato y la cobalamina. Otra limitación del estudio es la muestra relativamente pequeña y preferentemente femenina en el grupo de cobalamina baja – folato elevado.

Miller y colaboradores<sup>104</sup> compararon los indicadores metabólicos del estado en cobalamina en un estudio transversal en población latina de edad avanzada entre aquellos con elevado y no elevado estado en folato plasmático. Hallaron que aquellos individuos con cobalamina baja y folato elevado tenían concentraciones superiores de tHcy y ácido metilmalónico en relación al resto de grupos. Con ello, concluyeron que un estado bajo en cobalamina plasmática se asocia con una evidencia metabólica más pronunciada de deficiencia en cobalamina cuando el folato plasmático es elevado que cuando no lo es.

Parece por tanto, que son necesarios más estudios de cohortes realizados en muestras suficientemente grandes y sin patologías previas para esclarecer si un elevado estado en folato puede ser perjudicial para el estado en cobalamina, con las consecuencias clínicas que ello conlleva.

Por otro lado, si se sobrepasa la capacidad del organismo de reducir ácido fólico, es posible hallar ácido fólico no metabolizado circulante en sangre. Un estudio realizado en Irlanda sugirió que es posible encontrar ácido fólico no metabolizado tras consumir una cantidad superior a 200 µg de ácido fólico<sup>105</sup>, un umbral que no resulta difícil superar mediante el consumo de suplementos o de alimentos fortificados como cereales de desayuno.

Troen y colaboradores<sup>106</sup> describieron una asociación entre elevadas concentraciones de ácido fólico no metabolizado en suero y una menor actividad citotóxica de las células *natural killer* en una población de mujeres obesas postmenopáusicas. La citotoxicidad disminuida podría aumentar el

riesgo y/o la severidad de infecciones y se ha relacionado con un aumento en la incidencia de cáncer en una cohorte japonesa<sup>107</sup>.

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido una relación inversa entre el estado en folatos y el riesgo de numerosos tipos de cáncer, aunque para el que existe más evidencia es el cáncer colorectal<sup>46</sup>. En el Nurses' Health Study se halló una reducción del 75% del riesgo de sufrir cáncer colorectal en aquellas mujeres que habían tomado suplementos vitamínicos con dosis superiores a los 400 µg de ácido fólico durante más de 15 años en comparación con aquéllas que no los tomaron<sup>108</sup>.

Sin embargo, es bien conocido el efecto dual del ácido fólico sobre el proceso de carcinogénesis. La deficiencia en folato tiene un efecto inhibitorio sobre la progresión de neoplasias colorectales ya establecidas mientras que la suplementación con ácido fólico tiene un efecto promotor. En el lado opuesto, en una mucosa colorectal normal, la deficiencia en folato predispone a la transformación neoplásica y la suplementación moderada con ácido fólico la suprime, mientras que dosis muy elevadas de ácido fólico podrían potenciar el desarrollo de cáncer colorectal<sup>24,46</sup>.

Con estos conocimientos previos, se llevó a cabo el Aspirin/Folate Polyp Prevention Study en 9 centros de Estados Unidos y Canadá<sup>109</sup>. Este estudio comparó el efecto de 81 mg/día o 325 mg/día de aspirina con placebo y de 1 mg/día de ácido fólico con placebo en individuos con historia previa de adenomas colorectales. Se realizaron dos colonoscopias a posteriori, la primera a los 3 años y la segunda entre 3 y 5 años más tarde. No se encontró efecto de la suplementación con ácido fólico sobre la recurrencia de adenomas. Sin embargo, en la segunda colonoscopia realizada a los participantes suplementados se halló un riesgo un 67% superior de tener lesiones avanzadas con un elevado potencial malignizante así como el doble de riesgo de tener al menos 3 adenomas. Otro hallazgo inesperado fue que aumentó el riesgo de tener otros tipos de cáncer que no fuera colorectal en el grupo suplementado con ácido fólico. Además, la suplementación con ácido fólico no tuvo efectos significativos sobre la incidencia de infarto de miocardio o accidente vascular cerebral, aunque se esperaba se hubiera reducido a causa de la disminución de la Hcy asociada al uso de suplementos con ácido fólico.

Aunque los hallazgos de este estudio confirman las observaciones realizadas en modelos animales<sup>40,110</sup>, hay que tener en cuenta que este estudio se diseñó con el objetivo de realizar prevención secundaria - y no primaria - de los adenomas colorectales. Así pues, a los participantes se les habían extirpado adenomas colorectales antes de entrar a formar parte del estudio y puede que precisamente por ello estuvieran predispuestos a desarrollar lesiones similares. Puede que el ácido fólico promoviera la progresión de lesiones preneoplásicas existentes no diagnosticadas.

Recientemente se ha publicado un estudio realizado con los datos procedentes del Cancer Prevention Study II, en el que participaron cerca de 100000 hombres y mujeres sanos. No se asoció el



riesgo de sufrir cáncer colorectal con la elevada ingesta de folato natural ni de ácido fólico sintético. En cambio sí se asoció inversamente la ingesta de folato total con el riesgo de sufrirlo. Los autores concluyen que no hay evidencia de que la fortificación o suplementación con esta vitamina incremente el riesgo de sufrir cáncer colorectal<sup>111</sup>.

El mensaje que se extrae de estos estudios es que no debería suplementarse con ácido fólico a individuos con adenomas colorectales previos, pues pueden estar predispuestos a transformaciones neoplásicas. Esto aplica a una amplia proporción de la población norteamericana, pues se calcula que entre el 25% y el 50% de la población de Estados Unidos y Canadá de más de 50 años tiene adenomas colorectales asintomáticos, y que esta prevalencia aumenta con la edad<sup>112</sup>.

## 8. Absorción y transporte

### 8.1. Sistemas de transporte de folato

El transporte de folato a través de membrana está mediado por distintos procesos. En cuanto a la captación de folato por la célula, el sistema más estudiado hasta la fecha es el mediado por el *reduced folate carrier* (RFC), una proteína de 591 aminoácidos con 12 dominios transmembrana que pertenece a la superfamilia de los transportadores de solutos. No obstante, se conocen otros sistemas de transporte complementarios como el recientemente identificado *proton-coupled folate transporter* (PCFT), que también pertenece a la superfamilia de los transportadores de solutos y resulta esencial en la absorción intestinal de folato o los receptores de folato (FRs), que lo captan mediante un proceso endocítico. La expulsión de folato de la célula está mediada por proteínas transportadoras ligadas a ATP y otros transportadores de solutos.

#### 8.1.1. *Reduced folate carrier* (RFC)

El RFC, también llamado SLC19A1, es el principal transportador que libera folato a los tejidos de todo el cuerpo a pH neutro. Este transportador se expresa de manera ubicua en el ser humano. Los niveles más altos de expresión en tejido humano se detectaron en placenta, lo que sugiere un papel importante del RFC en el transporte trasplacentario de folato. También se detectaron niveles altos de expresión en hígado, leucocitos, riñón, pulmones, médula ósea y duodeno, así como en algunas zonas del sistema nervioso central y el cerebro. También, aunque en menor medida se detectó expresión en corazón y músculo esquelético<sup>113</sup>. Alcanza su óptima actividad a pH 7.4, y ésta disminuye a medida que disminuye el pH, siendo casi inexistente por debajo de 6.5<sup>114</sup>. Aunque tiene una afinidad relativamente baja por el folato reducido ( $K_t \approx 3\mu\text{M}$ ), tiene muy poca por el ácido fólico ( $K_t \approx 200\mu\text{M}$ )<sup>2</sup>. La energía necesaria para este transporte proviene del gradiente transmembrana de iones fosfato orgánico<sup>115</sup> que se generan en las reacciones celulares dependientes de ATP.

Este transportador es esencial para el desarrollo embrionario. En un estudio llevado a cabo en ratones se ha descrito que la inactivación de ambos alelos del gen provoca la muerte del embrión antes del día 9.5. No obstante, al suplementar a las madres de aquellos ratones con 1 mg diario de ácido fólico, los investigadores consiguieron que nacieran vivos los embriones a los que se les había inactivado dicho gen, e incluso sobrevivían hasta el día 12 de vida<sup>116</sup>.

### 8.1.2. *Proton coupled folate transporter (PCFT)*

El PCFT es el principal responsable de la absorción intestinal de folato. Se expresa preferentemente en duodeno y yeyuno proximal<sup>117-119</sup>. Se trata de un transportador de folato de alta afinidad con un pH óptimo bajo. Funciona como un simportador folato-protones, el flujo de protones a favor de gradiente está acoplado a un flujo de folato en contra de gradiente hacia el interior de las células. Por cada molécula de folato transportada, deben co-transportarse también dos protones<sup>117</sup>.

El gen que codifica este transportador consta de 5 exones y 4 intrones. Qiu describió en 2006 un cambio de una guanina por una adenina en la posición 1082, que compromete un sitio de splicing y que por tanto conlleva la pérdida del tercer exón. La proteína resultante pierde la función de transporte y queda atrapada en el citosol, pues no se detecta en membrana<sup>117</sup>, lo que lleva a desarrollar malabsorción hereditaria de folato. Esta enfermedad no solo viene dada por esta mutación, sino que hay descritas otras 15 variantes que tienen como resultado la aparición de la enfermedad, cuyas principales características son:

- Absorción intestinal de folato alterada, que resulta en una deficiencia severa de folato
- Transporte de folatos al sistema nervioso central alterado. Apenas se detecta folato en el líquido cefalorraquídeo.

Los individuos heterocigotos para esta mutación son aparentemente sanos, ya que solo son portadores de la enfermedad. Los homocigotos son también aparentemente sanos al nacer. No presentan defectos del tubo neural (DTN), lo que indica que hay un correcto aporte de folato de la madre a través de la placenta. Los signos de la enfermedad aparecen tras varios meses, cuando las reservas procedentes de la madre se agotan. Entonces desarrollan anemia, inmunodeficiencia, diarrea y retraso en el desarrollo neurológico<sup>120</sup>.

### 8.1.3. *Receptores de folato*

Existen 4 tipos de receptores de folato, y todos ellos unen con elevada afinidad tanto folatos reducidos como ácido fólico,<sup>121,122</sup> y los transportan mediante un proceso endocítico<sup>123,124</sup>. Una vez en el citoplasma, la vesícula se acidifica, el folato se libera de su receptor y se exporta del endosoma gracias a un mecanismo mediado en parte por el PCFT. Están implicados en el transporte de folato a través de determinados tejidos, y especialmente en el desarrollo embrionario y fetal.

Tres de ellos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ) están anclados a la membrana plasmática mediante un dominio glicosilfosfoinositol (GPI)<sup>125,126</sup>, mientras que el cuarto ( $\gamma$ ) es una proteína secretada debido a la falta de una señalización eficiente para la modificación GPI cuyo papel fisiológico aún no ha sido esclarecido<sup>127</sup>.

El gen del FR $\delta$  fue identificado como un nuevo potencial receptor de folato mediante una estrategia de *database mining*, y se predijo que producía una proteína de 241 aminoácidos que más tarde no pudo detectarse en tejido humano, lo que sugiere que su patrón de expresión podría estar restringido espacial o temporalmente<sup>128</sup>.

FR $\alpha$  y FR $\beta$  transportan folato al interior de la célula mediante un mecanismo endocítico<sup>123,124</sup> aunque con escasa eficiencia en comparación con el RFC<sup>129</sup>.

En cuanto a la expresión de FR $\alpha$ , Weitman y colaboradores<sup>130</sup> determinaron que ésta se restringía a los epitelios del plexo coroideo, de los túbulos proximales del riñón y del epidídimo, a las células acinares mamarias, las glándulas bronquiales y salivares submandibulares, los pneumocitos I y II y a las células del trofoblasto en la placenta. Más tarde se observó que este receptor también se hallaba en el epitelio germinal del ovario, la trompa de Falopio, el epitelio superficial del útero y en el endocérnix así como en el epitelio glandular del mismo<sup>131</sup>. Aunque las proteínas ancladas a membrana mediante un dominio GPI suelen expresarse en la membrana apical (luminal) de las células epiteliales polarizadas, cuando FR $\alpha$  se expresa en las células del epitelio pigmentario de la retina, lo hace en la membrana basolateral<sup>132</sup>. FR $\alpha$  también se expresa sistemáticamente en adenocarcinoma no mucinoso de ovario, adenocarcinoma uterino, coriocarcinoma testicular, tumores cerebrales ependimarios y adenoma de la pituitaria, frecuentemente en mesotelioma pleural maligno y menos frecuentemente en carcinoma de mama, colon y renal<sup>131,133-138</sup>.

FR $\beta$  se expresa en placenta y en células y tejidos hematopoyéticos tales como monocitos CD34+, bazo y timo<sup>139-142</sup>. Este receptor también se expresa en la leucemia mieloide aguda y crónica<sup>141,142</sup>.

Con el objetivo de estudiar el transporte de folato a través de estos receptores durante la embriogénesis, se han desarrollado numerosos modelos animales en ratones mutantes. La inactivación del gen murino para el FR $\alpha$  constituye una mutación letal, pues los embriones mueren *in utero* antes incluso del cierre del tubo neural, con considerables anormalidades morfológicas<sup>20,143</sup>. La inactivación del gen murino para el FR $\beta$ , sin embargo, no produjo efectos adversos en desarrollo de los embriones<sup>20</sup>.

#### 8.1.4. Proteínas transportadoras ligadas a ATP y otros transportadores de solutos

Más allá de aquellos transportadores específicos de folato, existen otras rutas potenciales de transporte de folato. Entre las proteínas transportadoras ligadas a ATP se encuentran las *multidrug-resistance associated proteins* (MRP1 a MRP5), y la *breast cancer resistance protein* (BCRP)<sup>144-146</sup>. Éstas son transportadores de baja afinidad y elevada capacidad que se expresan ampliamente en las células de los mamíferos y suprimen el exceso de folatos libres o antifolatos que se acumulan en la mayoría de células que crecen *in vitro*<sup>144</sup>.

#### 8.2. Absorción y transporte intestinal

La mayor parte del folato de la dieta se presenta como una mezcla de formas poliglutamadas que difieren en la longitud de la cadena de glutamatos, en su estado de oxidación o en los sustituyentes bioquímicos<sup>1</sup>. Para que la molécula de folato pueda ser absorbida por los enterocitos de la mucosa intestinal del yeyuno, la cadena de glutamatos debe ser hidrolizada hasta conseguir una forma monoglutamada de folato<sup>147,148</sup>. La enzima responsable de esta desconjugación es la folilpoli- $\gamma$ -glutamato carboxipeptidasa II<sup>149</sup>, que funciona como una exopeptidasa eliminando los glutamatos terminales secuencialmente a un pH óptimo de entre 6.5 y 7<sup>150</sup>.

El siguiente paso en el proceso de absorción del folato de la dieta es el transporte del folato monoglutamado a la circulación sanguínea a través de la mucosa intestinal para poder alcanzar aquellas reacciones para las que es esencial. El mecanismo mediante el cual el folato cruza el enterocito y pasa a la circulación portal aún no se comprende en su totalidad.

El metabolismo del folato a 5-metilTHF puede tener lugar en este momento, aunque esto no es esencial para su transporte. El grado de metabolismo del folato en la mucosa intestinal dependerá de la dosis consumida. Cuando se administran dosis farmacológicas de ácido fólico, la mayor parte aparece en la circulación portal como ácido fólico no metabolizado. Una fracción de éste puede ser metabolizado a 5-metilTHF en el hígado, pero otra puede aparecer inalterada en la circulación periférica<sup>151</sup>.

Tanto el PCFT como el RFC se expresan en la membrana apical de los enterocitos, y sus mRNAs se hallan elevados en situaciones deficitarias de folato<sup>152</sup>. Sin embargo, parece que el folato entra a la célula principalmente a través del PCFT, cuyo pH óptimo es de aproximadamente 5.5, el mismo al que se encuentra la mucosa intestinal. RFC no funcionaría correctamente en estas condiciones. Ninguno de estos dos transportadores se expresa en la membrana basolateral del enterocito, y parece que el flujo de folato hacia la circulación portal está mediado por la MRP3<sup>153</sup>.

### 8.3. Transporte a los tejidos

Tras la absorción del folato y su paso a la circulación portal, gran parte de éste puede ser captado por el hígado, donde puede ser transformado en derivados poliglutamados y retenido intracelularmente, o puede ser liberado a la sangre o la bilis. Se ha descrito una circulación enterohepática mediante la cual se liberaría 5-metilTHF a la bilis via MRP2<sup>154</sup> y se reabsorbería a nivel intestinal<sup>152</sup>.

El folato plasmático, principalmente 5-metilTHF, se halla unido a proteínas de unión a folato de baja afinidad. Un 50% del folato plasmático circulante se halla unido a albúmina, aunque esta proporción puede estar aumentada en casos de deficiencia de folato<sup>2</sup>. Una proporción más pequeña de folato plasmático está unido con elevada afinidad a la forma soluble del FR, el FR $\gamma$ <sup>127</sup>, aunque el efecto de la unión proteica de folato sobre su biodisponibilidad aún se desconoce.

El transporte de folato a la mayoría de tejidos se realiza principalmente mediante el RFC<sup>152</sup>. El plexo coroideo, que suministra folato al líquido cefaloraquídeo, expresa niveles elevados de FR $\alpha$  y de PCFT en la membrana basolateral y de RFC en la apical<sup>152</sup>. PCFT y RFC también se expresan en la barrera hematoencefálica, que suministra folato al parénquima cerebral. Aunque inicialmente se creía que el FR $\alpha$  captaba el folato para el cerebro, este receptor no se encontró ni en la barrera hematoencefálica ni en cerebro<sup>155</sup>. El pH neutro al que se encuentra parece concordar con la idea de que el RFC es el responsable de este transporte.

La mayoría de folato plasmático no unido a proteínas se filtra libremente en el glomérulo y se reabsorbe eficazmente en los túbulos proximales del riñón, de manera que con una ingesta habitual, apenas se pierde folato por la orina. Esta reabsorción se lleva a cabo mediante el FR $\alpha$ <sup>156</sup>. A causa de la elevada afinidad de este receptor por el ácido fólico, esta forma de la vitamina podría acumularse en grandes cantidades en el riñón.

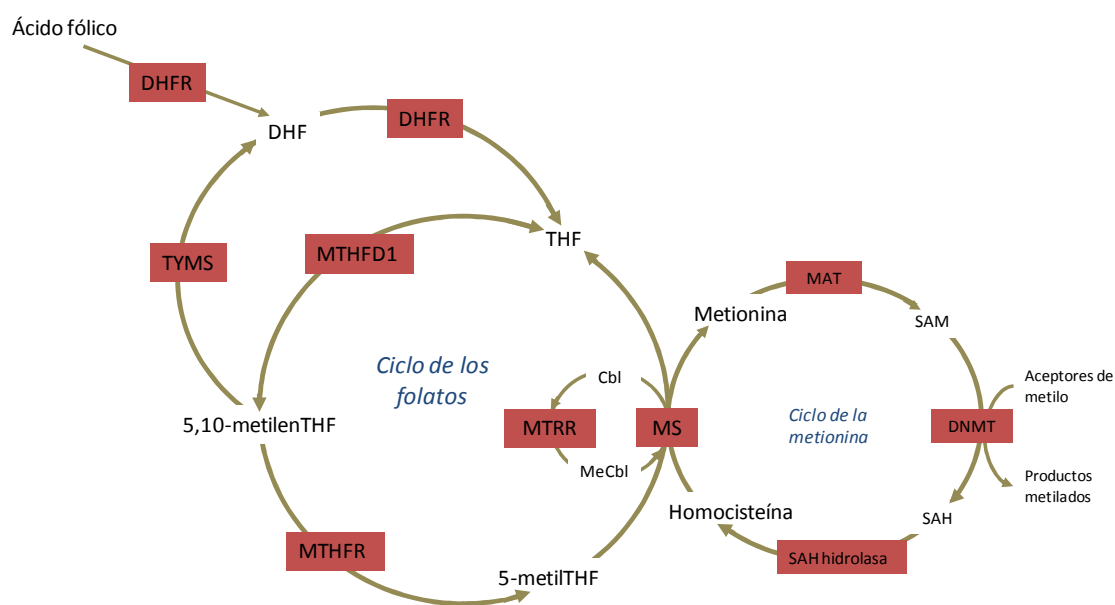
## **9. Metabolismo celular del folato**

La mayor parte del folato presente en los tejidos se halla en forma poliglutamada, mientras que las formas monoglutamadas se hallan en plasma y orina<sup>157</sup>. Así pues, para ser retenido intracelularmente, el folato debe ser poliglutamado por la folilpoliglutamil sintasa.

Aproximadamente el 50% del folato retenido en la célula se halla en la mitocondria, pudiendo variar en función del tipo celular<sup>158,159</sup>. La forma predominante de folato en la mitocondria es el 10-formilTHF, mientras que en el citosol es el 5-metilTHF<sup>158</sup>. Aunque el folato citosólico y el mitocondrial constituyen dos reservorios distintos con funciones distintas, en el metabolismo mitocondrial del

folato se generan unidades de carbono (vía formato) esenciales para el metabolismo monocarbonado en el citosol<sup>160</sup>.

La forma predominante de folato en la dieta es el 5-metilTHF<sup>121</sup>. La utilización de esta forma de folato por parte de la célula comienza con la remetilación de la Hcy a metionina (Figura 3). El THF liberado puede transformarse mediante la enzima metilénTHF deshidrogenasa-metenilTHF ciclohidrolasa-formilTHF sintetasa (MTHFD1) en 5, 10-metilénTHF, imprescindible para la síntesis de novo de purinas y pirimidinas mediante la timidilato sintasa (TYMS). El 5, 10-metilénTHF es reducido de nuevo a 5-metilTHF mediante una reacción irreversible mediada por la enzima 5, 10-metilen THF reductasa (MTHFR). También puede producirse THF a través de la reducción de dihidrofolato (DHF) a THF mediante la DHF reductasa (DHFR), que también cataliza la conversión de ácido fólico a DHF. Esta enzima puede saturarse cuando se administran dosis orales superiores a los 280 µg, resultando en la aparición de ácido fólico no metabolizado en plasma<sup>151,161,162</sup>(ver "6. Políticas de fortificación").



**Figura 3. Integración del ciclo de los folatos y la metionina.** DHFR: Dihidrofolato reductasa. DHF: Dihidrofolato. TYMS: Timidilato sintasa. MTHFD1: MetilénTHF deshidrogenasa - metenilTHF ciclohidrolasa - formilTHF sintetasa. THF: Tetrahydrofolato. MAT: Metionina adenosil transferasa. SAM: S-adenosilmetionina. Cbl: Cobalamina. MTRR: Metionin sintasa reductasa. MS: Metionin sintasa. DNMT: DNA metiltransferasa. MeCbl: Metilcobalamina. SAH: S-adenosilhomocisteína. MTHFR: 5,10-metilentetrahydrofolato reductasa.

## 10. Polimorfismos implicados en el transporte y metabolismo del folato

El estado en folatos está regulado por la fuente alimentaria de la vitamina, pero también por los sistemas de absorción y transporte del organismo, así como por polimorfismos que pueden interferir en cualquiera de estos mecanismos o en el metabolismo de los folatos. Si bien algunos de estos

polimorfismos dan como resultado fenotipos que no conllevan alteraciones clínicas, el impacto sobre la población es importante debido a que se hallan vinculados a multitud de reacciones relacionadas con una amplia variedad de patologías.

La fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico sintético no obstante, podría enmascarar el efecto de la carga genética sobre el estado en folatos. Por ello sería interesante disponer de una muestra no expuesta a fortificación obligatoria con ácido fólico a fin de dilucidar de qué manera la genética es un factor determinante del estado en folatos de la población.

A continuación se presentan algunos de los polimorfismos que presentan ciertas enzimas clave del transporte o metabolismo del folato (*Figura 4*).

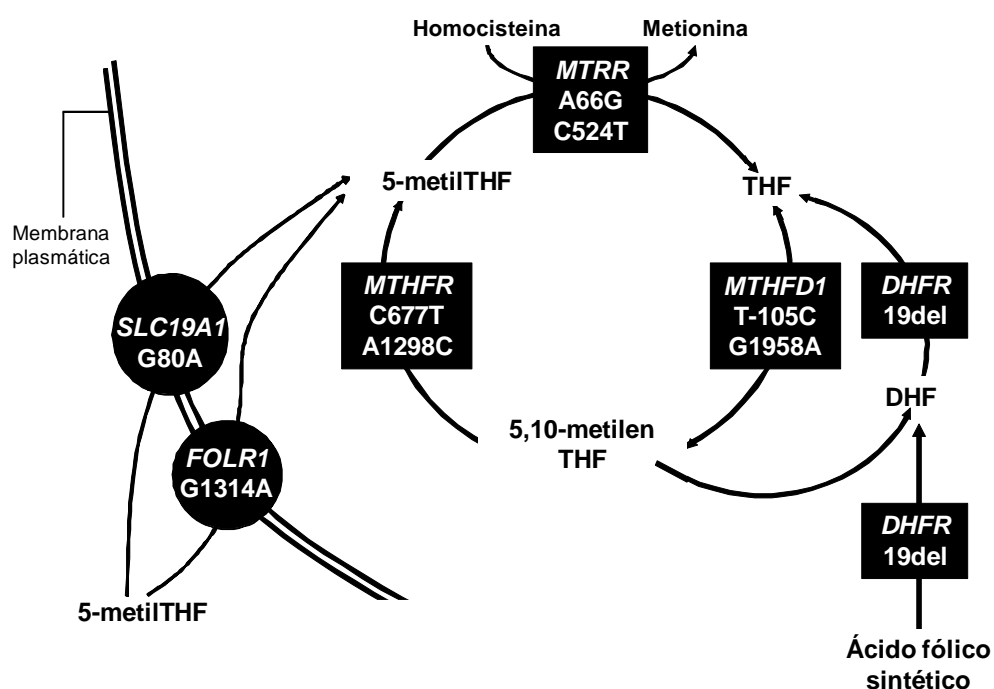


Figura 4. Polimorfismos a estudiar presentes en el ciclo de los folatos

### 10.1. Reduced folate carrier (*SLC19A1*)

Como ya se ha comentado anteriormente, el RFC es un transportador bidireccional de folatos con preferencia por los folatos reducidos. Resulta esencial en la captación de folato circulante por la célula.

El gen que codifica para el RFC humano presenta varios polimorfismos, aunque no todos implican un cambio aminoacídico. El más estudiado es el *SLC19A1* 80G>A<sup>163</sup>, que conlleva un cambio de arginina por histidina (R27H) en el primer dominio transmembrana<sup>164</sup>. La frecuencia de homocigotos para este polimorfismo se sitúa entre el 22% y el 27% en Europa<sup>163,165-167</sup>, en torno al

11% en americanos caucásicos<sup>165</sup>, alrededor del 41% en afroamericanos<sup>165</sup> y entre el 19% y el 22% en población china<sup>168,169</sup>.

El lugar donde se halla esta mutación hace suponer que la actividad enzimática se verá afectada. Sin embargo, su actividad no se vio afectada por esta variante en células transfectadas<sup>164</sup>. Numerosos estudios no han hallado que este polimorfismo de manera aislada tenga un impacto relevante sobre las concentraciones de tHcy<sup>170-173</sup>, folato plasmático<sup>163,170,172,173</sup> o folato eritrocitario<sup>163,173</sup>. No obstante, otros estudios han hallado tendencias no significativas que relacionan el genotipo GG con un folato eritrocitario más bajo<sup>166,171</sup>. Por el contrario, un estudio realizado en Noruega con más de 10000 participantes encontró que aquellos genotipos con el alelo A se asociaban con una tendencia prácticamente significativa a una menor concentración de folato plasmático<sup>167</sup>. En el mismo sentido, Stanislawska-Sachadyn y colaboradores describieron la presencia de concentraciones mayores de folato eritrocitario en aquellas mujeres con genotipos que incluían el alelo A del polimorfismo, aunque esto no se reprodujo en los participantes masculinos del mismo estudio<sup>174</sup>. Además, tres estudios han obtenido evidencias de que el efecto del polimorfismo *SLC19A1* 80G>A podría estar influenciado por el polimorfismo *MTHFR* 677C>T. En estos casos se observó que aquellos individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT- *SLC19A1* 80GG presentaban concentraciones de tHcy superiores a las de los individuos con otras combinaciones genotípicas de los mismos polimorfismos<sup>163,170,173</sup>.

Cabe destacar que existe confusión en la literatura en cuanto a la nomenclatura de este polimorfismo, debido a que las frecuencias de los dos genotipos homocigóticos son muy similares y no permiten esclarecer qué alelo es el más común en la población. Numerosos autores hacen referencia a él como 80G>A<sup>163,167,170-176</sup> mientras que otros<sup>168,177-181</sup> e incluso la base de datos de polimorfismos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>182</sup> lo cita como 80A>G.

En cuanto a su asociación con riesgos para la salud, el genotipo *SLC19A1* 80GG se ha relacionado con un riesgo 4.6 veces mayor de tener descendencia con DTNs cuando el estado en folato eritrocitario materno es bajo<sup>166</sup>. La combinación del genotipo *SLC19A1* 80GG o *SLC19A1* 80GA con una baja ingesta materna de folato también se asoció con un riesgo 3.88 y 4.24 veces mayor respectivamente de tener un hijo afectado por DTNs en un estudio realizado en población china<sup>168</sup>. Parece que este polimorfismo también podría ser un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular, aunque los resultados no acaban de ser concluyentes<sup>169,183</sup>.

## 10.2. Receptor de folato $\alpha$ (*FOLR1* o *FR $\alpha$* )

De manera similar al RFC, aunque con mayor preferencia con las formas oxidadas de folato, el receptor de folato  $\alpha$  constituye una vía esencial de captación del folato circulante en ciertos tejidos.

Zhang y colaboradores<sup>184</sup> analizaron el gen que codifica para el FR $\alpha$  en humanos, y detectaron nuevas mutaciones en los exones 2 y 3 del gen en población china. Más tarde, Böttiger y



colaboradores analizaron dos de las mutaciones descritas por Zhang (1314G>A y 1816delC) y colaboradores en una población sueca de edad avanzada<sup>185</sup>, donde hallaron frecuencias alélicas menores que las descritas en China.

### 10.3. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

Se han identificado más de 30 polimorfismos en la región codificante del gen que codifica la MTHFR, si bien dos de ellos han sido los más estudiados.

Frosst y colaboradores<sup>186</sup> identificaron el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T en el exón 4 del dominio catalítico de la MTHFR, que resulta en un cambio de alanina por valina en el codón 222 (A222V). Esta variante genética da como resultado una enzima termolábil con actividad reducida<sup>186</sup> debido a la disociación de su componente prostético FAD<sup>187,188</sup> que provoca una reducción del 5-metilTHF disponible para la remetilación de la Hcy, aumentando de esta manera su concentración<sup>167,170,186,189-193</sup>.

Su prevalencia varía entre regiones y grupos étnicos, siendo más prevalente en caucásicos<sup>194</sup>. En la población mediterránea española la prevalencia de individuos homocigóticos se sitúa en torno al 16%, donde el alelo T se detecta en una proporción de 0.42 según Guillén y colaboradores<sup>195</sup>. Wilcken y colaboradores realizaron un estudio multicéntrico con individuos de distintos países europeos, Oriente Medio, Asia, América y Australia. En España situaron la frecuencia de homocigóticos en un 12%, con una proporción del alelo T de 0.34. En este estudio se detectó un gradiente geográfico norte-sur para la prevalencia de individuos homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T. Así, la frecuencia de individuos TT aumentaba desde valores bajos en el norte (4-7% en Finlandia o Rusia), pasando por valores intermedios (8-10%) en Francia y Hungría, a valores elevados en el sur de Europa (12-15% en España y norte de Italia), alcanzando picos en el sur de Italia (20-26% en la región de Campania y en Sicilia)<sup>194</sup>.

Diversos estudios han relacionado la presencia de este polimorfismo con un riesgo aumentado de muerte prematura por enfermedad cardiovascular<sup>196</sup> y enfermedad coronaria<sup>197,198</sup>, DTN<sup>199-201</sup>, preeclampsia<sup>202</sup>, cáncer<sup>203,204</sup> y otras patologías derivadas de elevadas concentraciones de Hcy plasmática total en ayunas (tHcy) o de un estado deficiente en folatos. El riesgo de estas patologías puede verse acentuado en aquellos individuos homocigóticos que además tengan una ingesta inadecuada de folato. Estos sujetos necesitan una mayor ingesta de folato, o incluso quizá fortificación o suplementación para alcanzar la misma concentración de folato plasmático que los individuos CC<sup>190,205</sup>.

Algo más tarde, Van de Put y colaboradores<sup>206</sup> identificaron un polimorfismo en el exón 7 del dominio regulador de la MTHFR, el *MTHFR* 1298A>C, que resulta en un cambio de glutamato a alanina en el codón 429 (E429A). Su prevalencia varía entre regiones y grupos étnicos, situándose en

torno al 8.5% para individuos homocigóticos en la población mediterránea española, donde la proporción del alelo C es de 0.3<sup>207</sup>. Este polimorfismo da como resultado una actividad reducida de la enzima MTHFR tanto en individuos homocigóticos como heterocigóticos que no tiene efectos sobre la concentración de tHcy de manera individual<sup>206</sup> ni sobre la concentración de folato plasmático o eritrocitario<sup>208</sup>. Van der Put y colaboradores informaron de que la doble heterocigosidad para los polimorfismos 677 y 1298 de MTHFR (CT y AC respectivamente) se asociaba con una concentración de tHcy superior a la del genotipo CT/AA. No obstante, este hallazgo no pudo ser confirmado en estudios posteriores<sup>170,209</sup>. Por el contrario, en un estudio llevado a cabo en mujeres de edad fértil, se indicó la posibilidad de que los polimorfismos 677 y 1298 de MTHFR tuvieran efectos opuestos sobre la concentración de folato eritrocitario<sup>210</sup>.

#### 10.4. MetilénTHF deshidrogenasa-MetenilTHF ciclohidrolasa-FormilTHF sintetasa (*MTHFD1*)

Esta enzima trifuncional presenta dos dominios diferenciados: el dominio deshidrogenasa-ciclohidrolasa y el dominio sintetasa<sup>211</sup>.

Hol y colaboradores<sup>212</sup> identificaron en el exón 20 del dominio sintetasa de esta enzima trifuncional la variante *MTHFD1* 1958G>A, que resulta en un cambio de arginina a glutamina en el codón 653 (R653Q). La frecuencia del genotipo 1958AA en poblaciones europeas se sitúa alrededor del 20%, mientras que la proporción del alelo A es 0.45<sup>167</sup>. Tras la purificación y caracterización de la proteína resultante de este polimorfismo se observó que era menos termoestable que la proteína salvaje<sup>213</sup>. No obstante, no se ha observado que esta variante influya en las concentraciones de tHcy o de folato plasmático o eritrocitario<sup>167,212</sup>. Sin embargo, sí se encontró que dicha variante se asociaba con un riesgo materno mayor para DTN en una población irlandesa<sup>214</sup> y en otra italiana<sup>215</sup>, aunque no fue así en una población holandesa<sup>212</sup>.

Carroll y colaboradores<sup>216</sup> identificaron un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para esta enzima, el *MTHFD1* -105C>T. La presencia del alelo T conlleva una disminución de la actividad transcripcional *in vitro* del 38% respecto a la del promotor "C". La frecuencia del genotipo -105TT en una muestra de la población irlandesa se situó en torno al 32%, mientras que la proporción del alelo T fue 0.57. No se observaron diferencias significativas en cuanto a folato eritrocitario ni a tHcy entre los diferentes genotipos. Tampoco se observó asociación entre este polimorfismo y el riesgo de DTN en la población irlandesa.

#### 10.5. Metionín sintasa reductasa (*MTRR*)

Esta enzima cataliza la conversión de la forma inactiva de la metionín sintasa a la forma activa de la enzima<sup>217</sup>.

Uno de los polimorfismos más estudiados de esta enzima es el *MTRR* 66A>G, ubicado en el exón 2 del gen y que resulta en el cambio de una isoleucina a metionina (I22M). La frecuencia del genotipo *MTRR* 66GG es mayor en blancos (20-38%) que en asiáticos (7-10%) o mejicanos (6-7%)<sup>193,218</sup>.

Aunque la proteína resultante parece tener características cinéticas muy similares a la proteína salvaje, se necesitan cuatro veces más de proteína I22M para alcanzar la máxima actividad enzimática<sup>219</sup>. A pesar de ello, diversos estudios realizados en distintas poblaciones no hallaron que la presencia del polimorfismo de manera individual afecte a las concentraciones de Hcy o folato<sup>167,220-222</sup>. En contra de lo comentado hasta ahora, Gaughan y colaboradores<sup>223</sup> describieron que el genotipo AA se asociaba con un riesgo relativo de 1.58 de tener la tHcy por encima de la mediana. Siguiendo esta tendencia, Yang y colaboradores<sup>193</sup> describieron que los individuos *MTHFR* 677TT/*MTRR* 66GG tenían la tHcy un 25.6% más baja que los individuos *MTHFR* 677TT/*MTRR* 66AA. Por otro lado, en un estudio de casos y controles de espina bífida realizado en Holanda, hallaron que las mujeres con el genotipo 66GG tenían el doble de riesgo de tener descendencia afectada por DTNs que las mujeres con genotipo 66AA<sup>222</sup>. Otros estudios realizados en Polonia<sup>224</sup> e Irlanda<sup>225</sup> sin embargo, no hallaron relación alguna entre la presencia de dicho polimorfismo y el riesgo de sufrir DTNs.

Otro polimorfismo de esta enzima es el *MTRR* 524C>T, que conlleva la sustitución de una serina por una leucina en el codón 175 (S175L). Se conoce muy poco acerca del impacto sobre las concentraciones de folato o tHcy de este polimorfismo, aunque se ha sugerido que las combinaciones 66A/524T o 66G/524C reducían 3 y 4 veces respectivamente la actividad de la metionín sintasa respecto a la actividad de dicha enzima en el haplotipo 66A/524C<sup>219</sup>.

#### 10.6. Dihidrofolato reductasa (DHFR)

Los beneficios de la suplementación o fortificación con ácido fólico dependen en parte del correcto funcionamiento de esta enzima, ya que cataliza la reducción de los folatos oxidados, como el ácido fólico o el DHF a THF.

Johnson y colaboradores<sup>226</sup> identificaron esta delección en el intrón 1 del gen de esta enzima que resulta en la desaparición del lugar de unión para el factor de transcripción Sp1 y que por tanto afecta a la expresión de DHFR. Se encontró que la frecuencia de individuos homocigóticos en una muestra de 35 familias afectadas de espina bífida y 219 controles donde se identificó dicho polimorfismo por primera vez fue del 20%. La proporción del alelo mutado fue de 0.45. Los resultados referentes al efecto del genotipo del/del sobre la tHcy y el folato plasmático no han sido concluyentes hasta la fecha. Gellekink y colaboradores no hallan asociación entre este polimorfismo y el folato plasmático o eritrocitario pero sí describen una disminución de la tHcy en presencia de los genotipos que contienen este alelo<sup>227</sup>. No obstante hay que destacar que esta muestra era muy pequeña, de tan solo 20 individuos caucásicos. Por otro lado, van der Linden y colaboradores no

hallan que esta mutación afecte a la tHcy, pero sí que hallan una tendencia a la baja de la concentración de folato eritrocitario en los genotipos DHFR -/del y del/del<sup>228</sup>. Los estudios sobre la deleción 19bp y los DTN también obtuvieron resultados en conflicto. Johnson y colaboradores concluyeron que cuando este polimorfismo está presente en la madre, actúa como un alelo teratogénico durante el embarazo dando lugar a fetos con fenotipo de espina bífida<sup>226</sup>. Por otro lado, Parle-McDermott defiende que cuando este alelo está presente en la madre, actúa como protector de DTN durante el embarazo<sup>229</sup>, mientras que van der Linden no encuentra asociación entre esta mutación y la espina bífida<sup>228</sup>. Las diferencias entre el estudio de Johnson y colaboradores respecto a los resultado de Parle-McDermott o van der Linden pueden deberse a la diferencia en el tamaño de la muestra (5 veces superior en estos dos últimos estudios en relación al de Johnson) o a que el estudio de Johnson se realizó en una muestra donde las familias afectadas contaban con dos o más casos de espina bífida, mientras que los casos de espina bífida de los otros dos estudios no estaban relacionados entre ellos. Como el propio Jonhson comenta, las familias con dos o más miembros afectados de espina bífida difieren de los casos aislados en cosas que aún no llegamos a comprender<sup>226</sup>. Por otro lado, puede que van der Linden y colaboradores no hallaran relación entre el polimorfismo *DHFR* 19del<sup>228</sup> y la espina bífida debido a que la muestra contaba con la mitad de individuos que la de Parle-McDermott y colaboradores<sup>229</sup>.

Cabe destacar en este punto, que cada unos de los polimorfismos descritos no se encuentran aislados en el organismo, sino que coexisten con otros genes con sus correspondientes polimorfismos, implicados o no en el metabolismo de los folatos. Como se ha indicado en páginas anteriores, el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677C>T puede verse afectado por la presencia simultánea de otros polimorfismos.

## 11.El folato durante el embarazo

Como sabemos, el papel principal del folato es el de transportador de unidades de carbono a una gran cantidad de reacciones críticas para la replicación celular, lo que lo convierte en una vitamina esencial en situaciones que requieran un rápido crecimiento y desarrollo tisular, como es el caso de la gestación.

Diversos investigadores han observado un descenso de las concentraciones de folato plasmático y eritrocitario en mujeres embarazadas que no consumían suplementos de ácido fólico<sup>230,231</sup>. Chanarin describió un descenso medio de 10 nmol/L en el folato plasmático durante todo el embarazo<sup>83,230</sup>. La variación en el folato eritrocitario sin embargo, es distinta, con un descenso al principio del embarazo, y un ligero ascenso hacia la mitad de la gestación<sup>83,232,233</sup>.

Las causas de este descenso pueden ser varias: una ingesta inadecuada de folato<sup>230</sup>, un aumento en su demanda por parte de la madre o del feto<sup>230</sup>, la hemodilución propia del embarazo<sup>234</sup>, una disminución de su absorción<sup>230</sup>, un aumento de su catabolismo<sup>235,236</sup> o del aclaramiento renal<sup>237,238</sup> o incluso la influencia de determinadas hormonas<sup>230</sup>.

Parece lógico que tanto una ingesta inadecuada como un aumento en la demanda de folato contribuyan en parte a estos descensos, pero el papel que juegan los demás factores sobre las reservas de folato no está tan claro.

Bruinse y colaboradores<sup>239</sup> estimaron el volumen plasmático y determinaron la cantidad total de folato circulante en distintos momentos del embarazo y de la lactancia. Observaron que el folato plasmático disminuía un 42% entre las semanas 16 y 34 de embarazo, y que este descenso era muy superior al descenso en la cantidad total de folato circulante (un 28% en el mismo período de tiempo), sugiriendo que el descenso observado en la concentración de folato plasmático no podía explicarse por la hemodilución.

En cuanto al aumento del catabolismo y excreción del folato durante la gestación, los resultados tampoco son esclarecedores. Un grupo de Dublín observó que la excreción de diversos catabolitos de folato durante la parte final del embarazo era mayor que en las mujeres no embarazadas tanto en un estudio piloto realizado con 6 gestantes y seis controles, como en otro posterior con 24 gestantes y 25 controles donde las participantes seguían una dieta estricta exenta de catabolitos exógenos del folato<sup>240,241</sup>. Sin embargo, un grupo americano no halló ningún aumento de los catabolitos de folato durante el segundo trimestre en orina de gestantes que habían recibido una dieta con 120 µg diarios de folato dietético y 330 o 730 µg diarios de ácido fólico sintético<sup>235</sup>. Dicho estudio contaba con 12 gestantes y 12 controles, la mitad que el estudio de Higgins y colaboradores. Los resultados entre ambos estudios no son comparables ya que el tratamiento que recibieron las participantes fue distinto, lo que podría haber alterado la acetilación de los catabolitos, y por tanto haber llevado a una menor detección de los catabolitos de folato en orina.

Tampoco está claro si realmente existe una disminución en la capacidad de absorción del folato durante la gestación. Chanarin y colaboradores<sup>242</sup> hallaron que, tras la ingesta de 15 µg ácido fólico por kilo de peso corporal, el pico de folato sérico era significativamente más bajo en gestantes que en no gestantes, lo que sugería un descenso en la absorción del folato. Más tarde, Landon y colaboradores<sup>243</sup> determinaron el folato plasmático tras la ingesta de la misma dosis de ácido fólico que administraron Chanarin y colaboradores en un grupo de gestantes, un grupo de mujeres que habían dado a luz recientemente y un grupo de hombres adultos. No observaron diferencias significativas entre los 3 grupos, lo que sugería que la absorción de folato no se hallaba alterada en la

gestación. Las diferencias en cuanto a la cantidad de folato administrado y los métodos utilizados en las determinaciones podrían explicar las diferencias entre estos estudios.

La recomendación de ingesta de folato para mujeres embarazadas establecida por el IOM es de 600 DFE diarios. El principal motivo por el que se le da tanta importancia a un correcto aporte de folato durante el embarazo es el de reducir el riesgo de DTNs<sup>16,86</sup>. De hecho, éste fue el principal objetivo en la elaboración de las políticas de fortificación obligatoria de los alimentos que se desarrollaron a finales de los años 90 en diversos países.

Aunque ni en España ni en el resto de Europa se aplican estas políticas, sí se prescribe esta vitamina por los obstetras durante el control prenatal desde el año 2000. La pauta de suplementación recomendada por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) es de 400 µg/día de ácido fólico desde antes de la concepción hasta la semana 12 por lo menos<sup>244</sup>. Sin embargo, tras la semana 12, no existe ninguna recomendación oficial sobre el consumo de ácido fólico, ya que la evidencia sobre la importancia del estado en folato en la parte final del embarazo es menos consistente. No obstante, algunos obstetras prescriben a sus pacientes el uso de suplementos de ácido fólico durante el segundo y tercer trimestre de gestación. ¿Cuál es el objetivo si el tubo neural se cierra alrededor del día 28 de embarazo?

En un estudio realizado en gestantes en Irlanda del Norte observaron que aquellas que dejaron de consumir 400 µg diarios de ácido fólico tras el primer trimestre experimentaron un descenso significativo de la concentración de folato sérico. Sin embargo, aquellas que continuaron consumiendo 400 µg diarios de ácido fólico durante el segundo y tercer trimestres no sólo evitaron este descenso sino que además experimentaron un incremento significativo de sus reservas de folato<sup>245</sup>.

Bruinse y colaboradores<sup>239</sup> describieron que el folato total circulante disminuye a medida que avanza la gestación y permanece bajo durante la lactancia en mujeres no suplementadas con ácido fólico. La incidencia de valores bajos de folato plasmático aumentó hasta un 55% entre las 16 SG y el parto, y fue del 45% 6 meses después del mismo. De manera similar, Smith y colaboradores<sup>246</sup> hallaron que la concentración de folato eritrocitario descendía entre la semana 6 y la semana 12 de lactancia en aquellas mujeres que no consumían suplementos con ácido fólico a pesar de que las concentraciones de folato plasmático permanecieron inalteradas. Muy posiblemente las reservas de folato se estuvieran vaciando con el objetivo de mantener estable la concentración de folato plasmático circulante.

Un estudio realizado en Gambia<sup>232</sup> halló que las mujeres que se suplementaban con 500 µg diarios de ácido fólico hasta el momento del parto se mantenían con concentraciones relativamente elevadas de folato eritrocitario (>560 nmol/L). Sin embargo, cuando se retiraba la suplementación,

esta concentración disminuía durante los 3 primeros meses de lactancia hasta valores por debajo del límite de normalidad (<320 nmol/L) en un 56% de los casos.

Vemos por tanto, que mantener la suplementación con ácido fólico más allá del primer trimestre podría mantener a niveles adecuados las reservas de folato. Esto es de especial interés de cara a afrontar el período de lactancia u otro posible embarazo, especialmente en países donde no existen políticas de fortificación obligatoria de los alimentos y donde el aporte de ácido fólico procedente de alimentos fortificados o de suplementos aún es escaso en gran parte de la población.

Por otro lado, la genética explica el 46% de la variación intersujetos en folato eritrocitario<sup>247</sup>. En un estudio realizado en Irlanda con más de 56000 gestantes, el folato eritrocitario fue menor en aquellas homocigotas para el polimorfismo *MTHFR* 677C>T (571 nmol/L) que en las heterocigotas (727 nmol/L) o las que tenían el genotipo salvaje (786 nmol/L)<sup>248</sup>. El polimorfismo *MTHFR* 677C>T también se ha relacionado con concentraciones disminuidas de folato plasmático en esta misma cohorte de gestantes así como en grandes poblaciones<sup>167,193,249</sup>.

Varios estudios han evaluado la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677C>T y el estado en folato en mujeres embarazadas con complicaciones del embarazo<sup>250-254</sup>. Sin embargo, no se ha estudiado hasta ahora la relación entre dicho polimorfismo y el estado en folatos durante el embarazo en un estudio longitudinal teniendo en cuenta la información detallada referente a la suplementación con ácido fólico.

A continuación, a modo de resumen se presenta una tabla resumen con los conocimientos actuales sobre los temas que se han abordado en esta introducción y qué cuestiones quedan por resolver.

**Tabla 2. Cuestiones pendientes de resolver en esta tesis**

Conocimientos actuales	Cuestiones pendientes de resolver en esta tesis
La prevalencia de folato plasmático <10 nmol/L en la población estadounidense en la que el 34% consume suplementos vitamínicos, pero no sometida a la fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico era del 23.8%. Tras la implementación de la política de la fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico, este valor se reduce al 0.7% <sup>255</sup> .	Investigar el estado en folato de una muestra representativa de una población europea no expuesta a fortificación obligatoria ni voluntaria de los alimentos con ácido fólico ni al uso de suplementos de ácido fólico.
La prevalencia de folato plasmático <10 nmol/L en mujeres de edad fértil (15-44 años) usuarias de suplementos vitamínicos es del 30.1% en los EUA. Tras la implementación de política de la fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico, este valor se reduce al 0.9% <sup>255</sup> .	Investigar la prevalencia de deficiencia en folato en las mujeres en edad fértil de una población no expuesta a fortificación obligatoria ni voluntaria de los alimentos con ácido fólico ni al uso de suplementos de ácido fólico.
La presencia del alelo T del polimorfismo <i>MTHFD1</i> -105C>T se asocia con una disminución de la actividad transcripcional <i>in vivo</i> de la enzima. No se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de folato eritrocitario ni tHcy entre los individuos homocigotos y salvajes para este polimorfismo ni tampoco en cuanto al riesgo de sufrir DTNs en un estudio de caso control de DTNs <sup>216</sup> .	Investigar el efecto del polimorfismo <i>MTHFD1</i> -105C>T sobre las concentraciones de folato en una muestra representativa de población no expuesta a ácido fólico sintético.
Se ha sugerido que las combinaciones 66A/524T o 66G/524C de los polimorfismos <i>MTRR</i> 66A>G y <i>MTRR</i> 524C>T reducen 3 y 4 veces respectivamente la actividad de la metionín sintetasa respecto a la actividad de dicha enzima en el haplotipo 66A/524C <sup>219</sup> .	Investigar el efecto del polimorfismo <i>MTRR</i> 524C>T sobre las concentraciones de folato en una muestra representativa de población no expuesta a ácido fólico sintético.



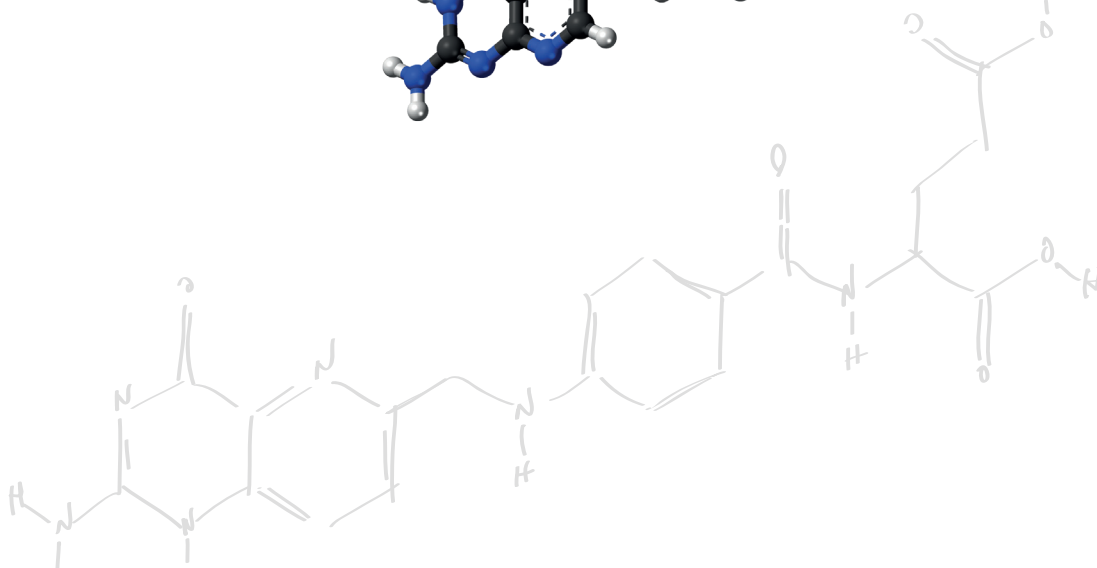
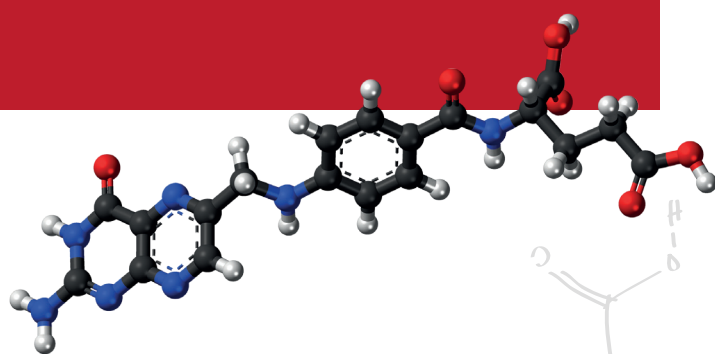
## Introducción

<p>Numerosos estudios no han hallado que el polimorfismo <i>SLC19A1</i> 80G&gt;A de manera aislada tenga un impacto relevante sobre las concentraciones de tHcy<sup>170-173</sup>, folato plasmático<sup>163,170,172,173</sup> o folato eritrocitario<sup>163,173</sup>. Sin embargo, un estudio realizado en Noruega describe una asociación entre el alelo A y una tendencia prácticamente significativa a una menor concentración de folato plasmático<sup>167</sup>. Por otro lado, la presencia del alelo T del polimorfismo <i>MTHFD1</i> -105C&gt;T se asocia con una disminución de la actividad transcripcional <i>in vivo</i> de la enzima aunque no se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de folato eritrocitario ni tHcy entre individuos homocigotos y salvajes para este polimorfismo<sup>216</sup>.</p>	<p>Investigar el riesgo de bajo estado en folato asociado al polimorfismo <i>SLC19A1</i> 80G&gt;A en una muestra representativa de población no expuesta a ácido fólico sintético.</p> <p>Investigar la relación entre el polimorfismo <i>MTHFD1</i> -105C&gt;T y las concentraciones de folato circulante en una muestra representativa de población no expuesta a ácido fólico sintético.</p> <p>Investigar el efecto de la combinación de genotipos <i>SLC19A1</i> 80AA-<i>MTHFD1</i> -105TT sobre el estado en folato en la misma población.</p>
<p>Son necesarias 4 veces más de proteína resultante del polimorfismo <i>MTRR</i> 66A&gt;G para alcanzar la máxima actividad enzimática<sup>219</sup>. A pesar de ello, no se ha descrito que la presencia del polimorfismo de manera individual afecte a la tHcy o al folato<sup>167,220-222</sup>. Por otro lado, no se ha observado que el polimorfismo <i>MTHFD1</i> 1958G&gt;A influya en las concentraciones de tHcy o de folato plasmático o eritrocitario<sup>167,212</sup> de manera individual.</p>	<p>Investigar el efecto de la combinación de genotipos <i>MTRR</i> 66GG -<i>MTHFD1</i> 1958AA sobre el estado en folato.</p>
<p>Se han descrito concentraciones elevadas de tHcy en presencia de la combinación de genotipos <i>MTHFR</i> 677TT-<i>SLC19A1</i> 80GG en una muestra pequeña de población francesa y en otra de mayor tamaño de población de edad avanzada<sup>163,256</sup>.</p>	<p>Investigar el riesgo de bajas concentraciones de folato plasmático y eritrocitario asociado a la combinación de genotipos <i>MTHFR</i> 677TT-<i>SLC19A1</i> 80AA en una muestra representativa de población europea.</p>

<p>La presencia del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C&gt;T se ha asociado con concentraciones reducidas de folato y elevadas de tHcy<sup>186,257</sup>.</p> <p>Por otro lado, se ha descrito que la enzima resultante del polimorfismo <i>MTHFD1</i> 1958G&gt;A es menos termoestable que la proteína salvaje, aunque no se ha descrito que esto influya en las concentraciones de tHcy o de folato plasmático o eritrocitario<sup>167,212,213</sup>.</p>	<p>Investigar el riesgo de bajas concentraciones de folato plasmático y eritrocitario asociado a la combinación de genotipos <i>MTHFR</i> 677TT-<i>MTHFD1</i> 1958AA en una muestra representativa de población europea.</p>
<p>La presencia del alelo T del polimorfismo <i>MTHFD1</i> -105C&gt;T se asocia con una disminución de la actividad transcripcional <i>in vivo</i> de la enzima aunque no se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de folato eritrocitario ni tHcy entre individuos homocigotos y salvajes para este polimorfismo<sup>216</sup>.</p>	<p>Investigar el riesgo de bajas concentraciones de folato plasmático y eritrocitario asociado a la combinación de genotipos <i>MTHFR</i> 677TT-<i>MTHFD1</i> -105TT en una muestra representativa de población europea.</p>
<p>Los resultados referentes al efecto del genotipo <i>DHFR</i> 19del/del sobre la tHcy y el folato plasmático no han sido concluyentes hasta la fecha. Gellekink y colaboradores no hallan asociación entre este polimorfismo y el folato plasmático o eritrocitario pero sí describen una disminución de la tHcy en los genotipos que contienen este alelo<sup>227</sup>. Por otro lado, van der Linden y colaboradores no hallan que esta mutación afecte a la tHcy, pero sí que hallan una tendencia a la baja de la concentración de folatos eritrocitarios en los genotipos <i>DHFR</i> WT/del y del/del<sup>228</sup>.</p>	<p>Investigar el riesgo de bajas concentraciones de folato plasmático y eritrocitario asociado a la combinación de genotipos <i>MTHFR</i> 677TT- <i>DHFR</i> 19del/del en una muestra representativa de población europea.</p>
<p>La concentración de folato circulante disminuye a lo largo del embarazo tanto en mujeres no suplementadas con ácido fólico<sup>230,233,234</sup> como en aquellas que en algún momento del embarazo sí se suplementaron<sup>251,258,259</sup>.</p>	<p>Investigar cómo evoluciona la concentración de folato plasmático a lo largo del embarazo en función de la dosis y la duración de la suplementación con ácido fólico.</p>

## Introducción

<p>La concentración de folato eritrocitario aumenta a mitad de embarazo y luego sufre un descenso suave tanto en gestantes no suplementadas<sup>234,258</sup> como en suplementadas<sup>258</sup> con ácido fólico.</p>	<p>Investigar cómo evoluciona la concentración de folato eritrocitario a lo largo del embarazo en función de la dosis y la duración de la suplementación con ácido fólico.</p>
<p>El folato eritrocitario fue menor en gestantes homocigotas para el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C&gt;T que en las heterocigotas o las que tenían el genotipo salvaje<sup>248</sup>.</p>	<p>Investigar si el impacto del genotipo <i>MTHFR</i> 677TT sobre la concentración de folato eritrocitario es diferente en función de la pauta de suplementación con ácido fólico seguida durante el primer trimestre de embarazo.</p>



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

A la luz de los conocimientos previos expuestos en la introducción y de las carencias halladas en la literatura, planteamos una hipótesis principal, de la que se derivan hipótesis secundarias.

### **HIPÓTESIS PRINCIPAL**

*Diferentes polimorfismos que intervienen en diferentes puntos del metabolismo de los folatos podrían perjudicar el estado en folatos, y los efectos combinados de dichos polimorfismos podrían ser más pronunciados.*

### **HIPÓTESIS SECUNDARIAS**

*La suplementación regular con ácido fólico profiláctico durante el primer trimestre de embarazo contribuye al mantenimiento de las reservas de folato en la parte final del embarazo.*

*La suplementación con ácido fólico profiláctico durante el embarazo compensa el efecto de diversos polimorfismos implicados en el metabolismo de los folatos y sus combinaciones sobre las reservas de folatos.*

Para verificar estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Explorar las interacciones de polimorfismos que interfieren sobre el metabolismo de los folatos de forma aislada y en combinación en ausencia de la fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico en población general, mujeres de edad fértil y durante el embarazo

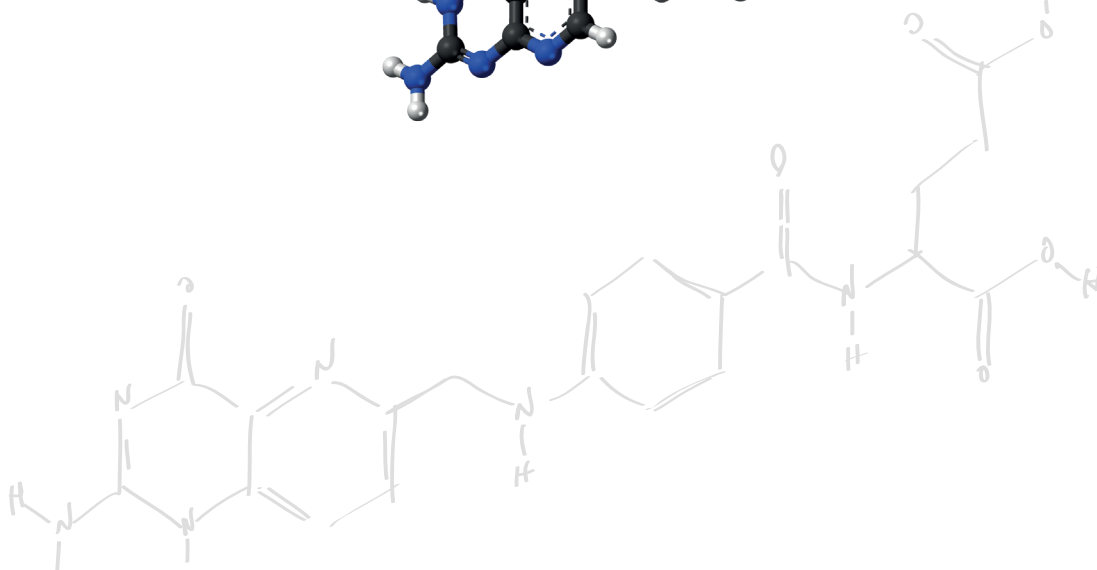
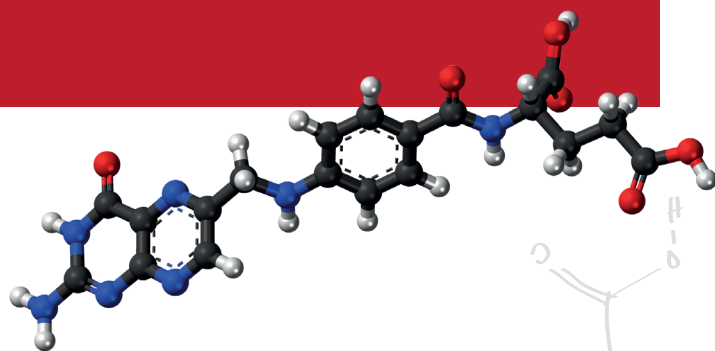
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

*En población general con una exposición mínima al ácido fólico sintético:*

1. Describir el estado en folato plasmático, eritrocitario y homocisteína
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *MTHFR 677C>T*, *MTHFR 1298A>C*, *MTRR 66A>G*, *MTRR 524C>T*, *MTHFD1 -105C>T*, *MTHFD1 1958G>A*, *SLC19A1 80G>A*, *DHFR 19del* y *FOLR1 1314G>A*, implicados en el transporte y metabolismo de los folatos.
3. Describir la relación de los polimorfismos estudiados y sus combinaciones con el estado en folatos

*En gestantes:*

4. Explorar las características ambientales de las gestantes en cada tercil de folato plasmático durante el primer trimestre
5. Investigar el comportamiento del estado en folato a lo largo de la gestación en función de la pauta de suplementación seguida durante el primer trimestre
6. Investigar si el estado en folato plasmático enmascara el efecto del polimorfismo *MTHFR 677C>T* sobre las reservas de folato a lo largo del embarazo.



# MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## 1. Diseño y reclutamiento

Para el estudio de la regulación genético-nutricional del estado en folato se ha utilizado una muestra de población adulta y otra de gestantes. A partir de ahora, les llamaremos “Estudio poblacional” y “Estudio NUTCIR” respectivamente, y dado que el diseño y la estrategia de reclutamiento de participantes es distinto en cada uno de ellos, se detallan por separado. Ambos estudios fueron aprobados y supervisados por los Comités Éticos de Investigación Clínica de los centros implicados.

### A. Estudio poblacional

Se trata de un estudio transversal realizado entre los años 1998 a 2002 en la Unidad de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universitat Rovira i Virgili (URV) en colaboración con los Centros de Asistencia Primaria (CAP) de tres municipios de la provincia de Tarragona. Con el objetivo de obtener una muestra representativa de la población adulta (entre 18 y 75 años) estratificada por edad y sexo, se seleccionaron los candidatos realizando un muestreo aleatorio simple de los registros de padrón de los tres municipios.

Los criterios de exclusión fueron: uso de suplementos vitamínicos del grupo B, uso de medicamentos que afectasen al metabolismo del folato, embarazo, lactancia y haber dado a luz en los últimos 6 meses.

A los 1563 candidatos seleccionados se les envió una carta informativa sobre el estudio antes de invitarlos telefónicamente a participar en él. No se pudo contactar con 238 candidatos debido a errores en los datos de contacto, cambio de residencia, defunción, etc. Del resto, 391 rehusaron participar, y 32 no se presentaron a la cita concertada a pesar de haber aceptado participar inicialmente. Además de los criterios de exclusión explicados, se excluyeron 3 individuos por haber recibido tratamiento con inyecciones de cobalamina, y 5 más por tener la función renal alterada (creatinina plasmática  $>97 \mu\text{mol/L}$  en mujeres y  $>124 \mu\text{mol/L}$  en hombres)<sup>260</sup>. De este modo, el número final de participantes quedó en 781, lo que representa el 65% de la población elegible. Todos ellos fueron informados de la naturaleza del estudio y firmaron el documento de consentimiento informado siguiendo las normas descritas en la Declaración de Helsinki<sup>261</sup>.

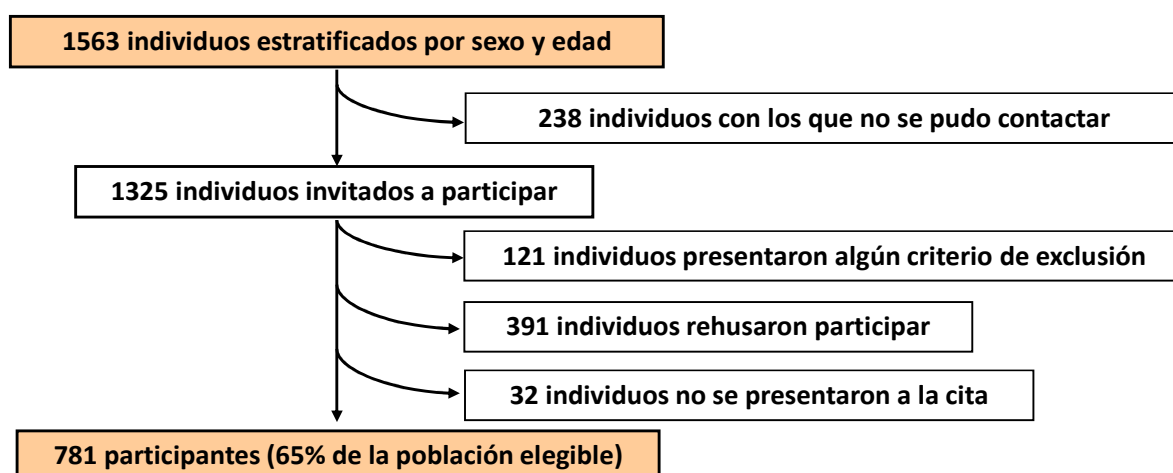


Figura 5. Diagrama de flujo del reclutamiento de voluntarios en el estudio poblacional

A los participantes se les realizó una entrevista personal en su CAP sobre hábitos y estilo de vida donde también se les preguntó sobre su historia clínica y se les realizó una exploración física registrando el peso y la talla. Durante esta entrevista se verificó que efectivamente los individuos cumplían los criterios para participar y se les citó para una posterior extracción sanguínea. Todos los participantes rellenaron un registro de consumo alimentario de 24 horas de dos días laborables no consecutivos y un día festivo.

#### B. Estudio NUTCIR

Se trata de un estudio longitudinal que se está realizando desde el año 2005 en la Unidad de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universitat Rovira i Virgili (URV) en colaboración con los Servicios de Obstetricia y Ginecología de los hospitales universitarios Sant Joan (HUSJ) de Reus y Joan XXIII (HUJXXIII) de Tarragona. El reclutamiento de las participantes se lleva a cabo en la primera visita de control del embarazo, donde son informadas del protocolo del estudio. En caso de aceptar participar, firmaron el documento de consentimiento informado, siguiendo las directrices de Declaración de Helsinki <sup>261</sup>.

Los criterios de exclusión fueron: embarazo más avanzado de 12 semanas, embarazo múltiple, cirugía mayor en los últimos 6 meses, enfermedad crónica que pueda alterar el estado nutricional (celiaquía, diabetes, enfermedad de Crohn) o uso de medicamentos que afectan al metabolismo del folato.

Desde el inicio del estudio hasta diciembre de 2011 se realizaron 1484 primeras visitas para el control del embarazo, de las cuales 875 no cumplieron el criterio de inclusión (en la mayoría de los casos, el de estar de menos de 12 semanas de gestación). De las 609 mujeres elegibles,

29 declinaron la invitación y 9 no se presentaron a la extracción programada a pesar de haber aceptado inicialmente. Finalmente, se incluyeron 571 gestantes (el 94% de la población elegible).

En la *Figura 6* se representa el diagrama de flujo del estudio NUTCIR. De las 571 participantes que iniciaron el estudio, 518 finalizaron la gestación con el parto de un hijo vivo. De las 53 restantes: 35 sufrieron un aborto espontáneo, 2 sufrieron una muerte fetal, 2 fueron excluidas por gestación múltiple no detectada inicialmente, 6 abandonaron el estudio durante la gestación y 8 realizaron una interrupción voluntaria del embarazo por malformación mayor.



**Figura 6. Diagrama de flujo del estudio NUTCIR**

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas de cada participante a las 12, 15, 24-27 y 34 semanas de gestación (SG) coincidiendo con las analíticas de rutina para el control del embarazo. Además se obtuvo una muestra sanguínea cuando la gestante ingresaba en el centro hospitalario con el inicio del trabajo de parto confirmado y otra más del cordón umbilical tras el nacimiento del bebé.

Se realizó una encuesta a las 20 SG para obtener información sobre hábitos y estilo de vida. Esta encuesta recoge de manera detallada la información referente al uso de suplementos vitamínicos durante los 3 meses antes del embarazo y la primera mitad del embarazo, con la ayuda de imágenes de los preparados más utilizados. De cada preparado se registró el número de tomas semanales en cada mes de embarazo. La encuesta también recoge la información referente al consumo de alcohol, tabaco y otras sustancias tóxicas no legales, tanto durante el

embarazo como durante el año previo al mismo, así como las profesiones materna y paterna para calcular el nivel socioeconómico familiar<sup>262</sup>.

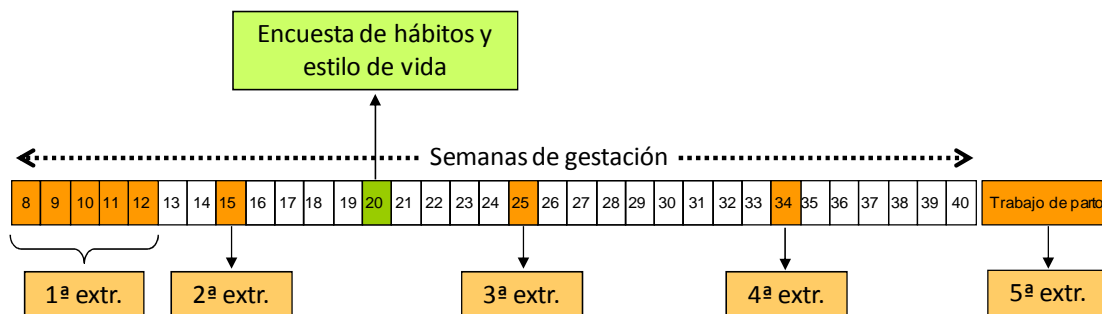


Figura 7. Diseño del estudio NUTCIR

En la primera visita obstétrica, de acuerdo con el protocolo de seguimiento del embarazo de la SEGO<sup>244</sup> se prescribió a cada mujer un suplemento vitamínico compuesto por 400 µg de ácido fólico y 2 µg de cianocobalamina que debía tomar diariamente durante el primer trimestre del embarazo. También se registró la fecha de nacimiento, el peso y la talla de cada participante. Estos datos quedaron reflejados en la historia clínica, que también recoge datos obstétricos como la paridad.

## 2. Obtención de muestras biológicas

### A. *Estudio poblacional*

Las extracciones de sangre fueron realizadas en ayunas, a primera hora de la mañana en el CAP. Mediante punción antecubital se obtuvieron 10 mL de sangre venosa en un tubo Vacutainer con EDTA-K<sub>3</sub>. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento en la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (FMCS), que comenzó en un tiempo no superior a 2 horas tras la extracción para evitar artefactos en la determinación de la tHcy<sup>263</sup>. Los tubos de sangre fueron mezclados 10 veces por inversión después de recoger la sangre y otra vez antes de su procesamiento.

### B. *Estudio NUTCIR*

Las extracciones planificadas durante el control del embarazo (1 a 4) fueron realizadas en ayunas, en el HUSJ o en el HUIJXXIII. Mediante punción antecubital se obtuvieron 10 mL de sangre venosa en un tubo Vacutainer con EDTA-K<sub>3</sub>. El procesamiento, que comenzó en un tiempo no superior a una hora tras la extracción, se llevó a cabo en el Biobanco del Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili (IISPV) en Reus y en el Área de Investigación del HUIJXXIII.

También se mezclaron los tubos de sangre 10 veces por inversión después de recoger la sangre y otra vez antes de su procesamiento.

A partir de enero de 2011, momento en que el HUSJ se trasladó a su nueva ubicación, se instauró un sistema de valijas para transportar las muestras desde el nuevo HUSJ al Biobanco. Para evitar que el procesado de las muestras comenzara más de una hora después de la extracción, la centrifugación y separación del plasma se llevó a cabo en la misma área de extracciones del HUSJ.

La 5ª extracción, al no ser planificable fue realizada en el área de partos del hospital correspondiente, sin tener en cuenta si la participante estaba en ayunas o no. De la gestante se obtuvieron 10mL de sangre venosa en tubos Vacutainer con EDTA-K<sub>3</sub>. Cuando esta extracción se realizó fuera del horario de apertura del Biobanco o del Área de Investigación, la muestra se envió a los laboratorios centrales de cada uno de los hospitales, donde la procesaron parcialmente y la conservaron a 4°C hasta que un miembro del equipo NUTCIR la recogió y completó su procesado. Se registró la hora de obtención de la muestra en la sala de partos y la hora de separación del plasma en el laboratorio de urgencias.

### **3. Procesado de muestras**

Con la excepción de la obtención de leucocitos, los protocolos utilizados para procesar las muestras y obtener las diferentes fracciones sanguíneas fueron los mismos tanto en el estudio poblacional como en el estudio NUTCIR.

Con 50µL de sangre total procedente del tubo con EDTA-K<sub>3</sub>, se realizó una dilución 1:10 con una solución al 1% de ácido ascórbico<sup>I</sup>. Tras vortear esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se congeló en dos alícuotas a -80°C para la posterior determinación de folato eritrocitario. No se generaron estas alícuotas para las muestras 5 y 6 del estudio NUTCIR, por lo que no disponemos de la determinación de folato eritrocitario para dichas muestras.

El tubo con la sangre restante se centrifugó a 1500g durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma, que una vez separado y alícuotado, se congeló a -80°C. Con el resto del contenido del tubo, se procedió a la obtención de leucocitos. Para ello, se añadió PBS<sup>II</sup> hasta llenarlo y se invirtió varias veces hasta conseguir una correcta homogeneización.

---

<sup>I</sup> 0.25g de ácido ascórbico, en 25mL de agua miliQ.

<sup>II</sup> 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, en un litro de agua miliQ

#### A. *Obtención de leucocitos en el estudio de población*

A continuación se centrifugó el tubo a 1500g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se volvió a añadir PBS, a centrifugar y a descartar el sobrenadante. Se aspiró la capa de leucocitos y parte de la de eritrocitos y se depositó en un tubo de 10 mL. Se añadieron 7 mL de solución de hemólisis<sup>III</sup> se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se centrifugó el tubo a 1500g durante 15 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se lavó y resuspendió el pélet con solución de hemólisis. Tras añadir de nuevo solución de hemólisis hasta llenar el tubo, se volvió a centrifugar a 1500g durante 15 minutos. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se volvió a lavar el pélet. El pélet se resuspendió en 900µL de PBS y se congeló a -80°C.

#### B. *Obtención de leucocitos en el estudio NUTCIR.*

A continuación se volcó el contenido del tubo en un tubo Falcon de 50mL donde previamente se habían dispuesto 30mL de solución de hemólisis, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se centrifugó el tubo a 2000g durante 5 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se lavó y resuspendió el pélet con solución de hemólisis. Tras añadir 20mL de la misma solución, se volvió a centrifugar a 2000g durante 5 minutos. Nuevamente se descartó el sobrenadante. El pélet se resuspendió en 900µL de PBS y se congeló a -80°C.

De los leucocitos descongelados de ambos estudios se extrajo y cuantificó el ADN mediante un proceso dividido en 5 fases:

- Lisis celular: Se dispusieron los leucocitos en 10mL de *Autopure Cell Lysis Solution*<sup>IV</sup> y se incubaron a temperatura ambiente protegidos de la luz durante al menos un mes.
- Precipitación de proteínas: Se añadieron 3.33mL de *Protein Precipitation Solution*<sup>V</sup> y se mezcló por vortex a máxima velocidad durante 20 segundos. Tras 15 minutos a 4°C, se centrifugó la mezcla a 2000g durante 15 minutos a 4°C.
- Precipitación del ADN: Se aspiró el sobrenadante (que contiene el ADN) con cuidado de no absorber el pélet (que contiene los restos celulares), y se dispensó en un tubo Falcon con 10mL de isopropanol 100% frío. Tras mezclar por inversión suavemente unas 50 veces (hasta observar la medusa de ADN), se centrifugó el tubo a 2000g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10mL de etanol 70% frío para lavar el botón.

---

<sup>III</sup> 7.007 g de CINH4 131mM y 0.071 g de CH5NO3 0.9 mM, en un litro de agua miliQ

<sup>IV</sup> Qiagen Sciences, Maryland, USA

<sup>V</sup> Qiagen Sciences, Maryland, USA

Tras centrifugar de nuevo a 2000g durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado de no perder el botón de ADN y se dejó secar a temperatura ambiente hasta eliminar los restos de líquido.

- Hidratación del ADN: Se añadieron 1200µL de *Autopure DNA Hydration Solution*<sup>VI</sup> al tubo que contenía el botón de ADN y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 3 o 4 días.
- Cuantificación del ADN: Se depositaron 2µL de ADN en solución en el lector de un *Nanodrop 1000* a una longitud de onda de 260nm. El espectrofotómetro cuenta con un software propio que calculó de manera automática la concentración de ADN.

#### 4. Determinaciones bioquímicas

- Folato plasmático y eritrocitario: Para el estudio poblacional, fue analizado en el Departamento de Bioquímica de Trinity College, Dublin, Irlanda (TCD) mediante ensayo microbiológico con *Lactobacillus casei* resistente a cloramfenicol<sup>78</sup>. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 7.1% y 10.7% respectivamente. Se calculó la concentración de folato eritrocitario mediante la siguiente fórmula: folato sanguíneo total/hematocrito. Para el estudio NUTCIR, esta técnica fue adaptada para trabajar en placa y poderse automatizar. Las determinaciones se realizaron en los laboratorios de Bevital AS, Bergen, Noruega. La sensibilidad de la técnica fue 2nmol/L, y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 4% y 5% respectivamente<sup>264</sup>.
- Homocisteína plasmática total: En el estudio poblacional, esta determinación se realizó mediante inmunoensayo de polarización de la fluorescencia, utilizando el kit IMx Homocysteine<sup>VII</sup>. Esta técnica tuvo una sensibilidad de 0.5 µmol/L y unos coeficientes de variación intra e interensayo de 2.1% y 3.2% respectivamente. En el estudio NUTCIR, la técnica utilizada fue la LC-MS/MS<sup>265</sup>, con una sensibilidad de 0.1 µmol/L y unos coeficientes de variación intra e interensayo de 0.9% y 2.1% respectivamente<sup>264</sup>.
- Cobalamina plasmática: Para el estudio poblacional, fue determinada en el Departamento de Bioquímica de Trinity College, Dublin, Irlanda (TCD) mediante ensayo microbiológico con *Lactobacillus leichmanii* resistente a colistin sulfato<sup>266</sup>, con coeficientes de variación intra e interensayo de 7.1% y 10.7% respectivamente. Para el estudio NUTCIR, esta técnica fue

<sup>VI</sup> Qiagen Sciences, Maryland, USA

<sup>VII</sup> Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA.



adaptada para trabajar en placa y poderse automatizar. Las determinaciones se realizaron en los laboratorios de Bevital AS, Bergen, Noruega. La sensibilidad de la técnica fue de 30pmol/L y los coeficientes de variación intra e interensayo 4% y 5% respectivamente<sup>264</sup>.

- **Creatinina plasmática:** Para estudio poblacional, se determinó mediante un analizador Cobas Mira<sup>VIII</sup> utilizando el método de Jaffé modificado. Para ello se utilizó un kit comercial de QCA<sup>IX</sup> con unos coeficientes de variación intra e interensayo de 1.72% y 2.11% respectivamente. Para el estudio NUTCIR, fue determinada mediante LC-MS/MS<sup>265</sup> con una sensibilidad de 0.1µmol/L y unos coeficientes de variación intra e interensayo del 4%<sup>264</sup>.

## 5. Determinaciones genéticas

Se determinaron aquellos polimorfismos conocidos presentes en genes que podían guardar relación con el transporte o metabolismo del folato: *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *MTRR* 66 A>G, *MTRR* 524 C>T, *MTHFD1* 1958 G>A, *MTHFD1* -105 C>T, *SLC19A1* 80 G>A, *DHFR* 19del y *FOLR1* 1314 G>A. Todos fueron determinados mediante MALDI-TOF/MS<sup>267</sup> en los laboratorios Bevital AS, excepto el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T en el estudio poblacional. Esta última determinación se llevó a cabo en la FMCS mediante la técnica descrita por Frosst<sup>186</sup>.

## 6. Tratamiento de datos

El índice de masa corporal (IMC) en ambos estudios se obtuvo midiendo el peso y la talla de los participantes y aplicando la fórmula: peso(kg)/talla(m)<sup>2</sup>.

La deficiencia en folato plasmático se estableció mediante el punto de corte de 7 nmol/L<sup>83</sup>.

### A. Estudio poblacional

Para los análisis que se realizaron con tHcy se descartaron aquellos individuos cuyas muestras se habían empezado a procesar más de dos horas después de la extracción, con el objetivo de evitar valores falsamente elevados de tHcy<sup>263</sup>.

Para analizar el efecto de parejas de polimorfismos, se utilizaron solamente los seis más prevalentes, que se combinaron entre ellos para evitar frecuencias muy pequeñas de dobles homocigotos y dobles salvajes.

---

<sup>VIII</sup> Roche, Basel, Switzerland.

<sup>IX</sup> Química Clínica Aplicada S.A. Amposta, España.

## B. Estudio NUTCIR

La deficiencia en folato plasmático se estableció mediante el punto de corte de 7 nmol/L<sup>83</sup>. La deficiencia en cobalamina plasmática se estableció mediante el punto de corte de 148 pmol/L<sup>75,268</sup>.

Se crearon 5 categorías (ver *Tabla 3*) en función de la dosis y la frecuencia de consumo de los suplementos vitamínicos durante el primer trimestre declarados en la encuesta realizada a las 20 semanas de gestación en referencia al uso de suplementos (ver *Figura 1*). Para ello, se calcularon los µg totales de ácido fólico consumidos durante los primeros tres meses, independientemente de si procedían de multivitamínicos o de suplementos que solo contenían ácido fólico.

**Tabla 3. Categorías de uso de suplementos de ácido fólico**

Nombre de la categoría	µg de ácido fólico consumidos durante el primer trimestre	Equivalencia en µg/día
Sin suplementación	0	Sin suplementación
Suplementación insuficiente <sup>1</sup>	<24000	<400 µg/día, 5 días/semana
Suplementación adecuada <sup>2</sup>	24000-33600	400 µg/día, 5-7 días/semana
Suplementación elevada <sup>3</sup>	>33600-300000	>400 µg/día – 5mg/día, 5 días/semana
Suplementación excesiva <sup>4</sup>	>300000	>5mg/día, 5 días/semana

<sup>1</sup>Por debajo de, <sup>2</sup>Adherencia a, <sup>3</sup>Por encima de, <sup>4</sup>Muy por encima de la pauta recomendada.

Las gestantes que se encuentran en las categorías “Elevada” y “Excesiva” sobrepasan la pauta de suplementación recomendada por la SEGO (400 µg diarios durante los 3 primeros meses)<sup>269</sup>. En estos casos, o bien el obstetra consideró que la dosis recomendada por la SEGO era insuficiente para cada una de ellas en concreto por sus antecedentes obstétricos (subfertilidad, abortos de repetición, malformaciones congénitas u otras complicaciones en embarazos previos...) y por tanto les prescribieron suplementos con una dosis mayor de ácido fólico o bien las propias mujeres consumieron más dosis por su cuenta.

Se comprobó mediante el folato plasmático que aquellas mujeres que decían no haber consumido suplementos vitamínicos durante el primer trimestre, realmente no hubieran

recibido ácido fólico sintético de manera regular. Para ello, utilizamos los resultados obtenidos en el estudio poblacional, donde se trabajó con una muestra no expuesta a fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico ni al consumo de suplementos vitamínicos del grupo B. En el grupo de mujeres en edad fértil (18-44 años), el percentil 95 de folato plasmático se situó en 23.95 nmol/L. De esta manera, de las 24 gestantes que inicialmente consideramos como no suplementadas, solamente 12 tuvieron un folato plasmático inferior a este valor. Así pues, consideramos que aquellas gestantes que presentaran un folato plasmático superior a dicho valor en la primera extracción, debían haber consumido ácido fólico, quizás sin siquiera ser conscientes de ello. Teniendo en cuenta los valores mínimos y máximos de folato plasmático de cada categoría de suplementación, reubicamos a 7 gestantes en la categoría de suplementación “Insuficiente”, a 3 en la categoría de suplementación “Adecuada” y a 2 en la de suplementación “Elevada”.

Nombre del preparado	¿Cuántas veces a la semana?	Meses del embarazo				
		1	2	3	4	5
<b>ÁCIDO FÓLICO</b> ¿Cuál? : _____	<input type="checkbox"/> Cada día	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>MULTI-VITAMINAS</b> ¿Cuál? : _____	<input type="checkbox"/> Cada día	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Tomó ácido fólico en los 3 meses antes de quedarse embarazada?    Sí     No

**Figura 8. Pregunta sobre uso de suplementos en la encuesta de hábitos y estilo de vida que se realiza a las 20 semanas de gestación.**

Para realizar ciertos análisis se separó a las gestantes por terciles de folato plasmático en el primer trimestre con el objetivo de determinar si los factores ambientales que afectan al embarazo también están presentes en todos los terciles y porque la evolución del estado en folato durante el embarazo podría variar en función del estado en folato con que se inicie el embarazo. También se investigó si factores ambientales que afectan al embarazo varían entre los distintos terciles de folato plasmático, ya que el estado en esta vitamina podría marcar un estilo de vida y no solo la ingesta de este nutriente en concreto.

## 7. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con la versión 17.0 en castellano de SPSS para Windows (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA).

Se utilizaron las técnicas estadísticas habituales para la descripción de las variables cualitativas (número de individuos y porcentaje) y cuantitativas (media e intervalo de

confianza al 95%). La normalidad de la distribución de las variables cuantitativas se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la normalidad de la distribución era condición de aplicación de una prueba estadística, se procedía a aplicar una transformación logarítmica de los valores. Para la descripción de estas variables se presentó la media geométrica y su intervalo de confianza al 95% (antilogaritmo de los valores logarítmicos).

Para verificar si las frecuencias genotípicas observadas se hallaban en equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó la prueba de  $\chi^2$  comparando las frecuencias genotípicas esperadas según dicha ley con las observadas en la muestra. Los contrastes de hipótesis se plantearon de forma bilateral y se declararon significativos cuando el valor p fue inferior a 0.05.

#### A. Estudio poblacional

Para comparar las medias de folato plasmático, eritrocitario y tHcy entre los tres genotipos de cada polimorfismo estudiado se utilizó la prueba del análisis de la varianza (ANOVA). Se realizaron comparaciones múltiples entre los genotipos aplicando la corrección de Bonferroni cuando el análisis de la varianza detectaba globalmente diferencias significativas; de esta forma se mantuvo en un 5% el error tipo I o alfa.

Para expresar el riesgo de hallarse en los terciles bajos de folato plasmático y eritrocitarios de los heterocigotos y los homocigotos en relación a los salvajes para cada uno de los diferentes polimorfismos estudiados y para expresar este riesgo en los individuos con determinadas combinaciones de polimorfismos en relación a los salvajes para ambos se utilizaron modelos de regresión logística múltiple, que proporcionaron las correspondientes odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza al 95%. En estos modelos se incluyeron para su ajuste todas las variables que se podía esperar que influyeran en la relación explorada en base a la evidencia disponible en la literatura. Las condiciones de aplicación de todos estos modelos se verificaron mediante las técnicas habituales, entre ellas el análisis de los residuales. También se utilizó la  $R^2$  de Nagelkerke para cuantificar la bondad de ajuste del modelo. Las hipótesis nulas bilaterales de no diferencia y no significación de los coeficientes de regresión se rehusaron cuando su probabilidad fue inferior al 5%.

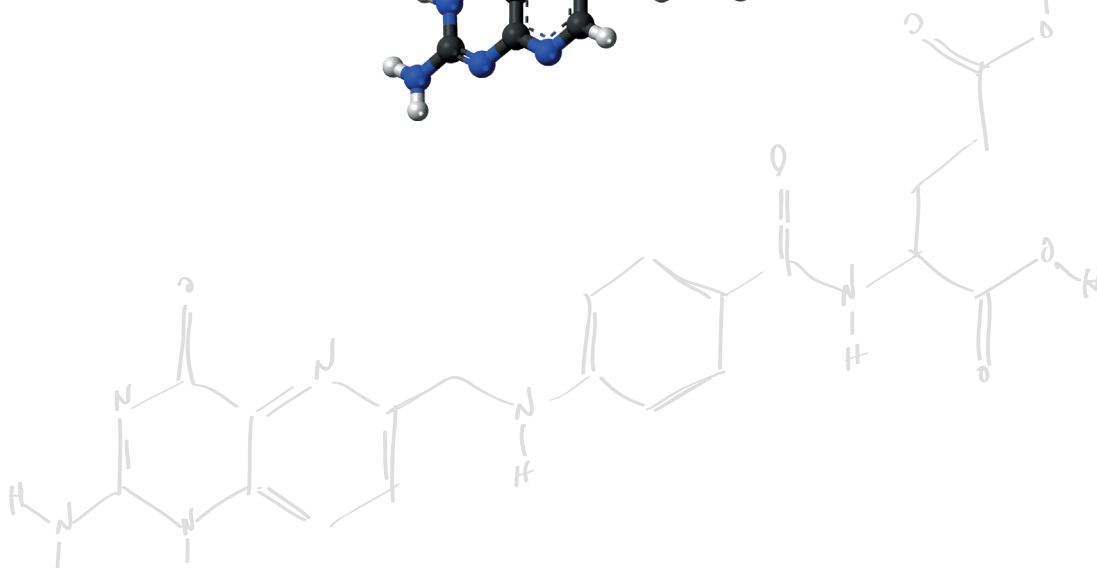
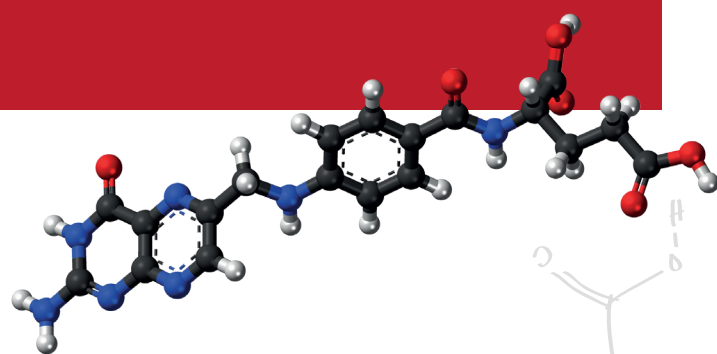
Hemos aplicado el método descrito por Knol y colaboradores<sup>270</sup> para comparar el riesgo de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático o eritrocitario entre los homocigotos para el polimorfismo MTHFR677CT y los dobles homocigotos para las diferentes combinaciones de polimorfismos consideradas teniendo en cuenta que se tratan de grupos no independientes de individuos. Para esta comparación hemos considerado también un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## B. Estudio NUTCIR

Para comparar los porcentajes de las variables cualitativas entre los terciles de folato plasmático en el primer trimestre se utilizó la prueba de  $\chi^2$ .

Para comparar las medias de las variables cuantitativas entre los terciles de folato plasmático en el primer trimestre se utilizó la prueba del análisis de la varianza (ANOVA). Cuando el análisis de la varianza detectaba globalmente diferencias significativas se realizaron comparaciones múltiples aplicando la corrección de Bonferroni para mantener en un 5% el error tipo I o alfa.

Para comparar la evolución del folato plasmático y eritrocitario y de cobalamina plasmática entre los grupos de suplementación se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Estos modelos se realizaron con ajuste para edad gestacional exacta en el momento de la extracción y sin él. Como los resultados no variaron sustancialmente y al añadir esta variable se perdía potencia estadística por aumentar un grado de libertad el numerador de la F, se presentan únicamente los modelos realizados sin dicho ajuste.



# RESULTADOS

## ESTUDIO POBLACIONAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## 1. Características generales de la muestra

Las características generales de la muestra se resumen en la tabla 4. Entre los individuos que realizaban actividad física, la media fue 7 (DE = 8) y 5 (DE = 5) horas a la semana para hombres y mujeres respectivamente. Entre los fumadores, la media de consumo fue 19 (DE = 12) cigarrillos al día para los hombres y 14 (DE = 7) para las mujeres. Entre los individuos que consumían alcohol, la media de consumo fue 27 (DE = 22) y 13 (DE = 11) gramos de alcohol al día para hombres y mujeres respectivamente. La media de IMC en la muestra se situó en 27,4 (DE = 4,4) Kg/m<sup>2</sup> en hombres y en 26,8 (DE = 5,8) Kg/m<sup>2</sup> en mujeres.

En la Tabla 5 se puede observar la ingesta de folatos y las concentraciones de homocisteína y folato plasmático y eritrocitario según la edad y el sexo. En ella se observa que las mujeres presentan una mayor ingesta de folatos que los hombres, y que ésta aumenta con la edad hasta los 59 años. Por otro lado, el folato eritrocitario y la tHcy son superiores en hombres y se incrementan con la edad. Sin embargo, aunque el folato plasmático también aumenta con la edad, es mayor en mujeres. En cuanto a ingesta de la vitamina se refiere, un 83.5% de la población estudiada informó una ingesta de folatos inferior a 400µg/día. Entre las mujeres en edad fértil (18-44 años) este porcentaje aumenta hasta el 86.7%.

Se observó que un 18.8% de la muestra estudiada presenta un estado deficiente en folatos (folato plasmático < 7 nmol/L). Este porcentaje disminuye con la edad siguiendo una tendencia lineal significativa (*Tabla 6*). En el caso de las mujeres en edad fértil (18-44 años) este porcentaje aumenta hasta el 24.2%.



**Tabla 4. Características generales de la muestra**

Característica	Hombres		Mujeres		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Edad (años)</b>						
18-29	76	22,7	87	24,8	163	23,8
30-44	118	35,2	113	32,2	231	33,7
45-59	91	27,2	89	25,4	180	26,2
60-75	50	14,9	62	17,7	112	16,3
<b>Nivel de estudios</b>						
Sin estudios	7	2,1	13	3,7	20	2,9
Primarios	169	50,4	175	49,9	344	50,1
Secundarios	120	35,8	121	34,5	241	35,1
Universitarios	39	11,6	42	12,0	81	11,8
<b>Profesión<sup>a</sup></b>						
Grupo 1	54	16,2	15	4,3	69	10,1
Grupo 2	71	21,3	115	32,8	186	27,2
Grupo 3	97	29,0	16	4,6	113	16,5
Grupo 4	65	19,5	182	51,9	247	36,1
Otros	47	14,1	23	6,6	70	10,2
<b>Estado civil</b>						
Soltero/a	95	28,4	87	24,9	182	26,6
Casado/a	231	69,0	235	67,1	466	68,0
Viudo/a	2	0,6	19	5,4	21	3,1
Separado/a	7	2,1	9	2,6	16	2,3
<b>IMC<sup>b</sup> (Kg/m<sup>2</sup>)</b>						
Infrapeso ( $\leq 18$ )	2	0,6	2	0,6	4	0,6
Normopeso (>18-25)	102	30,8	154	44,5	256	37,8
Sobrepeso (>25-30)	141	42,6	106	30,6	247	36,5
Obesidad (>30)	86	26,0	84	24,3	170	25,1
<b>Hábitos y estilo de vida</b>						
Sedentarismo	99	36,7	117	44,7	216	40,6
Consumo de tabaco	127	37,9	109	31,2	236	34,5
Consumo de alcohol <sup>c</sup>	211	63,2	71	20,2	282	41,2
Consumo de STI <sup>d</sup>	12	3,6	6	1,8	18	2,7

N= Número de individuos.

<sup>a</sup> Grupo1: Directivo/a, técnico. Grupo2: Administración y servicios. Fuerzas armadas. Grupo3: Agricultor/a, ganadero/a, peón, conductor/a. Grupo4: Pensionista, estudiante, ama de casa.

<sup>b</sup> IMC: Índice de Masa Corporal

<sup>c</sup> Respuesta afirmativa a la pregunta ¿Consume alcohol actualmente?

<sup>d</sup> STI: Substancias Tóxicas Ilegales

**Tabla 5. Ingesta de folato y concentraciones de homocisteína y folatos según edad y sexo**

Edad (años)		Hombre	Mujer	Ambos sexos
<b>18-29</b>	Ingesta de folato(µg)/1000kcal	112 [102-121] <sup>a</sup>	133 [121-144] <sup>*</sup>	123 [115-131]
	Folato plasmático (nmol/L)	8,9 [8,0-9,9] <sup>b</sup>	9,5 [8,6-10,6]	9,2 [8,6-9,9]
	Folato eritrocitario (nmol/L)	711 [655-771] <sup>b</sup>	690 [637-747]	699 [662-740]
	tHcy <sup>c</sup> (µmol/L)	9,9 [9,2-10,7] <sup>b</sup>	8,4 [8,0-8,9] <sup>*</sup>	9,1 [8,7-9,5]
<b>30-44</b>	Ingesta de folato(µg)/1000kcal	124 [115-133]	143 [131-154] <sup>*</sup>	133 [126-140]
	Folato plasmático (nmol/L)	9,9 [9,1-10,7]	11,1 [10,2-12,2]	10,5 [9,8-11,1]
	Folato eritrocitario (nmol/L)	815 [768-865] <sup>†</sup>	778 [730-829]	797 [763-832] <sup>†</sup>
	tHcy (µmol/L)	10,0 [9,5-10,4]	8,2 [7,8-8,6] <sup>*</sup>	9,0 [8,7-9,4]
<b>45-59</b>	Ingesta de folato(µg)/1000kcal	141 [127-154] <sup>†</sup>	173 [161-186] <sup>*,†</sup>	157 [148-166] <sup>†</sup>
	Folato plasmático (nmol/L)	12,7 [11,6-14,0] <sup>†,‡</sup>	15,3 [13,6-17,1] <sup>*,†,‡</sup>	13,9 [12,9-15,0] <sup>†</sup>
	Folato eritrocitario (nmol/L)	921 [857-990] <sup>†,‡</sup>	887 [817-963] <sup>†</sup>	904 [857-955] <sup>†,‡</sup>
	tHcy (µmol/L)	10,2 [9,8-10,6]	8,4 [8,0-8,9] <sup>*</sup>	9,3 [9,0-9,6]
<b>60-75</b>	Ingesta de folato(µg)/1000kcal	151 [135-166] <sup>†,‡</sup>	187 [166-209] <sup>*,†,‡</sup>	170 [157-184] <sup>†,‡</sup>
	Folato plasmático (nmol/L)	15,0 [12,9-17,5] <sup>†,‡</sup>	15,7 [13,6-18,2] <sup>†,‡</sup>	15,4 [13,9-17,1] <sup>†,‡</sup>
	Folato eritrocitario (nmol/L)	978 [874-1095] <sup>†,‡</sup>	972 [882-1072] <sup>†,‡</sup>	975 [907-1049] <sup>†,‡</sup>
	tHcy (µmol/L)	11,3 [10,6-12,0] <sup>†,‡</sup>	10,0 [9,4-10,6] <sup>*,†,‡,§</sup>	10,6 [10,1-11,0] <sup>†,‡,§</sup>
<b>Todas las edades</b>	Ingesta de folato(µg)/1000kcal	130 [124-136]	155 [148-162] <sup>*</sup>	143 [138-148]
	Folato plasmático (nmol/L)	11,0 [10,4-11,6]	12,3 [11,6-13,1] <sup>*</sup>	11,7 [11,2-12,1]
	Folato eritrocitario (nmol/L)	840 [807-873]	812 [780-846]	825 [802-849]
	tHcy (µmol/L)	10,2 [9,9-10,5]	8,6 [8,4-8,8] <sup>*</sup>	9,4 [9,2-9,5]

<sup>a</sup> Media aritmética [límites inferior-superior del intervalo de confianza al 95%]

<sup>b</sup> Media geométrica [límites inferior-superior del intervalo de confianza al 95%]

<sup>c</sup> tHcy: Homocisteína plasmática total

<sup>\*</sup> Diferencia de medias significativa (p<0.05) con respecto al sexo masculino

<sup>†</sup> Diferencia de medias significativa (p<0.05) con respecto al grupo de edad 18-29.

<sup>‡</sup> Diferencia de medias significativa (p<0.05) con respecto al grupo de edad 30-44.

<sup>§</sup> Diferencia de medias significativa (p<0.05) con respecto al grupo de edad 45-59.

Significaciones obtenidas mediante el análisis de la varianza y corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

**Tabla 6. Estado deficiente en folatos (folato plasmático <7nmol/L) según edad y sexo**

Sexo	Grupo de edad (años)				Todas las edades
	18-29	30-44	45-59	60-75	
<b>Hombre</b>	34.9 <sup>*</sup>	24.8	11.1	10.0	21.1
<b>Mujer</b>	31.7	18.5	7.0	5.7	16.7
<b>Ambos sexos</b>	33.2	21.6	9.0	7.7	18.8

<sup>\*</sup> %. Análisis estadístico:  $\chi^2$  de tendencia lineal.

## 2. Polimorfismos en la muestra

En la tabla 7 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados. Los más frecuentes son *MTHFD1*- 105C>T , *MTRR* 66A>G y *SLC19A1* 80G>A, con una proporción de individuos homocigóticos de 28.5%, 23.7% y 23.5% respectivamente.

**Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados**

Polimorfismo	n	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)	
		S/S	S/M	M/M	S	M
<i>MTHFR</i> 677C>T	775	35.6	46.3	18.1	59.7	40.3
<i>MTHFR</i> 1298A>C	775	51.7	41.7	6.6	71.9	28.1
<i>MTRR</i> 66A>G	771	26.1	50.2	23.7	51.1	48.9
<i>MTRR</i> 524C>T	771	39.6	47.2	13.2	62.9	37.1
<i>MTHFD1</i> -105C>T	775	23.6	47.9	28.5	46.7	53.3
<i>MTHFD1</i> 1958G>A	770	32.8	47.0	20.2	57.3	42.7
<i>SLC19A1</i> 80G>A	773	25.5	51.0	23.5	50.4	49.6
<i>DHFR</i> 19del	770	35.7	44.9	19.4	59.7	40.3
<i>FOLR1</i> 1314G>A	767	91.1	8.0	0.9	95.4	4.6

S: alelo salvaje, M: alelo mutado

## 3. Polimorfismos y estado en folatos

En la tabla 8 (página siguiente) se relaciona el estado en folatos (reflejado en las concentraciones de folato plasmático y eritrocitario y tHcy) con cada polimorfismo estudiado, de manera individual.

Tabla 8. Estado en folatos según el polimorfismo

Polimorfismo	n	Folato plasmático (nmol/L)	Folato eritrocitario (nmol/L)	tHcy <sup>a</sup> (μmol/L)
<i>MTHFR 677C&gt;T</i>				
CC	276	12.4 [11.6-13.2] <sup>b</sup>	889 [851-929]	8.9 [8.6-9.2] (255) <sup>c</sup>
CT	359	11.3 [10.6-11.9]	821 [791-852] <sup>*</sup>	9.2 [9.0-9.5] (335)
TT	140	10.0 [9.2-11.9] <sup>*</sup>	652 [611-695] <sup>*,†</sup>	11.2 [10.5-11.9] (128) <sup>*,†</sup>
<i>MTHFR 1298A&gt;C<sup>d</sup></i>				
AA	87	12.1 [10.8-13.6]	856 [796-921]	8.9 [8.3-9.4] (82)
AC	138	13.1 [12.0-14.4]	916 [860-976]	8.9 [8.5-9.2] (127)
CC	51	11.1 [9.4-13.1]	875 [785-976]	9.3 [8.6-10.0] (46)
<i>MTRR 66A&gt;G</i>				
AA	201	11.1 [10.3-12.0]	764 [724-805]	9.3 [8.9-9.7] (187)
AG	387	11.9 [11.3-12.6]	833 [801-866]	9.5 [9.2-9.8] (358)
GG	183	10.9 [10.1-11.8]	820 [778-865]	9.5 [9.0-9.9] (169)
<i>MTRR 524C&gt;T</i>				
CC	305	11.0 [10.4-11.7]	788 [755-822]	9.5 [9.2-9.8] (287)
CT	364	11.6 [10.9-12.3]	818 [785-852]	9.5 [9.2-9.8] (335)
TT	102	12.2 [11.1-13.4]	860 [811-911]	8.9 [8.4-9.4] (92)
<i>MTHFD1 -105C&gt;T</i>				
CC	182	12.1 [11.2-13.1]	833 [790-878]	9.4 [9.0-9.7] (167)
CT	369	11.2 [10.7-12.0]	819 [786-854]	9.3 [9.1-9.6] (341)
TT	219	10.9 [10.2-11.7]	775 [740-813]	9.6 [9.2-10.0] (206)
<i>MTHFD1 1958G&gt;A</i>				
GG	254	11.0 [10.3-11.8]	780 [745-816]	9.5 [9.2-9.9] (237)
GA	364	11.5 [10.9-12.2]	830 [798-864]	9.3 [9.0-9.6] (339)
AA	157	11.9 [10.9-12.9]	814 [766-865]	9.6 [9.2-10.1] (142)
<i>SLC19A1 80G&gt;A</i>				
GG	197	11.9 [11.0-12.9]	861 [815-910]	9.6 [9.3-10.0] (183)
GA	394	11.4 [10.9-12.0]	804 [775-833]	9.4 [9.1-9.7] (362)
AA	182	10.9 [10.0-11.9]	776 [733-822] <sup>*</sup>	9.2 [8.8-9.6] (171)
<i>DHFR 19del</i>				
SS <sup>e</sup>	275	11.5 [10.8-12.2]	821 [786-856]	9.4 [9.1-9.7] (255)
Sdel	346	11.2 [10.6-11.9]	801 [768-835]	9.4 [9.1-9.7] (318)
deldel	149	11.6 [10.6-12.6]	806 [756-858]	9.5 [9.1-10.0] (140)
<i>FOLR1 1314G&gt;A</i>				
GG	699	11.3 [10.9-11.8]	809 [787-832]	9.4 [9.2-9.7] (650)
GA	61	12.2 [10.6-13.9]	812 [732-900]	8.9 [8.3-9.6] (55)
AA	7	12.6 [7.5-21.8]	818 [579-1156]	11.4 [10.0-13.1] (6)

<sup>a</sup>tHcy: homocisteína plasmática total en ayunas. <sup>b</sup>Media geométrica [límites inferior-superior del IC al 95%]. <sup>c</sup>(n). En este análisis solo se incluyeron las muestras que fueron procesadas en menos de 2 horas tras la extracción para evitar valores falsamente elevados de tHcy<sup>263</sup>. <sup>d</sup>Análisis limitado a individuos salvajes para el polimorfismo *MTHFR 677C>T* debido al desequilibrio de ligamiento entre *MTHFR 677C>T* y *1298A>C*. <sup>e</sup>S:alelo salvaje. ANOVA <sup>\*</sup>p<0.05 respecto a los salvajes; <sup>†</sup>p<0.05 respecto a los heterocigotos.

Se ha hallado una concentración menor de folato plasmático en individuos homocigóticos respecto a individuos con genotipo salvaje para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T. También se ha encontrado una concentración menor de folato eritrocitario en individuos heterocigóticos respecto individuos con genotipo salvaje y en homocigóticos respecto heterocigóticos y respecto individuos con genotipo salvaje para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T. También se encontró una concentración menor de folato eritrocitario en individuos homocigóticos respecto individuos con genotipo salvaje para el polimorfismo *SLC19A1* 80 G>A. En cuanto a la concentración de tHcy sólo se ha hallado una concentración mayor en individuos homocigóticos respecto heterocigóticos y genotipo salvaje para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T. La cobalamina plasmática no fue diferente entre las distintas variantes de ninguno de los polimorfismos estudiados.

En la tabla 9 se muestran las concentraciones de folato plasmático, eritrocitario y tHcy según la combinación de polimorfismos en relación a los salvajes para ambos. La concentración de folato eritrocitario fue menor y la de tHcy fue mayor en todas aquellas combinaciones de dobles homocigotos que contenían el genotipo *MTHFR* 677 C>T en comparación con sus respectivas combinaciones salvajes. Además, la concentración de folato plasmático también fue menor en las combinaciones *MTHFR* 677TT - *SLC19A1* 80AA y *MTHFR* 677TT - *MTHFD1* -105TT que en los individuos con genotipo salvaje para ambos polimorfismos de cada una de estas combinaciones. La concentración de folato eritrocitario también fue menor en aquellos individuos con el genotipo *SLC19A1* 80 G>A - *MTHFD1* -105 C>T y sin embargo mayor en aquellos con el genotipo *MTHFD1* 1958 G>A/*MTRR* 66 A>G en relación a sus respectivas combinaciones salvajes.

**Tabla 9. Estado en folatos según la combinación de polimorfismos**

Combinaciones de polimorfismos	n	Folato plasmático (nmol/L)	Folato eritrocitario (nmol/L)	tHcy <sup>a</sup> (µmol/L)
<i>MTHFR</i> 677 C>T/ <i>DHFR</i> 19del				
CC/SS <sup>b</sup>	105	12.9 [11.6-14.4] <sup>c</sup>	913 [851-981]	9.2 [8.8-9.7] (100) <sup>d</sup>
CT/del	291	11.0 [10.3-11.7]*	777 [742-813]*	9.6 [9.3-10.0] (273)
CT/Sdel				
TT/Sdel	34	10.3 [8.6-12.4]	687 [605-780]*	11.4 [10.1-12.8] (31)*, †
TT/del				
<i>MTHFR</i> 677 C>T/ <i>SLC19A1</i> 80 G>A				
CC/GG	72	13.6 [12.0-15.5]	998 [918-1086]	9.3 [8.7-9.9] (66)
CT/AA	348	11.0 [10.4-11.6]*	773 [744-803]*	9.6 [9.3-9.9] (324)
CT/GA				
TT/GA	24	9.6 [7.4-12.5]*	651 [525-807]*	11.1 [9.5-12.9] (20)*
TT/AA				
<i>MTHFR</i> 677 C>T/ <i>MTHFD1</i> 1958 G>A				

CC/GG	98	12.2 [10.9-13.5]	848 [791-910]	8.9 [8.5-9.3] (93)
CT/AA				
CT/GA	307	11.3 [10.7-12.0]	807 [773-841]	9.4 [9.1-9.8] (285)
TT/GA				
TT/AA	36	9.6 [8.1-11.4]	611 [547-684] <sup>*,†</sup>	11.3 [9.8-13.0] (34) <sup>*,†</sup>
<b>MTHFR 677 C&gt;T/MTHFD1 -105 C&gt;T</b>				
CC/CC	70	13.1 [11.4-15.0]	889 [824-958]	8.9 [8.3-9.4] (66)
CT/TT				
CT/CT	337	10.8 [10.2-11.5] <sup>*</sup>	783 [753-814] <sup>*</sup>	9.5 [9.2-9.8] (315)
TT/CT				
TT/TT	46	9.4 [8.0-11.0] <sup>*</sup>	606 [546-673] <sup>*,†</sup>	11.4 [10.0-12.9] (43) <sup>*,†</sup>
<b>MTHFR 677 C&gt;T/MTRR 66 A&gt;G</b>				
CC/AA	69	12.7 [11.1-14.5]	912 [837-993]	8.5 [7.9-9.1] (64)
CT/GG				
CT/AG	326	11.2 [10.6-11.9]	807 [774-841] <sup>*</sup>	9.6 [9.3-9.9] (302) <sup>*</sup>
TT/AG				
TT/GG	38	10.5 [8.8-12.6]	743 [666-828] <sup>*</sup>	11.4 [9.9-13.1] (35) <sup>*,†</sup>
<b>SLC19A1 80 G&gt;A/MTHFD1 -105 C&gt;T</b>				
GG/CC	47	12.4 [10.6-14.6]	893 [801-996]	9.8 [9.1-10.5] (44)
GA/TT				
GA/CT	392	11.2 [10.6-11.8]	799 [770-830] <sup>*</sup>	9.4 [9.1-9.6] (363)
AA/CT				
AA/TT	47	9.7 [8.1-11.5]	694 [621-777] <sup>*</sup>	9.8 [8.9-10.7] (46)
<b>MTHFD1 1958 G&gt;A/MTRR 66 A&gt;G</b>				
GG/AA	67	10.2 [8.9-11.7]	717 [656-784]	9.4 [8.7-10.1] (64)
GA/GG				
GA/AG	346	11.7 [11.0-12.4]	839 [806-874] <sup>*</sup>	9.4 [9.1-9.7] (319)
AA/AG				
AA/GG	38	11.2 [9.3-13.5]	850 [754-959]	9.6 [8.5-10.8] (35)
<b>SLC19A1 80 G&gt;A/MTHFD1 1958 G&gt;A</b>				
GG/GG	61	11.1 [9.6-12.7]	815 [740-898]	9.9 [9.3-10.5] (58)
GA/AA				
GA/GA	541	11.3 [10.8-11.9]	799 [775-825]	9.3 [9.1-9.6] (499)
AA/GA				
AA/AA	35	10.2 [8.4-12.3]	729 [636-834]	9.7 [8.7-10.8] (34)
<b>SLC19A1 80 G&gt;A/DHFR 19del</b>				
GG/SS	70	11.1 [9.9-12.4]	853 [786-925]	9.2 [8.7-9.8] (67)
GA/deldel				
GA/Sdel	338	11.0 [10.4-11.7]	787 [756-819]	9.3 [9.0-9.6] (312)
AA/Sdel				
AA/deldel	31	11.4 [8.9-14.5]	753 [639-888]	9.4 [8.4-10.4] (31)
<b>SLC19A1 80 G&gt;A/MTRR 66 A&gt;G</b>				
GG/AA	52	10.0 [8.7-11.5]	702 [634-778]	9.9 [8.9-10.9] (48)
GA/GG				
GA/AG	383	11.4 [10.8-12.0]	802 [772-832]	9.5 [9.2-9.8] (354)
AA/AG				
AA/GG	41	9.7 [8.4-11.3]	777 [699-864]	9.2 [8.2-10.2] (37)

<b>MTHFD1 1958 G&gt;A/MTHFD1 -105 C&gt;T</b>					
GG/CC	86	12.0 [10.6-13.4]	783 [725-846]	9.6 [9.2-10.2]	(79)
GA/TT					
GA/CT	341	11.4 [10.8-12.1]	816 [782-852]	9.4 [9.1-9.7]	(316)
AA/CT					
AA/TT	80	11.2 [9.9-12.6]	795 [736-859]	9.5 [8.8-10.3]	(73)
<b>MTHFD1 1958 G&gt;A/DHFR 19del</b>					
GG/SS	86	11.6 [10.4-12.9]	809 [749-874]	9.5 [9.0-10.0]	(82)
GA/del					
GA/Sdel	303	11.6 [10.9-12.4]	825 [788-863]	9.4 [9.0-9.7]	(283)
AA/Sdel					
AA/del	25	11.4 [9.4-13.9]	791 [690-906]	9.6 [8.7-10.6]	(21)
<b>MTHFD1 -105 C&gt;T/DHFR 19del</b>					
CC/SS	65	11.6 [10.1-13.2]	834 [765-909]	9.2 [8.6-9.7]	(57)
CT/del					
CT/Sdel	332	11.1 [10.4-11.8]	796 [762-831]	9.4 [9.1-9.7]	(305)
TT/Sdel					
TT/del	43	10.4 [8.9-12.1]	777 [688-879]	9.5 [8.7-10.3]	(41)
<b>MTHFD1 -105 C&gt;T/ MTRR 66 A&gt;G</b>					
CC/AA	43	11.1 [9.6-12.8]	741 [665-827]	9.5 [8.6-10.5]	(40)
CT/GG					
CT/AG	364	11.5 [10.9-12.2]	830 [797-863]	9.4 [9.2-9.8]	(336)
TT/AG					
CC/GG	8	9.9 [6.7-14.8]	715 [512-1000]	8.2 [6.7-10.2]	(8)
<b>DHFR 19del/ MTRR 66 A&gt;G</b>					
SS/AA	71	11.7 [10.3-13.1]	822 [757-893]	9.2 [8.6-9.7]	(67)
Sdel/GG					
Sdel/AG	328	11.6 [10.9-12.3]	828 [793-863]	9.5 [9.2-9.8]	(302)
del					
del/GG	35	11.8 [9.9-14.0]	865 [779-962]	9.4 [8.4-10.5]	(34)

<sup>a</sup>tHcy: homocisteína plasmática total en ayunas. <sup>b</sup>S:alelo salvaje. <sup>c</sup>Media geométrica [límites inferior-superior del IC al 95%]. <sup>d</sup>(n). En este análisis solo se incluyeron las muestras que fueron procesadas en menos de 2 horas tras la extracción para evitar valores falsamente elevados de tHcy<sup>263</sup>. ANOVA \*p<0.05 en comparación al salvaje. †p<0.05 en comparación a los heterocigotos/heterocigotos, heterocigotos/homocigotos y homocigotos/heterocigotos.

En la tabla 10 se ilustra el riesgo de tener el folato plasmático en el tercil más bajo que implica ser homocigoto para un determinado polimorfismo o combinación de ellos respecto a tener el genotipo salvaje. En la tabla solo se muestran aquellos modelos con resultados estadísticamente significativos o muy cercanos a la significación. El único valor significativo de entre los modelos que contemplaban cada polimorfismo de manera aislada es el correspondiente a la presencia de *MTHFR 677 C>T* en homocigosis, que duplica el riesgo de ser deficiente en folatos respecto al genotipo salvaje. En lo que respecta a los modelos realizados con combinaciones de dos polimorfismos, hallamos dos valores significativos, que corresponden a la combinación en homocigosis de los polimorfismos *MTHFR 677 C>T* y *MTHFD1 1958 G>A*, y a la combinación en homocigosis de los polimorfismos *MTHFR 677 C>T* y

*SLC19A1* 80G>A, que multiplican por 3.2 y 5.6 respectivamente el riesgo de ser deficiente en folato. Las combinaciones heterocigoto-heterocigoto, homocigoto-heterocigoto o heterocigoto-homocigoto para la pareja *MTHFR* 677C>T-*SLC19A1* 80G>A duplicaron dicho riesgo respecto a la combinación de genotipos salvajes. Aplicando el método descrito por Knol y colaboradores<sup>270</sup> hemos observado que el riesgo de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático es significativamente superior ( $p < 0.05$ ) en los individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT-*SLC19A1* 80AA en relación con aquellos con el genotipo *MTHFR* 677TT, sin tener en cuenta cuál sea el genotipo para el polimorfismo *SLC19A1* 80G>A.

Al hacer estas regresiones logísticas, encontramos que hubo interacción entre el hábito tabáquico y los siguientes genotipos y combinaciones de genotipos sobre el estado en folatos: *MTHFD1* -105TT, *DHFR* 19del, *MTHFR* 677TT - *MTHFD1* -105TT y *MTHFR* 677TT *DHFR* 19del ( $p$  para cada interacción  $< 0.05$ ). Esto significa que el hábito tabáquico modifica el efecto del polimorfismo o combinación de polimorfismos en cuestión sobre el estado en folato plasmático.

Limitando el análisis a los individuos no fumadores, la combinación *MTHFR* 677TT-*DHFR* 19del incrementó el riesgo de tener el folato plasmático en el tercil más bajo casi 5 veces. Este riesgo es significativamente superior ( $p < 0.05$ ) al que presentan aquellos individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT, sin tener en cuenta cuál sea el genotipo para el polimorfismo *DHFR* 19del. Las combinaciones heterocigoto-heterocigoto, homocigoto-heterocigoto o heterocigoto-homocigoto para esta pareja de polimorfismos dobló dicho riesgo respecto a la combinación de genotipos salvajes. El modelo limitado a individuos fumadores resultó ser no significativo.

En la tabla 11 se muestra el riesgo de tener el folato eritrocitario en el tercil más bajo ( $\leq 680$  nmol/L) que implica ser homocigoto para un determinado polimorfismo o combinación de ellos respecto a tener el genotipo salvaje. Los individuos fumadores no fueron excluidos de estos modelos porque no se observaron interacciones tabaco-genotipo para ninguno de los genotipos o combinaciones.



**Tabla 10. Genotipos o combinaciones de genotipos y riesgo de tener el folato plasmático en el tercil más bajo (<9.1nmol/L)**

Polimorfismo o combinación (N en el modelo <sup>a</sup> )	Genotipo	OR (IC 95%) <sup>b</sup>	p	R <sup>2</sup>
<i>MTHFR</i> 677 C>T (713)	CC <sup>c</sup>	1		
	CT	1.36 (0.92-2.01)	0.129	0.223 <sup>***</sup>
	TT	2.41 (1.48-3.92)	<0.001	
<i>MTHFR</i> 677 C>T / <i>SLC19A1</i> 80G>A (410)	CC/GG <sup>c</sup>	1		
	CT/AA			
	CT/GA	2.05 (1.01-4.18)	0.048	0.245 <sup>***</sup>
	TT/GA			
<i>MTHFR</i> 677 C>T / <i>MTHFD1</i> 1958G>A (401)	CC/GG <sup>c</sup>	1		
	CT/AA			
	CT/GA	1.77 (0.97-3.21)	0.061	0.197 <sup>***</sup>
	TT/GA			
<i>MTHFR</i> 677 C>T + <i>MTHFD1</i> -105C>T <sup>d</sup> (271)	CC/CC <sup>c</sup>	1		
	CT/TT			
	CT/CT	2.17 (0.93-5.10)	0.075	0.257 <sup>***</sup>
	TT/CT			
<i>MTHFR</i> 677 C>T / <i>DHFR</i> 19del <sup>d</sup> (261)	CC/SS <sup>c,e</sup>	1		
	CT/del			
	CT/Sdel	2.48 (1.13-5.45)	0.024	0.231 <sup>***</sup>
	TT/Sdel			
	TT/del	4.69 (1.42-15.45)	0.011	

<sup>a</sup>Modelos de regresión logística múltiple ajustados por género, edad, creatinina, ingesta de folato, cobalamina plasmática, ingesta de alcohol y hábito tabáquico. <sup>b</sup>Odds ratio (intervalo de confianza al 95%). <sup>c</sup>Categoría de referencia. <sup>d</sup>Modelo limitado a no fumadores. <sup>e</sup>S: Alelo salvaje. <sup>\*\*\*</sup>p<0.001

Ser homocigoto para los polimorfismos *MTHFR* 677C>T o *SLC19A1* 80G>A incrementa el riesgo de bajo folato eritrocitario 6 veces y alrededor de un 78% respectivamente. En los homocigotos para el polimorfismo *MTRR* 524C>T, este riesgo se reduce en un 48%. Las combinaciones *MTHFR* 677TT-*SLC19A1* 80AA, *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* 1958AA, *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* -105TT and *MTHFR* 677TT-*DHFR* 19deldel incrementan dicho riesgo 18, casi 7, 7 y 5 veces respectivamente en comparación con la combinación de las correspondientes variantes salvajes. La probabilidad de bajo folato eritrocitario se dobló en relación a al genotipo salvaje en todas las combinaciones heterocigoto-heterocigoto, homocigoto-heterocigoto o heterocigoto-homocigoto excepto para combinación *MTHFR* 677 C>T-*MTHFD1* 1958G>A. Hemos observado que el riesgo de hallarse en tercil bajo de folato eritrocitario es significativamente superior (p<0.05) en los individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT-*SLC19A1*

80AA en relación con aquellos con el genotipo *MTHFR* 677TT, sin tener en cuenta cuál sea el genotipo para el polimorfismo *SLC19A1* 80G>A.

**Tabla 11. Genotipos o combinaciones de genotipos y riesgo de tener el folato eritrocitario en el tercil más bajo (<680 nmol/L)**

Polimorfismo o combinación (N en el modelo <sup>a</sup> )	Genotipo	OR (IC 95%) <sup>b</sup>	p	R <sup>2</sup>
<i>MTHFR</i> 677 C>T (713)	CC <sup>c</sup>	1		
	CT	1.11 (0.73-1.67)	0.634	0.312 <sup>***</sup>
	TT	5.93 (3.53-9.95)	<0.001	
<i>SLC19A1</i> 80G>A <sup>d</sup> (711)	GG <sup>c</sup>	1		
	GA	1.09 (0.69-1.72)	0.721	0.318 <sup>***</sup>
	AA	1.78 (1.04-3.03)	0.036	
<i>MTRR</i> 524 C>T <sup>d</sup> (708)	CC <sup>c</sup>	1		
	CT	0.86 (0.58-1.26)	0.431	0.317 <sup>***</sup>
	TT	0.52 (0.28-0.96)	0.036	
<i>MTHFR</i> 677 C>T + <i>SLC19A1</i> 80G>A (410)	CC/GG <sup>c</sup>	1		
	CT+AA			
	CT+GA	2.51 (1.17-5.41)	0.018	0.300 <sup>***</sup>
	TT+GA			
<i>MTHFR</i> 677 C>T + <i>MTHFD1</i> 1958G>A (401)	CC/GG <sup>c</sup>	1		
	CT+AA			
	CT+GA	1.36 (0.76-2.44)	0.299	0.229 <sup>***</sup>
	TT+GA			
<i>MTHFR</i> 677 C>T + <i>MTHFD1</i> -105C>T (417)	CC/CC <sup>c</sup>	1		
	CT+TT			
	CT+CT	2.33 (1.13-4.79)	0.022	0.274 <sup>***</sup>
	TT+CT			
<i>MTHFR</i> 677 C>T / <i>DHFR</i> 19del (397)	CC/SS <sup>c,e</sup>	1		
	CT/del <del>del</del>			
	CT/Sdel	2.76 (1.47-5.19)	0.002	0.330 <sup>***</sup>
	TT/Sdel			
	TT/del <del>del</del>	5.43 (2.02-14.58)	0.001	

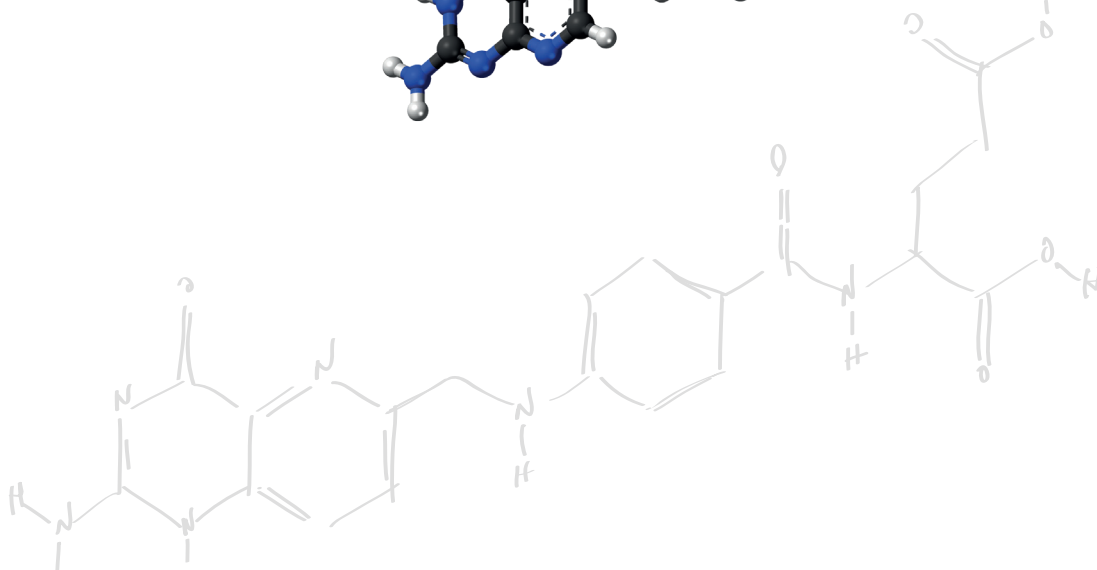
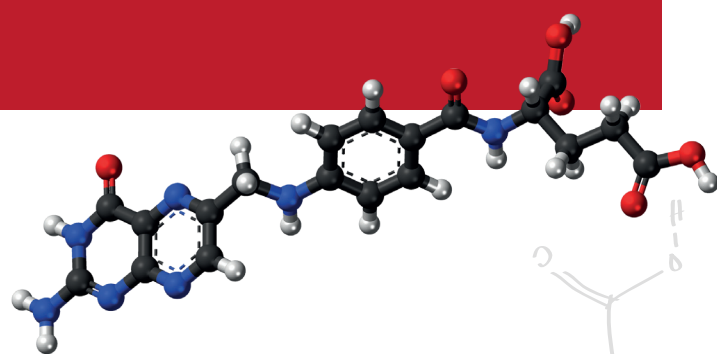
<sup>a</sup>Modelos de regresión logística múltiple ajustados por género, edad, creatinina, ingesta de folato, cobalamina plasmática, ingesta de alcohol y hábito tabáquico. <sup>b</sup>Odds ratio (intervalo de confianza al 95%). <sup>c</sup>Categoría de referencia. <sup>d</sup>Modelo ajustado por genotipo *MTHFR* 677TT. <sup>e</sup>S: Alelo salvaje. \*\*\* p<0.001

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



# DISCUSIÓN

## ESTUDIO POBLACIONAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

En esta tesis hemos analizado cómo varios polimorfismos presentes en seis genes implicados en el metabolismo de los folatos se asocian con el estado en folatos de una muestra de la población española mediante las variaciones en las concentraciones de folato plasmático, folato eritrocitario y tHcy. Esta población es especialmente adecuada para analizar el componente genético del estado en folatos porque, en contraste con otros estudios, no está expuesta a un programa nacional de fortificación obligatoria de los alimentos ni a suplementación voluntaria con vitaminas del grupo B. Además, los participantes en el estudio se reclutaron de manera aleatorizada y estratificada por sexo y edad del padrón municipal, de manera que la muestra fue diseñada para ser representativa en estas características.

## **1. Estado en folatos de la muestra**

Como se observó en la Tabla 5, en esta muestra hallamos que la densidad en folatos de la dieta es superior en mujeres que en hombres, quizá más concienciadas de los beneficios de una dieta sana y equilibrada, y también que aumenta con la edad, un reflejo de que la dieta mediterránea está perdiendo terreno entre la población más joven<sup>271</sup>. La tHcy también resultó ser mayor en hombres que en mujeres y aumenta con la edad, tal y como recoge el Hordaland Homocysteine Study<sup>272</sup>. No obstante, no hay que pasar por alto que la concentración de folato aumentaba con la edad, al igual que la de homocisteína, como acabamos de comentar. En primera instancia éste podría parecer un dato carente de sentido biológico, pues la literatura recoge que homocisteína y folato suelen presentar una correlación negativa<sup>273</sup>. Sin embargo existen evidencias de que la edad es un factor determinante de la tHcy<sup>191,274-276</sup>, y pudiera suceder que a pesar de presentar un mejor estado en folatos al aumentar la edad, la disminución en la absorción de nutrientes o el empeoramiento de la función renal asociados a la edad tuvieran más peso y como consecuencia la tHcy fuera mayor.

Debido a la falta de valores de referencia consensuados en la literatura sobre qué punto de corte de folato plasmático (determinado por ensayo microbiológico) identifica el estado de deficiencia, hemos evaluado las posibilidades previamente utilizadas. Descartamos la opción calculada a partir del valor mínimo de tHcy que se podía alcanzar (10 nmol/L) propuesta por Brouwer et al.<sup>277</sup> ya que este valor había sido calculado mediante radioinmunoensayo, y las determinaciones de nuestras muestras se realizaron mediante ensayo microbiológico. Aplicando la conversión de radioinmunoensayo a ensayo microbiológico propuesta por Fazili y colaboradores<sup>77</sup> el punto de corte sería 14 nmol/L. No obstante, hay que tener en cuenta que

la propuesta de Brouwer está basada en determinaciones realizadas con una muestra de 103 individuos que no corresponde a una muestra representativa de la población.

Otra opción podría ser la de evaluar el estado en folatos a partir de los valores de tHcy, pero hasta ahora no se han descrito valores de referencia diferenciados para hombres y mujeres y grupos de edad, dos factores (sexo y edad) que modifican la tHcy<sup>275</sup> y que podrían sesgar el efecto del genotipo sobre el estado en folatos, objetivo principal de este trabajo. Optamos finalmente por aplicar el punto de corte de concentración plasmática de folatos establecido por Chanarin<sup>83</sup> en 3 ng/mL, o lo que es lo mismo, 7 nmol/L.

Aplicando este criterio, observamos que un 18,8% de la muestra estudiada presentaba un estado nutricional deficiente en folatos (Tabla 6). Encontramos también que esta deficiencia disminuye con la edad al igual que han descrito otros autores<sup>84</sup>, posiblemente como consecuencia de una dieta más densa en folatos en la edad avanzada, algo que podría ser un reflejo de que la dieta mediterránea está perdiendo terreno entre la población más joven<sup>271</sup>.

## 2. Polimorfismos en la muestra

Como se observa en la tabla 7, los polimorfismos más frecuentes en la muestra estudiada son *MTHFD1* -105C>T, *MTRR* 66A>G y *SLC19A1* 80G>A. El polimorfismo *MTHFR* 677C>T se halla presente en homocigosis en un 18% de la muestra estudiada, lo que unido a un aporte insuficiente de folato dietético podría comprometer el estado en folatos de gran parte de la población. Las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas para los polimorfismos estudiados son muy similares a las ya descritas en otras poblaciones caucásicas<sup>167,170,191,194,195,199</sup>. Para el polimorfismo *FOLR1* 1314 G>A, las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en este trabajo coinciden con las descritas por Böttiger y colaboradores<sup>185</sup> en una población caucásica, mientras que no lo hacen con las descritas por Zhang<sup>278</sup>, quien identificó por primera vez este polimorfismo en una población china.

## 3. Polimorfismos y estado en folatos

Al igual que otros autores, hallamos que los individuos homocigotos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentan una concentración de folato plasmático inferior<sup>191,279,280</sup> y una concentración de tHcy superior<sup>186,279</sup> en comparación con los individuos salvajes, así como una relación inversa entre la concentración de eritrocitario y el número de alelos T de dicho polimorfismo<sup>191</sup> (Tabla 8).

Al contrario que en un estudio previo <sup>210</sup>, el polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C no influyó sobre el folato eritrocitario. Dicho estudio se realizó en mujeres embarazadas no expuestas a suplementación o fortificación obligatoria con ácido fólico y las determinaciones se realizaron mediante ensayo microbiológico. Limitando nuestro análisis a mujeres en edad fértil, los resultados no varían. Esto podría deberse a que solo se incluyen 13 individuos homocigotos en el análisis o debido a que el efecto del polimorfismo solo se manifiesta cuando el estado en folato es muy bajo.

El folato eritrocitario descendió progresivamente a medida que aumentaba el número de alelos A del polimorfismo *SLC19A1* 80G>A. Se observó la misma tendencia para el folato plasmático, como ya se había descrito previamente <sup>167</sup>. Esta asociación negativa contrasta con trabajos previos que se diferencian del presente en aspectos tan fundamentales como el tipo y el tamaño de la muestra, la exposición a suplementación o fortificación con ácido fólico o el método empleado para realizar las determinaciones. Algunos autores no describen ninguna asociación entre el genotipo *SLC19A1* 80AA y el folato eritrocitario <sup>163,171,281</sup>. Otros sin embargo, relacionan dicho genotipo con una concentración elevada de folato eritrocitario <sup>166,174</sup>. En un estudio de más de 10000 participantes en el que los usuarios de suplementos vitamínicos no fueron excluidos se observó una moderada tendencia a la baja del folato plasmático en presencia de dicho polimorfismo <sup>167</sup>.

Cabe destacar que existe mucha confusión en cuanto a la nomenclatura de este polimorfismo debido a que las frecuencias de los dos genotipos homocigóticos son muy similares y resulta difícil esclarecer qué alelo es el más común en la población. Dado que el alelo G es ligeramente más prevalente en nuestra muestra, y dada la asociación inversa descrita entre el alelo A y la concentración de folato eritrocitario, nos referiremos a él como *SLC19A1* 80G>A al igual que diversos autores <sup>163,167,170-172,175,176,281</sup>.

Como ya se había descrito con anterioridad, las concentraciones de folato plasmático y eritrocitario así como de tHcy no fueron distintas entre las diferentes variantes de los polimorfismos *MTRR* 66 A>G<sup>282</sup>, *FOLR1* 1314 G>A<sup>185</sup>, *MTHFD1* 1958 G>A<sup>167</sup> y *DHFR* 19del<sup>283</sup>. Por primera vez también confirmamos estas observaciones para los polimorfismos *MTRR* 524 C>T y *MTHFD1* -105 C>T. Es necesario remarcar que resulta muy difícil comparar nuestros resultados con los de otros autores debido a que tanto las poblaciones como las técnicas de determinación utilizadas son muy dispares entre ellos. Algunos realizan estas determinaciones mediante radioinmunoensayo mientras que otros utilizan el ensayo microbiológico. Cabe destacar que la realización de las determinaciones mediante radioinmunoensayo en los individuos *MTHFR* 677TT puede dar lugar a valores falsamente superiores de folato plasmático



a los obtenidos mediante ensayo microbiológico<sup>284</sup>. Molloy y colaboradores<sup>284</sup> proponen que la causa de este fenómeno sea que la reducida actividad enzimática permita la acumulación de derivados o de productos de degradación del folato, que podrían ser detectados mediante el radioinmunoensayo pero que realmente no son microbiológicamente activos.

#### 4. Combinaciones de polimorfismos y estado en folatos

Con el objetivo de explorar posibles interacciones entre genes que pudieran alterar el estado en folato, formamos parejas entre los seis polimorfismos más frecuentes en nuestra muestra, obteniendo de esta manera quince parejas de polimorfismos. Como se muestra en la tabla 9, el estado en folatos fue peor en los dobles homocigotos (aproximadamente un 6% de la muestra) que en los dobles salvajes para cualquier pareja que incluyera el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T.

La asociación entre la combinación *MTHFR* 677TT-*SLC19A1* 80AA y un peor estado en folatos contrasta con los resultados de un estudio más pequeño realizado con adultos franceses<sup>163</sup> y con los de otro realizado con ancianos sanos no usuarios de suplementos vitamínicos en el Reino Unido<sup>170</sup>. Estas diferencias probablemente se deban a aspectos de estos estudios que los hacen diferentes del nuestro, como la edad de los participantes, su estado de salud, el uso de suplementos vitamínicos, o el tamaño de la muestra.

La concentración de folato eritrocitario fue inferior en aquellos individuos con el genotipo *SLC19A1* 80AA-*MTHFD1* -105TT y superior en aquellos con el genotipo *MTRR* 66GG-*MTHFD1* 1958AA en comparación con sus correspondientes combinaciones de genotipos salvajes. La función alterada del transportador de folatos junto con una producción reducida de 5, 10-metilTHF debido a una menor actividad del promotor del gen *MTHFD1*<sup>216</sup> derivadas de las variantes polimórficas de la primera combinación podría desembocar en una menor concentración de 5-metilTHF eritrocitario. Con respecto a la segunda combinación, resulta plausible pensar que una menor estabilidad de la enzima MTR<sup>219</sup> unida a la actividad reducida de la enzima *MTHFD1*<sup>213</sup> pudieran llevar a la acumulación de 5-metilTHF y THF respectivamente, lo que a su vez llevaría al aumento de la concentración de folato eritrocitario cuando estas dos condiciones se dieran simultáneamente.

Tras estos análisis preliminares, realizamos modelos de regresión logística múltiple para determinar el riesgo (OR) de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario en presencia de determinados polimorfismos y sus combinaciones (Tablas 10 y 11).

La presencia del genotipo *MTHFR* 677TT se asoció con un riesgo 2 y 6 veces mayor de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario respectivamente, en concordancia con los análisis descriptivos iniciales.

La probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario también fue mayor en los individuos con el genotipo *SLC19A1* 80AA en comparación con aquellos que tenían el genotipo salvaje. Las observaciones de esta tesis sugieren de nuevo una alteración en el transportador de folatos en presencia de este polimorfismo.

Por primera vez describimos la tendencia hacia un mejor estado en folatos en presencia del alelo T del polimorfismo *MTRR* 524C>T, ya que los individuos homocigotos para dicho polimorfismo tienen un riesgo un 48% menor de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario en relación a los individuos salvajes. Es posible que una estabilidad reducida de la enzima *MTRR* en presencia del citado polimorfismo lleve a la acumulación de 5-metilTHF en el interior de los eritrocitos.

La combinación de genotipos *MTHFR* 677TT-*SLC19A1* 80AA se asocia con un riesgo mayor de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario a media que aumenta el número de alelos mutados para esta combinación. El polimorfismo *SLC19A1* 80G>A podría resultar en una menor incorporación de 5-metilTHF a la célula, potenciando por tanto la disminución del aporte de 5-metilTHF en presencia del polimorfismo *MTHFR* 677C>T<sup>186</sup>.

El incremento del riesgo de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario asociado a la presencia de la combinación de genotipos *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* 1958AA podría deberse a una menor actividad enzimática en dos reacciones del ciclo de los folatos que llevaría a una menor producción de 5-metilTHF. Es posible que la producción de 5-metilTHF se vea disminuida a causa de una menor vida media de la enzima *MTHFD1* en presencia del polimorfismo *MTHFD1* 1958G>A<sup>213</sup>.

Solamente se incluyeron individuos no fumadores en los modelos de folato plasmático para las combinaciones de genotipos *MTHFR* 677TT-*DHFR* 19del y *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* -105TT ya que se halló interacción entre el hábito tabáquico y estos genotipos. El estado en folatos disminuido a causa de dicho hábito<sup>285,286</sup> podría estar enmascarando el efecto de dichos genotipos sobre el estado en folato plasmático, aunque no sobre el estado en folato eritrocitario.

La probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático entre los individuos no fumadores con la combinación de genotipos *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* -105TT fue superior ( $p=0.058$ ) a la de aquellos individuos con la correspondiente combinación de genotipos salvajes. Esta afirmación también es cierta para la probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario tomando en cuenta tanto a individuos no fumadores como fumadores.

Dichas probabilidades fueron en aumento a medida que aumentaba también el número de alelos mutados en esta combinación, presentando por tanto un patrón de dosis-respuesta. La combinación por un lado de una actividad reducida de la enzima MTHFR<sup>186</sup> que conduce a la presencia de menos 5-metilTHF disponible para la producción de THF, junto con una menor actividad del promotor del gen que codifica para la enzima MTHFD1<sup>216</sup> que conduce a una menor producción de 5, 10-metilenTHF, aumentaría la probabilidad de tener un bajo estado en folatos.

La combinación de genotipos *MTHFR 677TT-DHFR 19deldel*, que afecta a dos pasos consecutivos del ciclo de los folatos y que se halla presente en un 37% de la muestra, se asocia con un aumento del riesgo de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático a medida que aumenta también el número de alelos mutados en esta combinación, de nuevo solamente en individuos no fumadores. Esta afirmación también es cierta para la probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario tomando en cuenta tanto a individuos no fumadores como fumadores. El dihidrofolato es el sustrato para la enzima DHFR en la producción de THF, y éste lo es a su vez para la enzima MTHFD1 en la producción de 5, 10-metilentetrahidrofolato<sup>212</sup>. Una regulación a la baja de esta reacción podría conducir a una menor producción de 5-metilTHF en el siguiente paso del ciclo de los folatos.

Al comparar los efectos individuales del genotipo MTHFR 677TT de manera aislada, parece que es el polimorfismo MTHFR 677C>T el principal causante. No obstante, algunos polimorfismos que de manera individual no afectan al estado en folatos, parecen potenciar el efecto del polimorfismo MTHFR 677C>T sobre otros polimorfismos. A pesar de los amplios intervalos de confianza al 95% que se observan en algunas de las combinaciones de dobles homocigotos menos frecuentes, las asociaciones entre éstas y el estado en folatos fueron muy significativas.

En resumen, esta tesis nos ha permitido conocer el estado en folatos de una muestra representativa de la población sin el efecto confusor de la fortificación y suplementación con ácido fólico. Además hemos determinado por primera vez el efecto del polimorfismo *MTRR 524C>T* y las combinaciones *SLC19A1 80G>A-MTHFD1 -105C>T* y *MTRR 66A>G- MTHFD1 1958G>A* sobre las concentraciones de folato circulante. Por primera vez también se han identificado cuatro polimorfismos cuya presencia modifica el riesgo de bajo estado en folato asociado al polimorfismo *MTHFR 677C>T*.

Cada uno de los polimorfismos estudiados no se encuentran aislados en el organismo, sino que coexisten con otros genes con sus correspondientes polimorfismos, implicados o no en el metabolismo de los folatos. Por eso creemos que es muy acertado analizar el impacto de la presencia simultánea de varios polimorfismos, en lugar de hacerlo de uno solo de forma

aislada. Las combinaciones de polimorfismos analizadas en esta tesis son muy prevalentes en la población estudiada (alrededor de un 5% de dobles homocigotos) y por tanto muy a tener en cuenta de cara a la implementación de políticas de prevención y salud pública relacionadas con el ácido fólico. No obstante, para poder explorar los efectos de combinaciones de más de dos polimorfismos sobre el estado en folatos sería necesaria una muestra de mayor tamaño.

Mediante este trabajo hemos podido explorar el impacto de ciertas combinaciones de polimorfismos implicados en el metabolismo de los folatos en una población no expuesta ni a suplementación ni a fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico. Esta singular característica que no se halla en otros trabajos similares, permite observar el efecto neto del genotipo en una muestra representativa de población, de individuos sanos y sin ningún estrés metabólico como podría ser el desarrollo de un embarazo. Hay que tener en cuenta que un subgrupo de esta muestra, el de mujeres en edad fértil, podría pasar a hallarse bajo dicho tipo de estrés metabólico en cualquier momento, fuera cual fuera su estado en folatos en ese momento.

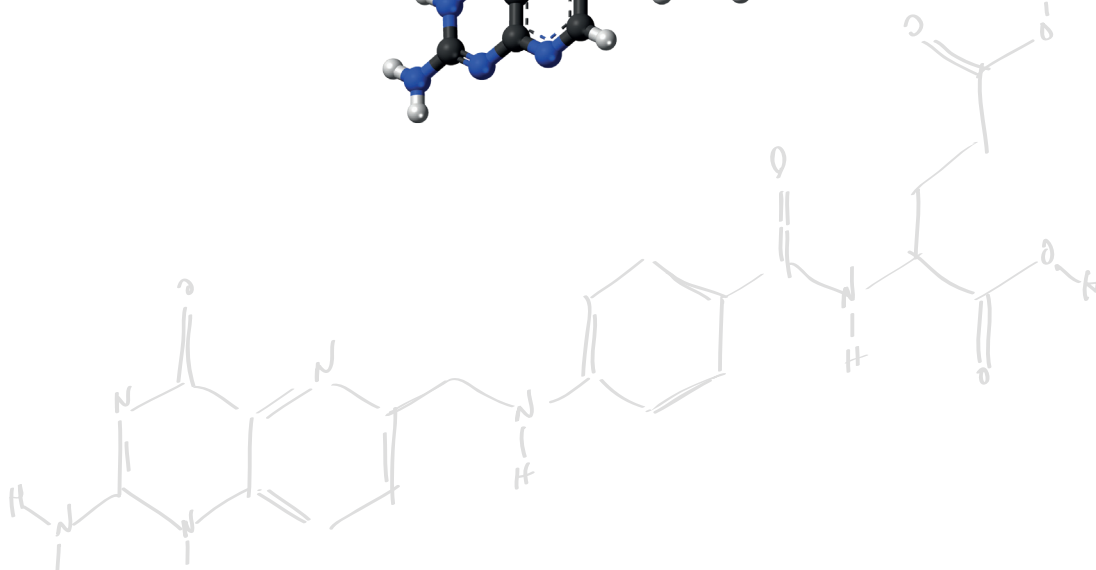
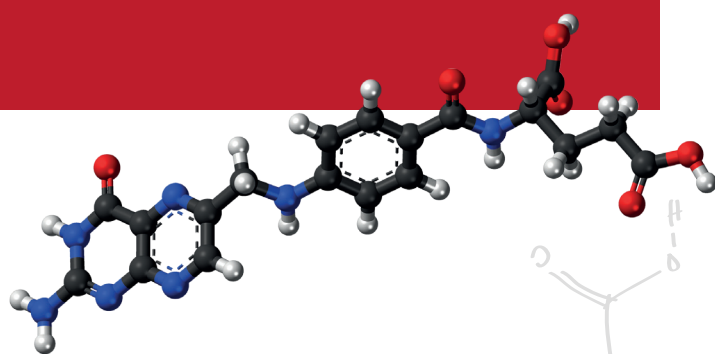
El presente trabajo constituye por lo tanto un punto de partida ideal para dar un paso más allá y explorar el efecto del genotipo sobre el metabolismo de los folatos durante el embarazo en la cohorte de gestantes del estudio NUTCIR.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



# RESULTADOS

## ESTUDIO NUTCIR

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## 1. Características de la muestra

Con el objetivo de investigar si el diferente estado en folato se acompaña de diferencias en cuanto a la exposición a factores ambientales se compararon las características generales de las participantes según el tercil de folato plasmático en el que se encontraban durante el primer trimestre de embarazo (*Tabla 12*).

La media de edad fue de 32 años, y no fue diferente en cada tercil. El IMC medio al inicio del embarazo fue de 23.7 kg/cm<sup>2</sup>, siendo menor en el tercil alto de folato plasmático en relación al bajo. Un 45.1% de las gestantes tenía un nivel socioeconómico alto. La proporción de niveles bajo/medio/alto fue diferente entre terciles, con un mayor número de gestantes de nivel socioeconómico alto en los terciles medio y alto en relación al bajo. La frecuencia de homocigotas para el polimorfismo *MTHFR 677C>T* no fue diferente en los tres terciles. Un 46.6% de las participantes fueron nulíparas y un 11.4% habían sufrido dos o más abortos, sin que hubiera diferencias entre terciles en cuanto a estas características.

Un 81% de las participantes planificaron su embarazo, y un 35% tomaron ácido fólico antes de quedarse embarazadas, porcentajes que también fueron más elevados en el tercil alto respecto al bajo y al medio y en los terciles medio y alto respecto al bajo respectivamente. Durante el primer trimestre de embarazo, un 47.4% siguieron la pauta de suplementación con ácido fólico recomendada por la SEGO. La distribución de las cinco pautas de suplementación fue diferente entre terciles. Así, en el tercil alto hubo muchas más gestantes que se suplementaron con ácido fólico por encima de las recomendaciones de la SEGO en relación al tercil bajo.

En cuanto a los hábitos tóxicos, un 29.3% de las gestantes fumó durante la preconcepción y el primer trimestre y un 18.6% lo hizo durante toda la gestación. Estos porcentajes fueron menores en los terciles medio y alto de folato plasmático en relación al tercil bajo. Un 7% consumió alcohol de forma regular durante la preconcepción y el primer trimestre y tan solo una mujer lo hizo durante toda la gestación. Un 3.1% de las gestantes consumieron sustancia tóxicas ilegales durante la preconcepción y el primer trimestre, mientras que solo tres mujeres lo hicieron durante todo el embarazo.



**Tabla 12. Características generales de las participantes según el tercil (nmol/L) de folato plasmático en el primer trimestre**

Características	Tercil bajo (<17.8)	Tercil medio (17.8-35.1)	Tercil alto (>35.1)	P <sup>a</sup>	Total
Edad de la madre al inicio de la gestación (años)	31.9 [31.1-32.6](184) <sup>b</sup>	31.9 [31.3-32.5](188)	32.3 [31.6-33.0](187)	0.660	32.0 [31.6-32.4](559)
IMC al inicio de la gestación (kg/m <sup>2</sup> )	24.4 [23.6-25.2](155) <sup>b</sup>	23.8 [23.2-24.4](166)	23.0 [22.5-23.6](171) <sup>*</sup>	0.011	23.7 [23.4-24.1](492)
Nivel socioeconómico (%)					
Bajo	10.6 [5.9-15.4](16) <sup>c</sup>	3.5 [1.3-7.4](7)	5.9 [2.8-10.5](10)		6.5 [4.6-10.0] (33)
Medio	57.5 [49.8-65.2](99)	44.2 [36.8-51.6](79) <sup>*</sup>	43.9 [36.4-51.3](78) <sup>*</sup>	0.001	48.4 [44.2-52.6] (256)
Alto	31.9 [24.7-39.1](53)	52.3 [44.9-59.8](95)	50.3 [42.8-57.8](93)		45.1 [40.9-49.3] (241)
Fumadora activa durante (%)					
La preconcepción y el primer trimestre	37.6 [30.5-44.8](66) <sup>c</sup>	27.2 [20.7-33.7](50) <sup>*</sup>	22.9 [16.6-29.1](41) <sup>*</sup>	0.002	29.3 [25.4-33.1] (157)
Toda la gestación	30.4 [23.3-37.5](48)	13.6 [8.4-18.8](24) <sup>*</sup>	12.4 [7.4-17.3](22) <sup>*</sup>	<0.001	18.6 [15.2-22.0] (94)
Consumo de alcohol durante (%)					
La preconcepción y el primer trimestre	6.8 [3.3-12.2](11) <sup>c</sup>	7.9 [4.1-13.4](15)	6.3 [3.1-11.3](12)	0.851	7.0 [4.8-9.7](38)
Toda la gestación	0	0	0.6 [0.02-3.39](1)	-	0.2 [0.006-1.170](1)
Consumo de sustancias tóxicas ilegales durante (%)					
La preconcepción y el primer trimestre	3.9 [1.5-8.3](7) <sup>c</sup>	3.8 [1.4-8.0](6)	1.8 [0.4-5.2](3)	0.278	3.1 [1.8-5.1](16)
Toda la gestación	0.7 [0.02-3.6](1)	0.6 [0.02-3.5](1)	0.6 [0.02-3.3](1)	0.957	0.6 [0.1-1.8](3)
Partos previos (%)					
Ninguno	40.6 [33.0-48.2](69) <sup>c</sup>	50.3 [42.8-57.8](89)	48.5 [41.0-56.0](89)		46.6 [42.2-51.0](247)
Uno	46.9 [39.1-54.6](75)	40.2 [32.8-47.6](72)	43.3 [35.8-50.7](77)	0.095	43.4 [39.1-47.7](224)
Dos o más	12.5 [7.4-17.6](22)	9.5 [5.5-14.9](17)	8.2 [4.6-13.4](15)		10.0 [7.5-13.0](54)

<b>Abortos previos (%)</b>					
Ninguno	65.6 [58.3-73.0](108) <sup>c</sup>	73.4 [66.7-80.0](132)	63.7 [56.5-70.9](115)		67.6 [63.5-71.7](355)
Uno	18.1 [12.2-24.1](31)	17.8 [12.0-23.5](31)	26.9 [20.3-33.5](48)	0.533	21.0 [17.4-24.6](110)
Dos o más	16.2 [10.5-22.0](27)	8.9 [5.1-14.2](15)	9.4 [5.4-14.8](18)		11.4 [8.6-14.2](60)
<b>Planificación del embarazo (%)</b>	74.3 [67.4-81.3](115) <sup>c</sup>	79.5 [73.3-85.7](136)	88.5 [83.6-93.4](155) <sup>*,†</sup>	0.004	81.0 [77.4-84.5](406)
<b>Suplementación con ácido fólico en la preconcepción (%)</b>	17.9 [11.5-24.2](25) <sup>c</sup>	37.3 [29.6-44.9](61) <sup>*</sup>	46.5 [38.8-54.3](85) <sup>*</sup>	0.028	35.0 [30.1-38.9](171)
<b>Suplementación con ácido fólico en el primer trimestre de gestación (%)</b>					
Sin suplementación	7.1 [3.3-13.1](9) <sup>c</sup>	3.9 [1.5-8.3](6)	6.0 [2.8-11.2](9)		5.6 [3.6-8.2](24)
<400 µg/día, 5 días/semana	31.7 [23.6-39](43)	13.7 [8.3-19.2](22)	6.0 [2.8-11.2](9)		16.4 [12.9-19.9](74)
400 µg/día, 5-7 días/semana	50.8 [42.1-59.5](66)	64.7 [57.1-72.3](105)	26.8 [19.7-34.0](45) <sup>*</sup>	<0.001	47.4 [42.7-52.2](216)
>400 µg/día – 5mg/día, 5 días/semana	5.6 [2.3-11.1](7)	6.5 [3.2-11.7](10)	21.5 [14.9-28.1](34)		11.4 [8.4-14.5](51)
>5mg/día, 5 días/semana	4.8 [17.6-10.1](4)	11.1 [6.1-16.1](19)	39.6 [31.7-47.5](61)		19.2 [15.4-22.9](84)
<b>MTHFR 677 TT (%)</b>	17.5 [11.8-23.2](33) <sup>c</sup>	15.6 [10.2-21.0] (28)	20.6 [14.6-26.6] (37)	0.920	17.4 [14.6-21.2](99)
<b>Folato plasmático en el primer trimestre (nmol/L)</b>	10.8 [10.3-11.0](188) <sup>d</sup>	27.1 [24.5-27.1](189) <sup>*</sup>	55.1 [49.4-58.6](189) <sup>*,†</sup>	<0.001	25.0 [23.6-26.7](566)
<b>Folato eritrocitario en el primer trimestre (nmol/L)</b>	602 [561-652](160) <sup>d</sup>	992 [944-1054](175) <sup>*</sup>	1480 [1353-1562](178) <sup>*,†</sup>	<0.001	992 [916-1018](513)
<b>Cobalamina plasmática en el primer trimestre (pmol/L)</b>	337 [321-351](188) <sup>d</sup>	372 [351-392](189) <sup>*</sup>	377 [358-397](189) <sup>*</sup>	0.002	361 [351-372](566)
<b>tHcy<sup>e</sup> en el primer trimestre (µmol/L)</b>	5.8 [5.6-6.1](188) <sup>d</sup>	5.1 [4.9-5.2](189) <sup>*</sup>	5.0 [4.9-5.2](189) <sup>*</sup>	<0.001	5.3 [5.2-5.4](566)

<sup>a</sup>Valor p de tendencia lineal. <sup>b</sup>Media aritmética [IC 95%](N) <sup>c</sup>Porcentaje [IC 95%](N) <sup>d</sup>Media geométrica [IC 95%](N) <sup>e</sup>tHcy: Homocisteína plasmática total en ayunas <sup>\*</sup>p<0.05 respecto al tercil bajo <sup>†</sup>p<0.05 respecto al tercil medio

**Tabla 13. Marcadores bioquímicos de estado en folatos a las 24-27 SG según el tercil de folato plasmático (nmol/L) en el primer trimestre de gestación**

Características	Tercil bajo (<17.8)	Tercil medio (17.8-35.1)	Tercil alto (>35.1)	Total
Folato plasmático a las 24-27 SG (nmol/L)	10.0 [9.4-11.9] (144) <sup>a</sup>	15.3 [13.7-16.9] (156)	25.6 [20.5-30.7] (158) <sup>*,†</sup>	17.4 [15.4-19.4] (458)
Folato eritrocitario a las 24-27 SG (nmol/L)	904 [831-978] (144)	1196 [1118-1275] (156) <sup>*</sup>	1652 [1494-1811] (158) <sup>*,†</sup>	1260 [1190-1331] (458)
Cobalamina plasmática a las 24-27 SG (pmol/L)	272 [255-289] (144)	289 [275-302] (156) <sup>*</sup>	301 [284-317] (158) <sup>*</sup>	288 [279-297] (458)
tHcy <sup>b</sup> a las 24-27 SG (μmol/L)	5.2 [5.0-5.4] (144)	4.6 [4.5-4.8] (156) <sup>*</sup>	4.6 [4.4-4.8] (158) <sup>*</sup>	4.8 [4.7-4.9] (458)

<sup>a</sup>Media geométrica [IC 95%](N) <sup>b</sup>tHcy: Homocisteína plasmática total en ayunas <sup>\*</sup>p<0.05 respecto al tercil bajo <sup>†</sup>p<0.05 respecto al tercil medio

Las concentraciones medias de folato plasmático y eritrocitario en el primer trimestre fueron de 25 nmol/L y 992 nmol/L respectivamente. Estas concentraciones fueron más elevadas en los terciles alto y medio de folato plasmático respecto al tercil bajo y en el tercil alto respecto al medio. La concentración media de cobalamina plasmática fue 361 pmol/L, siendo más elevada en los terciles alto y medio de folato plasmático respecto al tercil bajo. La tHcy, con una concentración media de 5.3  $\mu$ mol/L fue menor en los terciles alto y medio de folato plasmático respecto al tercil bajo.

En la Tabla 13 se observan los marcadores bioquímicos del estado en folatos durante el segundo trimestre en función del tercil de folato plasmático durante el primer trimestre. Las concentraciones medias de folato plasmático y eritrocitario fueron de 17.4 nmol/L y 1260 nmol/L respectivamente. El folato plasmático fue más elevado en el tercil alto respecto al tercil medio y al bajo. El folato eritrocitario fue más elevado en los terciles medio y alto respecto al bajo y en el tercil alto respecto al medio. La concentración de cobalamina plasmática fue más elevada en los terciles medio y alto de folato plasmático en relación al bajo, con una media global de 288 pmol/L. En sentido contrario al resto de biomarcadores, la concentración de tHcy fue más baja en los terciles medio y alto respecto al tercil bajo, con una concentración media de 4.8  $\mu$ mol/L.

## 2. Evolución del estado en folatos y suplementación con ácido fólico

En la *Tabla 14* observamos que la evolución del folato eritrocitario a lo largo del embarazo también es significativamente diferente en función de la pauta de suplementación empleada en el primer trimestre.

**Tabla 14. Estado en folato eritrocitario durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre**

Pauta de suplementación	Semanas de gestación			
	<12	15	24-27	32
Sin suplementación	544 [330-897] (10)	672 [395-1153] (8)	889 [672-1188] (11)	659 [450-963] (13)
Insuficiente	735 [665-812] (77)	898 [804-992] (59)	821 [735-907] (73)	685 [608-773] (67)
Adecuada	898 [896-992] (209)	1176 [1107-1248] (169)	1064 [992-1130] (196)	916 [846-982] (188)
Elevada	1480 [1212-1636] (53)	1772 [1571-2018] (50)	1465 [1274-1686] (53)	1108 [907-1353] (47)
Excesiva	1339 [1212-1588] (81)	1826 [1652-2018] (73)	1540 [1394-1719] (82)	1188 [1043-1339] (81)

<sup>a</sup>Media geométrica [IC 95%](N)

El folato eritrocitario aumentó un 34% (DE=52), un 32% (DE=44), un 32% (DE=57) y un 34% (DE=49) en los grupos de suplementación excesiva, elevada, adecuada e insuficiente respectivamente entre la semana 12 y la 15, y desde ahí hasta la semana 34 disminuyó un 25%

(DE=39), un 27% (DE=38), un 13% (DE=38) y un 10% (DE=44) para quedarse en 1185 [1046-1344]\*, 1107 [906-1353], 925 [853-990] y 694 [613-785]\* nmol/L repectivamente (\* $p < 0.05$  respecto a la categoría suplementación adecuada).

En la *Tabla 15* se observa que la evolución del folato plasmático a lo largo del embarazo es significativamente diferente en función de la pauta de suplementación empleada en el primer trimestre.

Entre la semana 15 y las semanas 24-27, las participantes de los grupos de suplementación adecuado e insuficiente experimentaron una disminución en la concentración plasmática de folato del 36% (DE=38) y el 35% (DE=44) respectivamente, que se mantuvo estable hasta el final del embarazo y que fue similar entre ambos grupos.

Los grupos de suplementación elevada y excesiva experimentaron una disminución del 47% (DE=33) y del 45% (DE=34) en dicha concentración en el mismo punto del embarazo, y también se mantuvieron estables hasta el momento del parto (media geométrica [95% CI]: 13.2 nmol/L [10.2-17.0] y 16.0 nmol/L [12.8-19.9] respectivamente).

La concentración de folato plasmático en el momento del parto en el grupo de suplementación excesiva fue significativamente más alta que las de los grupos de suplementación insuficiente y adecuada (7.9 nmol/L [6.6-9.5] y 10.3 nmol/L [9.3-11.5] respectivamente). En el caso del grupo de suplementación elevada, esta diferencia solo fue significativa con respecto al grupo de suplementación insuficiente.

A causa del peligro que conlleva la presencia conjunta de valores elevados de folato y valores bajos de cobalamina, consideramos necesario explorar la fluctuación de cobalamina a lo largo del embarazo en función de la pauta de suplementación durante el primer trimestre.

Como se observa en las *Tablas 14 y 15*, tanto el folato eritrocitario como el plasmático evolucionan de manera diferente en función de la pauta de suplementación seguida en el primer trimestre. Sin embargo, como se puede observar en la *Tabla 16*, la cobalamina se comporta de manera similar en todas las pautas de suplementación.

**Tabla 15. Estado en folato plasmático durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre**

Pauta de suplementación	Semanas de gestación				
	<12	15	24-27	32	Parto
Sin suplementación	10.5 [7.3-15.2] (12) <sup>a</sup>	11.4 [7.2-18.0] (9)	8.5 [5.6-12.8] (11)	7.5 [5.4-10.3] (13)	7.6 [4.3-13.5] (10)
Insuficiente	16.9 [14.0-19.5] (80)	18.9 [16.3-22.0] (63)	9.7 [8.3-11.4] (75)	8.8 [7.5-10.3] (68)	7.7 [6.4-9.3] (62)
Adecuada	23.0 [21.3-24.8] (215)	22.0 [20.3-23.6] (172)	12.3 [11.2-13.5] (197)	10.5 [9.5-11.6] (191)	10.4 [9.3-11.7] (190)
Elevada	46.1 [37.7-123.9] (53)	40.9 [32.5-51.4] (50)	17.3 [14.4-20.7] (53)	15.0 [11.4-19.7] (47)	13.2 [10.2-17.1] (46)
Excesiva	47.5 [41.3-54.1] (84)	41.7 [35.9-47.5] (77)	19.5 [16.1-23.3] (82)	15.6 [12.9-18.9] (81)	16.0 [12.8-19.9] (72)

<sup>a</sup>Media geométrica [IC 95%](N)

**Tabla 16. Estado en cobalamina plasmática durante el embarazo en función de la adherencia a la pauta de suplementación recomendada para el primer trimestre**

Pauta de suplementación	Semanas de gestación				
	<12	15	24-27	32	Parto
Sin suplementación	325 [277-383] (12) <sup>a</sup>	309 [236-405] (9)	247 [197-308] (11)	238 [195-291] (13)	251 [192-329] (10)
Insuficiente	345 [322-370] (80)	319 [295-344] (63)	259 [240-280] (75)	237 [218-257] (68)	229 [210-249] (62)
Adecuada	371 [355-387] (215)	322 [306-339] (172)	280 [267-294] (197)	252 [239-265] (191)	236 [224-249] (190)
Elevada	366 [337-398] (53)	342 [316-372] (50)	277 [254-302] (53)	259 [234-286] (47)	238 [211-267] (45)
Excesiva	367 [341-395] (84)	313 [289-338] (77)	277 [257-299] (82)	249 [229-271] (81)	233 [211-257] (71)

<sup>a</sup>Media geométrica [IC 95%](N)

### 3. Estado general en folatos de las gestantes

Como muestra la *Tabla 17*, todos los grupos de suplementación tienen un porcentaje elevado de gestantes en el tercil bajo de cobalamina plasmática en el primer trimestre. Si observamos la consecuencia biológica de la suplementación, es decir, el tercil de folato plasmático en el primer trimestre, hallamos que un 28.6% de las gestantes que se hallan en el tercil alto de folato plasmático pertenecen al tercil bajo de cobalamina plasmática en el mismo período de tiempo.

**Tabla 17. Gestantes en el tercil bajo de cobalamina plasmática según el patrón de suplementación durante el primer trimestre de embarazo**

Tipo de suplementación con ácido fólico en el primer trimestre	% gestantes en el tercil bajo de cobalamina plasmática en el primer trimestre
Sin suplementación	41.7
Insuficiente (<400 µg/día, 5 días/semana)	35.8
Adecuada (400 µg/día, 5-7 días/semana)	31.1
Elevada (>400 µg/día – 5mg/día, 5 días/semana)	34.0
Excesiva (>5mg/día, 5 días/semana)	31.0

Aunque solo encontramos un 1.1% de gestantes deficientes en cobalamina (<148 pmol/L) durante el primer trimestre de embarazo en la muestra, no es este el caso del folato plasmático. Como se puede observar en la tabla 15, un 38.7% de las gestantes que siguieron adecuadamente la pauta de suplementación con ácido fólico recomendada por la SEGO, fueron deficientes en folato plasmático al final del embarazo. Incluso en el grupo de suplementación excesiva, en el que las gestantes consumieron dosis muy elevadas de ácido fólico durante el primer trimestre, un 15.3% fueron deficientes en folato plasmático en el momento del parto.

**Tabla 18. Cantidad de gestantes (%) deficientes en folato plasmático (<7 nmol/L) según el tipo de suplementación utilizada durante el primer trimestre**

Tipo de suplementación durante el primer trimestre (N)	Momento del embarazo				
	<12 SG	15 SG	24-27 SG	34 SG	Parto
Sin suplementación (14)	25.0	33.3	36.4	46.2	50.0
Insuficiente (83)	8.6	9.4	34.7	47.8	47.6
Adecuada (222)	4.1	2.9	21.5	32.8	38.7
Elevada (54)	0	2.0	11.3	23.4	30.4
Excesiva (87)	0	2.6	8.5	16.0	15.3

En la tabla 19 se observa que la proporción de gestantes deficientes en folato eritrocitario es mucho menor. Entre las que siguieron adecuadamente la pauta de suplementación con ácido fólico recomendada por la SEGO, solo un 2.1% fueron deficientes para este marcador.

**Tabla 19. Cantidad de gestantes (%) deficientes en folato eritrocitario (<320 nmol/L) según el tipo de suplementación utilizada durante el primer trimestre**

Tipo de suplementación durante el primer trimestre (N)	Momento del embarazo			
	<12 SG	15 SG	24-27 SG	34 SG
Sin suplementación (14)	10.0	25.0	0	7.7
Insuficiente (83)	3.8	1.7	5.5	7.4
Adecuada (222)	4.2	0	0.5	2.1
Elevada (54)	0	0	0	4.3
Excesiva (87)	0	1.4	0	1.2

#### 4. Polimorfismos en la muestra

Como podemos observar en la *tabla 20*, los polimorfismos más prevalentes en esta muestra de gestantes son, de más a menos frecuente: *SLC19A1* 80G>A, *MTRR* 66A>G, *DHFR* 19del, *MTHFD1* -105C>T, *MTHFR* 677C>T y *MTHFD1* 1958G>A.



**Tabla 20. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados en la muestra**

Polimorfismo	N	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)	
		S/S	S/M	M/M	S	M
<b><i>MTHFR 677C&gt;T</i></b>	564	34.2	48.4	17.4	58.5	41.5
<b><i>MTHFR 1298A&gt;C</i></b>	564	53.9	37.9	8.2	73.4	26.6
<b><i>MTRR 66A&gt;G</i></b>	566	28.3	45.7	26.0	53.2	46.8
<b><i>MTRR 524C&gt;T</i></b>	565	41.6	45.5	12.9	64.5	35.5
<b><i>MTHFD1 -105C&gt;T</i></b>	564	28.2	54.1	17.7	53.1	46.9
<b><i>MTHFD1 1958G&gt;A</i></b>	564	36.2	48.2	15.6	60.2	39.8
<b><i>SLC19A1 80G&gt;A</i></b>	561	27.5	46.3	26.2	52.4	47.6
<b><i>DHFR 19del</i></b>	555	33.8	42.2	24.0	58.1	41.9
<b><i>FOLR1 1314G&gt;A</i></b>	563	91.1	8.7	0.2	95.0	5.0

S: Alelo salvaje, M: Alelo mutado

Al combinar cada uno de los 5 polimorfismos más frecuentes en la muestra con el polimorfismo relacionado con los folatos más citado en la literatura (*MTHFR 677C>T*), obtenemos las frecuencias de dobles homocigotos y dobles salvajes que se observan en la *tabla 21*.

**Tabla 21. Frecuencias de dobles salvajes y dobles homocigotos para las parejas de polimorfismos creadas.**

Combinación de polimorfismos	n	%Dobles salvajes	%Dobles homocigotos
<b><i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTRR 66A&gt;G</i></b>	564	9.2	4.6
<b><i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTHFD1 -105C&gt;T</i></b>	564	10.6	4.3
<b><i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTHFD1 1958G&gt;A</i></b>	564	11.3	2.8
<b><i>MTHFR 677C&gt;T &amp; SLC19A1 80G&gt;A</i></b>	561	10.1	6.0
<b><i>MTHFR 677C&gt;T &amp; DHFR 19del</i></b>	555	10.3	4.5

Para explorar si existían diferencias en cuanto al comportamiento del folato eritrocitario entre los dobles homocigotos y los dobles salvajes para cada una de las combinaciones anteriormente presentadas, se intentaron realizar modelos multivariados. No obstante, a causa de la baja

frecuencia tanto de dobles homocigotos como de dobles salvajes y de exigir la determinación de folato eritrocitario en todos los puntos del embarazo, al añadir las variables de ajuste necesarias (edad, pauta de suplementación utilizada en el primer trimestre y situación socioeconómica de la gestante), las gestantes que finalmente entraban en los modelos resultaron ser muy pocas, como se observa en la *tabla 22*.

**Tabla 22. Número de gestantes disponibles para los modelos multivariados ajustados**

Combinación de polimorfismos	Dobles salvajes	Dobles homocigotos
<i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTRR 66A&gt;G</i>	30	19
<i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTHFD1 -105C&gt;T</i>	32	17
<i>MTHFR 677C&gt;T &amp; MTHFD1 1958G&gt;A</i>	33	7
<i>MTHFR 677C&gt;T &amp; SLC19A1 80G&gt;A</i>	33	17
<i>MTHFR 677C&gt;T &amp; DHFR 19del</i>	27	17

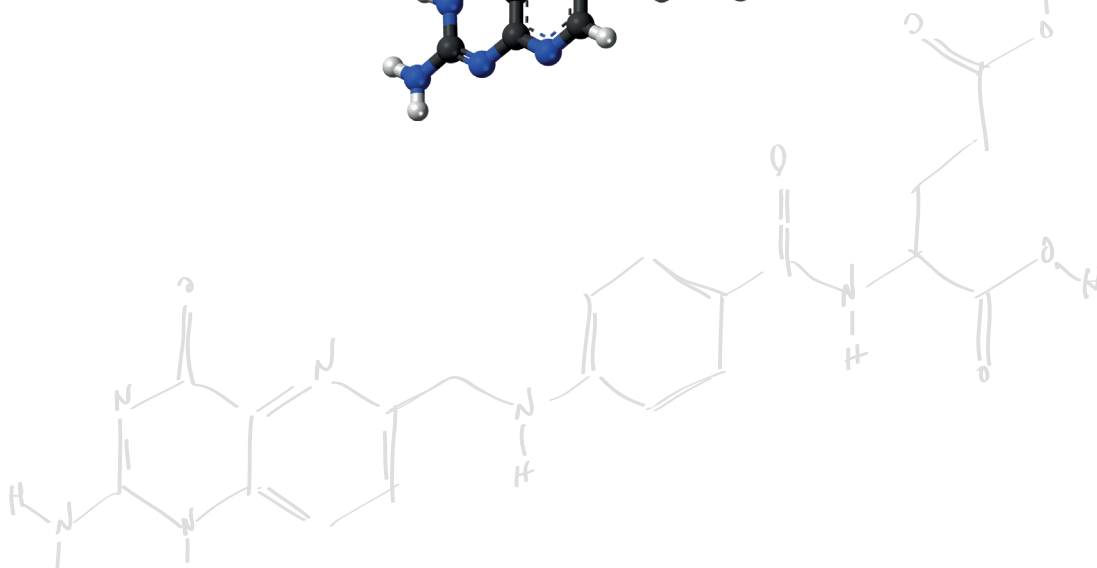
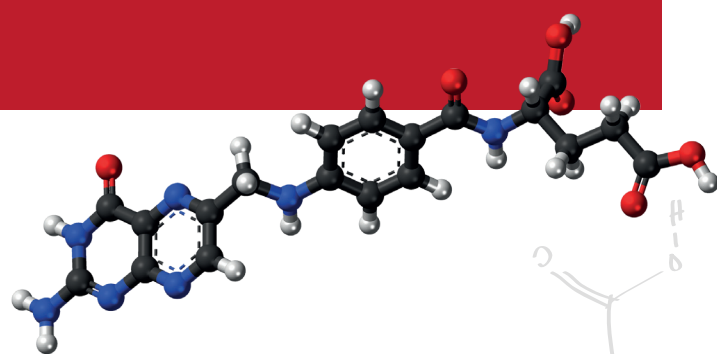
##### 5. Efecto del polimorfismo *MTHFR 677C>T* sobre las reservas de folato

En la *tabla 23* se muestra el estado en folato eritrocitario en función del genotipo para el polimorfismo *MTHFR 677C>T* en los diferentes terciles de folato plasmático. No se observaron diferencias en cuanto al folato eritrocitario entre las distintas variantes del polimorfismo *MTHFR 677C>T* en ningún punto de la gestación en aquellas participantes que durante el primer trimestre de gestación se hallaron en el tercil más alto de folato plasmático. Sin embargo, el folato eritrocitario (nmol/L) [media geométrica (95%IC)] fue menor en los homocigotos en relación a los salvajes que tenían el folato plasmático en el tercil más bajo ( $\leq 19.9$  nmol/L) a las 15SG: 736(633,854) versus 953(845,1081); en los terciles bajo ( $\leq 8.7$  nmol/L) o medio ( $\leq 16.2$  nmol/L) a las 24-27 SG: 636(533,757) vs 837(758,935) y 925(812,1064) versus 1096(1012,1188) respectivamente; y en los terciles bajo ( $\leq 6.9$  nmol/L) o medio ( $\leq 13.2$  nmol/L) a las 34 SG: 523(455,596) versus 633(572,699) y 652(513,821) versus 829(750,925).

**Tabla 23. Estado en folato eritrocitario en función del genotipo *MTHFR* 677 C>T en los diferentes terciles de folato eritrocitario.**

Tercil de folato eritrocitario	Semanas de gestación		
	15	24-27	34
<b>Bajo</b>			
<i>MTHFR</i> 677 CC	953 [845-1081] (46) <sup>a</sup>	837 [758-935] (56)	633 [572-699] (53)
CT	837 [750-930] (64)	721 [653-796] (71)	555 [503-615] (63)
TT	736 [633-854] (23)*	636 [533-757] (27)*	523 [455-596] (30)*
<b>Medio</b>			
<i>MTHFR</i> 677 CC	1176 [1064-1300] (46)	1096 [1012-1188] (52)	829 [750-925] (46)
CT	1394 [1275-1516] (60)	1054 [972-1145] (72)	846 [781-916] (83)
TT	1080 [957-1218] (26)	925 [812-1064] (26)*	652 [513-821] (18)*
<b>Alto</b>			
<i>MTHFR</i> 677 CC	1783 [1582-2018] (45)	1737 [1572-1939] (52)	1670 [1451-1899] (48)
CT	1760 [1597-1930] (66)	1686 [1539-1845] (73)	1541 [1407-1696] (70)
TT	1998 [1620-2465] (26)	1587 [1249-2018] (27)	1405 [1125-1755] (30)

<sup>a</sup>Media geométrica [IC 95%](N) \* p<0.05 respecto al genotipo *MTHFR* 677CC



# DISCUSIÓN

## ESTUDIO NUTCIR

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## 1. Características generales de la muestra

Como se muestra en la Tabla 12, una elevada proporción (45.1%) de las participantes en el estudio NUTCIR tienen un nivel socioeconómico elevado. Esto podría influir en otras características de la muestra, como el IMC medio ( $23.7 \text{ kg/m}^2$ )<sup>287</sup>, que no es muy elevado, o el elevado porcentaje de mujeres que planificaron su embarazo (81%).

La proporción de mujeres que tomaron suplementos de ácido fólico en la preconcepción (34.5%), que es similar a la descrita en estudios previos de muestras de más de 10000 gestantes en los EUA<sup>288,289</sup> y mayor cuanto mejor es el estado en folatos, también podría tener cierta relación con el nivel socioeconómico, como ya han indicado algunos estudios previos realizados en el Reino Unido<sup>290,291</sup>.

La distribución del nivel socioeconómico de las gestantes ha sido diferente entre los terciles de folato plasmático en el primer trimestre. Así, en el tercil bajo se hallaba el mayor porcentaje de gestantes de nivel socioeconómico bajo (10.6%). Dado que la suplementación con ácido fólico se asocia positivamente con el estado en folatos<sup>258,292</sup>, en cierta manera se observa la relación que existe entre uso de suplementos vitamínicos y el nivel socioeconómico que ya han descrito otros autores. Sullivan y colaboradores describieron en una muestra de 20263 mujeres estadounidenses que el consumo de suplementos vitamínicos se asociaba a ingresos más elevados<sup>293</sup>. De manera similar, Branum y colaboradores observaron en una muestra de 1296 gestantes que aquellas que se suplementaban tenían también unos ingresos más elevados<sup>294</sup>.

De manera similar, la distribución de fumadoras también fue diferente entre terciles de folato plasmático. El porcentaje de mujeres que fumaron durante toda la gestación fue significativamente superior en las gestantes del tercil bajo de folato plasmático, al igual que el porcentaje de mujeres que fumaban antes de quedarse embarazadas y durante las primeras semanas de gestación. Un estudio realizado en el Reino Unido ya describió que las gestantes no fumadoras tenían una ingesta mayor de casi todos los nutrientes que las fumadoras, a pesar de no tener una ingesta energética mayor<sup>295</sup>. El hecho de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático puede ser indicador de una dieta poco equilibrada o de no adherirse a las recomendaciones en cuanto a consumo de suplementos vitamínicos durante el primer trimestre, lo que podría estar relacionado con hábitos poco saludables como por ejemplo el hábito tabáquico. O quizá fuera el propio hábito tabáquico el causante de los valores reducidos de folato circulante, como ya apuntaron Ulvik y colaboradores. Estos autores describieron en una muestra de 6873 enfermos de isquemia cardíaca que los valores más elevados de folato correspondían a aquellos pacientes que declararon no haber fumado nunca, seguidos por los exfumadores y los fumadores, y aumentaban de manera proporcional a los años tras el abandono

del hábito. Un posible mecanismo que propusieron como explicación a sus resultados fue que el estrés oxidativo que produce el hábito tabáquico obligaba a la movilización de reservas de piridoxina y riboflavina por su actividad antioxidante, lo que resultaba en una disminución de las vitaminas circulantes<sup>286</sup>.

La distribución de los diferentes grupos de suplementación también fue distinta entre terciles. En el tercil alto de folato plasmático hubo una proporción más elevada de mujeres que se suplementaban muy por encima de los 400 µg diarios que recomienda la SEGO durante el primer trimestre<sup>269</sup>. Esto resulta coherente, pues el folato plasmático de la primera extracción (a partir de cuya concentración se crearon los terciles) es la respuesta biológica a la suplementación administrada en las primeras semanas de gestación<sup>258,296</sup>.

## 2. Estado en folato de las gestantes

Durante el segundo trimestre de embarazo (semanas 24-27), la concentración de folato plasmático (Tabla 13) fue similar a la descrita para el mismo punto de la gestación en otros estudios realizados en Curaçao<sup>297</sup>, Irlanda del Norte<sup>258</sup> o Madrid<sup>251</sup> y algo superior a la descrita también para el mismo punto de la gestación en un estudio realizado en las Islas Seychelles<sup>259</sup>.

Aunque la mayor parte de la población de Curaçao desciende de África occidental, se halla muy mezclada con población caucásica, y los hábitos dietéticos son predominantemente occidentales. Si bien no existe fortificación obligatoria de los alimentos en ni en Curaçao ni en Irlanda del Norte ni en España, las gestantes de los tres estudios recibieron suplementación con ácido fólico en mayor o menor medida. Úbeda y colaboradores<sup>251</sup> asumieron que todas las gestantes debían suplementarse siguiendo las recomendaciones de salud pública españolas, y que el uso de suplementos de ácido fólico dependía de la decisión del obstetra y de las participantes. De manera similar, el 90% de las gestantes de Irlanda del Norte se suplementaron con ácido fólico durante el primer trimestre. Velzing-Aarts<sup>297</sup> y colaboradores sin embargo, recogen esta información de manera más detallada e informan de que muy pocas participantes no se suplementaron, la mayoría consumieron ácido fólico de manera irregular, y que las que lo hicieron de manera regular lo hicieron con dosis entre 800 y 1000 µg.

Así pues parece que el panorama en cuanto a ácido fólico sintético en los tres estudios es variado, de manera similar a lo que ocurre entre las gestantes de nuestro estudio. Como se muestra en la tabla 15, el porcentaje de gestantes deficientes en folato plasmático tiene una relación inversa con la dosis de ácido fólico consumida durante el primer trimestre y una relación directa con las semanas de gestación. Este patrón de comportamiento del folato plasmático durante la gestación y

en función de la dosis de ácido fólico recibida durante el primer trimestre se explorará en más profundidad más adelante.

En lo que respecta al estudio de las Islas Seychelles<sup>259</sup>, sus valores más bajos podrían ser la consecuencia de un escaso aporte tanto de folato dietético como de ácido fólico. Los propios autores indican la ausencia de alimentos fortificados con ácido fólico y un escaso uso de los suplementos vitamínicos.

En el segundo trimestre de embarazo (semanas 24-27), la concentración de folato eritrocitario (1260 nmol/L) (Tabla 13) fue muy similar a la descrita por Holmes y colaboradores a las 20 SG (1216 nmol/L)<sup>258</sup> en una población no expuesta a la fortificación obligatoria de los alimentos y consumidora de suplementos con ácido fólico durante el primer trimestre en su mayoría, un 90%. En resumen, una muestra muy comparable a la que es objeto de estudio en este trabajo. Sin embargo, entre las 1274 gestantes del estudio NHANES 1999-2006<sup>294</sup>, la concentración de folato eritrocitario durante el segundo trimestre fue de 1527 nmol/L, sin diferenciar entre consumidoras y no consumidoras de suplementos de ácido fólico. Este estudio se realizó en los EUA tras la introducción de la fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico en 1998. Además un 60% de las gestantes consumieron suplementos de ácido fólico durante el primer trimestre, la mayoría de los cuales contenían altas dosis de ácido fólico (>800 µg). Estas circunstancias constituyen un buen motivo para las diferencias existentes en cuanto a folato eritrocitario entre sus resultados y los nuestros.

Tanto la concentración de folato plasmático como de folato eritrocitario durante el segundo trimestre fueron diferentes entre los terciles de folato plasmático previos a las 12 SG. La concentración de folato eritrocitario fue significativamente más alta en aquellas gestantes que antes de la semana 12 se hallaban en el tercil alto de folato plasmático en relación a aquellas que se hallaban en los terciles bajo o medio. Teniendo en cuenta que la concentración media de folato plasmático de las gestantes que se hallaban en el tercil alto antes de las 12 SG fue 55.1 nmol/L, parece razonable pensar que, pasado cierto umbral de folato plasmático, éste se destina a incrementar las reservas de folato.

En cuanto a la cobalamina plasmática, la concentración que hallamos (Tabla 13) es similar a la descrita por Wallace y colaboradores<sup>259</sup>, y se encuentra bastante por encima de los valores del estudio de Curaçao (185.5 pmol/L)<sup>297</sup> e incluso de Madrid (172.7 pmol/L)<sup>251</sup>, donde esperaríamos hallar concentraciones cercanas debido a la proximidad geográfica que podría condicionar unos hábitos y estilo de vida similares entre ambas cohortes de gestantes. Podría parecer que la diferencia entre los valores de Úbeda y colaboradores y los del presente trabajo se deben a que en el grupo de Madrid la determinación de cobalamina plasmática no se realizó mediante ensayo microbiológico<sup>266</sup> sino utilizando un kit IMx (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA), basado en



la técnica de inmunoensayo. Esta técnica es capaz de detectar análogos de la cobalamina sin actividad biológica para los humanos, y por tanto puede proporcionar valores más elevados que los detectados mediante ensayo microbiológico. Así pues no parece probable que ésta sea la causa de las diferencias.

De manera inversa al resto de biomarcadores del estado en folato, la tHcy fue ligeramente (aunque de manera significativa) inferior en las gestantes que se hallaban en los terciles medio y alto de folato plasmático antes de las 12 SG respecto a las que se encontraban en el tercil alto. Murphy y colaboradores<sup>298</sup> ya observaron que la tHcy era inferior en aquellas gestantes que tomaban suplementos de ácido fólico, aunque esto tan solo explicaba en parte la disminución de tHcy observada durante la gestación, junto con la hemodilución propia del embarazo o la concentración de albúmina sérica. Posteriormente, los mismos autores demostraron en una carta en respuesta a Brattström que la disminución tHcy observada durante la gestación también se debía al aumento de la función renal que se produce durante el embarazo<sup>299</sup> así como al aumento de estradiol<sup>300</sup>. La concentración disminuida de tHcy que se observa en los terciles medio y alto en relación al tercil bajo de folato plasmático sí se corresponde a un mejor estado en folato plasmático, como ya indicaron Wallace y colaboradores<sup>259</sup> y por tanto a la suplementación con ácido fólico durante el primer trimestre de embarazo.

La concentración de tHcy en el segundo trimestre de gestación en la muestra estudiada fue inferior a las establecidas en otras muestras similares de gestantes, aunque de menor tamaño, del Reino Unido, las Islas Seychelles o Curaçao, países donde tampoco existe fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico<sup>258,259,297</sup>. Sin embargo, la concentración de tHcy descrita en este trabajo coincide con la descrita por Úbeda y colaboradores en una muestra de 154 gestantes españolas que se suplementaban siguiendo las recomendaciones de salud pública españolas<sup>251</sup>. Así pues, quizá las diferencias descritas anteriormente se deban a una cuestión geográfica, y por tanto relacionada con los hábitos dietéticos. La dieta mediterránea se caracteriza por un consumo elevado de verduras, y el clima favorece que la población disponga de ellas todo el año, lo que facilita el acceso a buenas fuentes alimentarias de folato.

### **3. Evolución del estado en folato y suplementación con ácido fólico**

La evolución del folato plasmático a lo largo del embarazo (Tabla 15) fue distinta entre los distintos grupos de suplementación con ácido fólico. A pesar de las diferencias todos ellos compartían un descenso en la concentración de ácido fólico entre las semanas 15 y 24-27, de manera

similar a lo descrito por otros autores en estudios previos realizados en gestantes no suplementadas con ácido fólico<sup>234,301</sup>.

Esta caída en la concentración de folato plasmático fue mayor en los grupos de suplementación *elevada* y *excesiva*, pues partían de un estado inicial mucho más elevado. A pesar de las diferencias en cuanto a dosis entre ambos grupos<sup>X</sup>, la evolución del folato plasmático a lo largo del embarazo no fue diferente entre ellos. Esto podría sugerir un umbral por encima del cual no aumenta la concentración de folato plasmático a pesar de que la dosis suministrada de ácido fólico sea mayor.

Sin embargo, resulta interesante recalcar que aquellas gestantes que consumieron elevadas dosis de ácido fólico al inicio del embarazo (grupos *elevada* y *excesiva*), alcanzaban el momento del parto con concentraciones de folato plasmático superiores a las que consumieron los 400 µg diarios que recomienda la SEGO.

Cabe resaltar en este punto que existe un vacío importante en la literatura en cuanto a estudios en los que se recoja de manera exhaustiva el uso de suplementos de ácido fólico, tanto en cuanto a dosis como en cuanto a duración en el tiempo.

En algunos no se especifica si a las gestantes se les preguntaba en cuanto al uso de suplementos<sup>248,301,302</sup>, por lo que en el momento de comparar resultados asumimos que sus participantes no usaron suplementos de ácido fólico, aunque quizá esto no se ajuste a la realidad. En otros dos estudios donde se recogía información sobre el uso de suplementos, los investigadores se limitaban a preguntar a las gestantes si usaban o no suplementos vitamínicos<sup>258,259</sup>, aunque Wallace y colaboradores ni siquiera utilizan esta información en sus análisis<sup>259</sup>.

Úbeda y colaboradores<sup>251</sup> asumen que como el inicio del estudio coincide con la recomendación española de salud pública, todas las gestantes deberían consumir ácido fólico, aunque reconocen que la decisión final atañe al obstetra y a la gestante. De dos estudios donde se recogía de manera exacta la dosis empleada, en uno no se tenía en cuenta dicha información en los análisis posteriores<sup>297</sup> y en el otro todas las participantes consumían diariamente la misma dosis de ácido fólico<sup>296</sup>, por lo que no es posible observar cómo responde el folato plasmático a diferentes dosis de suplementación.

En el estudio NHANES, las participantes rellenaron un cuestionario sobre el uso de suplementos vitamínicos en los 30 días previos al inicio del estudio. Si consumían suplementos, se les pedía la caja o el prospecto de los mismos para poder verificar y cuantificar la dosis. Además, clasificaron los suplementos en distintas categorías: suplemento de vitaminas y minerales, solo vitaminas, solo minerales, preparados de herbolario... y especificaron aparte aquellos que contenían ácido fólico<sup>294</sup>.

---

<sup>X</sup> Recordemos que el grupo de suplementación *Elevada* representa a aquellas gestante que consumieron entre 400 y 5000 µg diarios de ácido fólico 5 días a la semana, mientras que el grupo de suplementación *Excesiva* representa a aquellas gestante que consumieron más de 5 mg diarios de ácido fólico 5 días a la semana.

Sin embargo, en los análisis no se muestran las concentraciones de metabolitos en función de la dosis de ácido fólico. Por lo tanto, los resultados de este estudio no son comparables a los nuestros, más aún teniendo en cuenta que se llevó a cabo en los EUA tras la fortificación de los alimentos con ácido fólico.

La evolución en la concentración de folato eritrocitario a lo largo del embarazo (Tabla 14) fue distinta entre los distintos grupos de suplementación con ácido fólico. Aun así todos ellos experimentaron un incremento inicial, hacia la semana 15, y un descenso más o menos brusco en función de la pauta de suplementación empleada durante el primer trimestre, hasta la semana 34. Esto podría ser el resultado visible de la respuesta a la suplementación que en mayor o menor medida siguieron las gestantes al principio de embarazo e incluso, en algunos casos, antes de la concepción. Cikot y colaboradores<sup>301</sup> ya describieron estas variaciones, aunque más suaves, en una cohorte de gestantes holandesas sobre la que no especificaban si usaba suplementos de ácido fólico o no. Holmes y colaboradores<sup>258</sup> analizaron el folato eritrocitario a las 12, 20 y 35 SG de 101 gestantes de Irlanda del Norte. De manera similar a los resultados obtenidos en este trabajo, el folato eritrocitario fue mayor hacia la semana 20 que a las 12 semanas y luego descendió en la semana 35. Los autores registraron cualquier consumo de suplementos de ácido fólico y realizaron los análisis separando a las gestantes en función de si habían consumido o no suplementos de ácido fólico. La concentración de folato eritrocitario fue mayor en aquellas gestantes que habían sido suplementada con ácido fólico en relación a las que no en cada uno de los momentos analizados.

La concentración de folato eritrocitario fue similar en aquellas gestantes que consumieron elevadas dosis de ácido fólico al inicio del embarazo (grupos *elevada* y *excesiva*), muy por encima de los grupos de suplementación *adecuada* e *insuficiente*. A partir de la semana 15 la caída que experimentó el folato eritrocitario de los grupos *elevada* y *excesiva* fue mucho más pronunciada que la experimentaron los grupos *adecuada* e *insuficiente*. A pesar de ello, las gestantes que habían sido suplementadas durante el primer trimestre de manera *elevada* o *excesiva* alcanzaron las 34 SG con concentraciones superiores de folato eritrocitario, lo que les permitiría afrontar la lactancia o un posible futuro embarazo con unas buenas reservas de folato.

Aunque las concentraciones de folato eritrocitario al final de gestación en los grupos de suplementación *adecuada* e *insuficiente* no son bajos (925 y 694 nmol/L respectivamente) y apenas hallamos gestantes deficientes en folato eritrocitario, hay que tener en cuenta que un 38.7% y un 47.6% de las mujeres de estos grupos respectivamente llegan al momento del parto en un estado deficiente en folato plasmático (Tabla 16). Si en un momento de máxima demanda, la concentración de folato plasmático dependiera de la movilización de reservas<sup>246</sup>, estas mujeres se hallarían en una situación comprometida.

En contra de lo observado con el folato plasmático y el eritrocitario, que se comportaban de manera diferente a lo largo del embarazo en función de la pauta de suplementación empleada durante el primer trimestre, la cobalamina plasmática experimentó la misma evolución en todos los grupos de suplementación (Tabla 16). Además, la proporción de gestantes en el tercil bajo de cobalamina plasmática fue similar entre los grupos de suplementación (Tabla 17). Esto es especialmente preocupante en los grupos de suplementación *elevada* y *excesiva*, donde el elevado estado en folatos que alcanzan durante la primera mitad del embarazo unido a un aporte insuficiente de la cobalamina necesaria para la utilización del folato por el metabolismo celular podría desembocar en manifestaciones metabólicas de deficiencia en cobalamina (elevada tHcy y elevado ácido metilmalónico)<sup>104</sup> e incluso en alteraciones cognitivas<sup>102</sup>. Así pues, aquellas gestantes que consumen elevadas dosis de suplementación con ácido fólico deberían recibir también dosis más elevadas de cobalamina que las que siguen la pauta de suplementación recomendada.

#### 4. Polimorfismos en la muestra

En los capítulos correspondientes al estudio poblacional se han descrito diversas combinaciones de polimorfismos cuya presencia se asocia a un incremento en el riesgo de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario, siempre y cuando no exista exposición al ácido fólico sintético.

En la muestra de gestantes, las frecuencias de los polimorfismos estudiados en general fueron similares a las de la muestra de población (Tabla 20). No obstante, hubo algunas diferencias en cuanto a frecuencia entre ambas muestras en los polimorfismos *MTRR* 66A>G, *MTHFD1* -105C>T, *MTHFD1* 1958G>A o *DHFR* 19del. Hay que tener en cuenta que no deberíamos esperar que las frecuencias sean las mismas, pues la muestra del estudio poblacional es representativa de la población y estratificada por edad y sexo, mientras que en el estudio NUTCIR solo contamos con mujeres en edad fértil embarazadas.

Por ello, pretendíamos evaluar el efecto de la suplementación con ácido fólico sobre el impacto de dichas combinaciones de polimorfismos sobre el estado en folato en una situación fisiológica de elevada demanda<sup>230</sup> y catabolismo<sup>235</sup> de folato como es la gestación.

Sin embargo, las condiciones exigidas para realizar los modelos multivariados (presencia simultánea de ambos polimorfismos, tercil bajo de folato, información disponible sobre edad, pauta de suplementación y nivel socioeconómico) hizo que no fuera posible realizar las comparaciones a causa del reducido número de gestantes que cumplían todos los requisitos (Tablas 21 y 22).

## 5. Efecto del polimorfismo *MTHFR* 677C>T sobre las reservas de folato

El polimorfismo *MTHFR* 677C>T se ha relacionado con concentraciones bajas de folato circulante<sup>199,205,248,303-305</sup>. Sin embargo, se ha observado que el folato plasmático se halla muy influenciado por la ingesta reciente<sup>79,80</sup>. El folato eritrocitario en cambio, refleja más fielmente el estado en folato a largo plazo, pues la vida media de los eritrocitos es de 120 días y el contenido en folato de los mismos se establece antes de que éstos abandonen la médula ósea<sup>81,82</sup>.

En este trabajo se observó que la concentración en folato eritrocitario disminuye a medida que avanza la gestación en todos los genotipos para el polimorfismo *MTHFR* 677C>T y en todos los terciles de folato plasmático (Tabla 23). No se encontraron diferencias en cuanto a folato eritrocitario entre gestantes salvajes y homocigotas para dicho polimorfismo en el tercil alto de folato plasmático, lo que sugiere que el estado elevado en folato plasmático alcanzado mediante altas dosis de suplementación con ácido fólico compensa o elimina el efecto del polimorfismo sobre las reservas de folato. Sin embargo, cuando las gestantes se hallaban en el tercil bajo de folato plasmático, la concentración de folato eritrocitario fue inferior en las gestantes homocigotas en relación a las salvajes a las 15, 24-27 y 34 SG; y lo mismo sucedió con las gestantes del tercil medio de folato plasmático a las 24-27 y 34 SG, lo que apoya la hipótesis planteada anteriormente.

Estos resultados guardan relación con los obtenidos en un estudio llevado a cabo en Holanda con 49 mujeres caucásicas que habían sufrido abortos recurrentes y cuyo objetivo era estudiar los efectos de la suplementación con 0.5 mg diarios de ácido fólico sobre las concentraciones de folato, estratificando según el polimorfismo *MTHFR* 677C>T. Tras dos meses de suplementación, el folato eritrocitario había aumentado un 70% respecto al inicio de la intervención, y desde ese momento hasta dos meses más tarde aumentó un 36% más. Tras 4 meses de suplementación diaria con ácido fólico, no hubo diferencias en cuanto a dicha concentración entre las variantes del polimorfismo *MTHFR* 677C>T<sup>306</sup>.

De manera similar, en un estudio reciente realizado en los EUA donde se administraban diferentes dosis de ácido fólico a los participantes, se halló que si bien el folato plasmático respondía a bajas dosis de ácido fólico, el folato eritrocitario solo lo hacía a altas dosis, y esta respuesta no era diferente en los genotipos del polimorfismo *MTHFR* 677C>T<sup>307</sup>.

Todo parece indicar que la suplementación con elevadas dosis de ácido fólico durante el primer trimestre que mantiene concentraciones elevadas de folato plasmático durante todo el embarazo compensa los efectos perjudiciales del polimorfismo *MTHFR* 677C>T sobre la concentración de folato eritrocitario<sup>284</sup>. Dichos efectos solo son visibles cuando el estado en folato plasmático no es óptimo,

como consecuencia de una suplementación durante el primer trimestre que quizá resulte insuficiente en cuanto a dosis o duración.

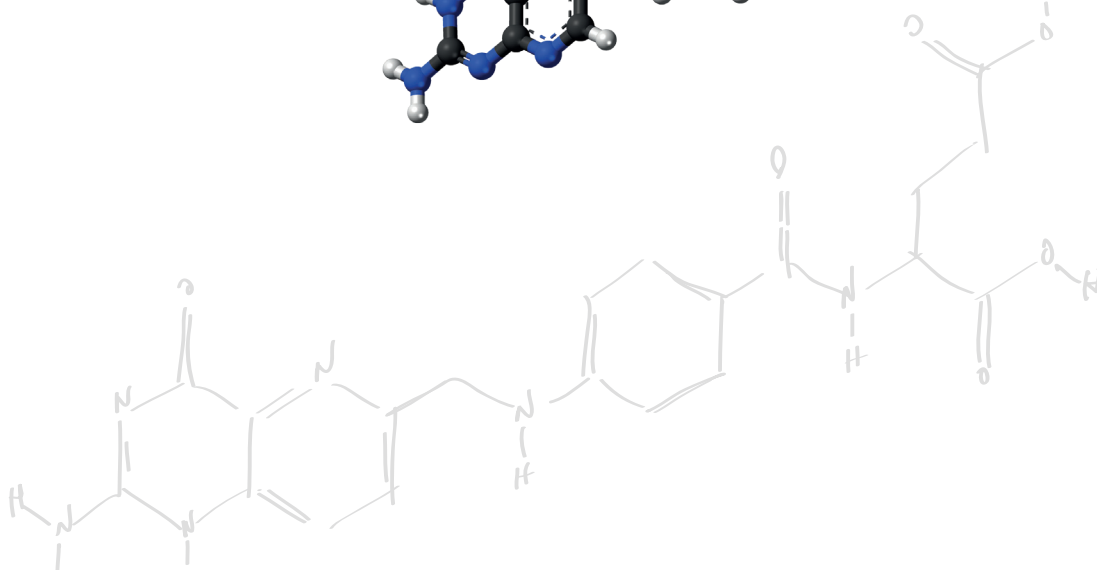
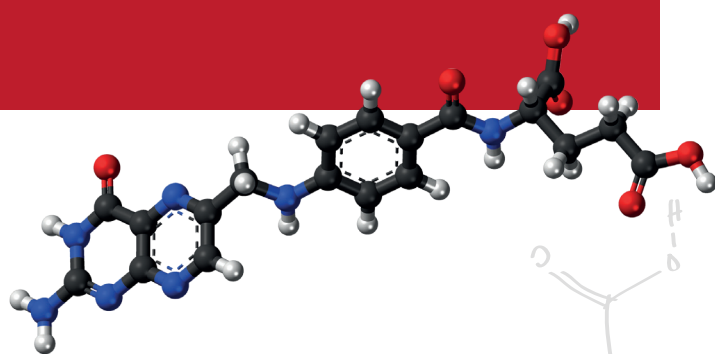
Este estudio ha permitido describir por primera vez cómo evoluciona el estado en folatos de las gestantes en respuesta a la pauta de suplementación seguida durante el primer trimestre en una población donde no existe fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico y, por tanto, la principal fuente de ácido fólico sintético son los suplementos vitamínicos prescritos por el obstetra. Hemos podido observar como dicha suplementación resulta de especial interés entre las gestantes *MTHFR 677TT*, y cómo el efecto de este genotipo sobre las reservas de folato está modulado por el estado en folato plasmático.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



**VISIÓN  
GLOBAL**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

En esta tesis se ha descrito el estado en folatos de una población no expuesta a fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico. A pesar de tratarse de una población con una buena adherencia a la dieta mediterránea debido a su ubicación geográfica, a partir de los registros dietéticos se detectó que un 83.5% de los participantes no alcanzaban la ingesta de 400 µg diarios de folato recomendados por el IOM para el grueso de la población adulta. Como consecuencia, un 18.8% de los participantes fueron deficientes en folato plasmático (<7 nmol/L).

Por otro lado, el disponer de una muestra representativa de población sana, no expuesta al ácido fólico presente en los alimentos fortificados ni al uso de suplementos vitamínicos con ácido fólico ha permitido observar el efecto neto del genotipo sobre el estado en folatos. Así hemos descrito por primera vez cuatro parejas de polimorfismos que se asocian con un riesgo hasta 18 veces mayor de presentar un bajo estado en folato, tanto plasmático como eritrocitario. Los individuos dobles homocigotos para dichas parejas de polimorfismos se encuentran en la muestra en una frecuencia nada despreciable de alrededor del 5%.

En presencia de estas características y en ausencia de fortificación obligatoria de los alimentos con ácido fólico, la población estudiada podría calificarse de población en riesgo, pues un individuo de cada cinco no dispone y al menos un 5% tienen un riesgo elevado de no disponer del suficiente folato para transferir los grupos metilo necesarios a aquellas reacciones que lo necesitan. La mayoría de estas reacciones están relacionadas con la replicación celular, lo que convierte al folato en una vitamina esencial en situaciones que requieran un rápido crecimiento y desarrollo tisular, como es el caso de la gestación.

En la muestra estudiada, un 24.2% de las mujeres en edad fértil (entre 18 y 44 años) fueron deficientes en folato plasmático, y un 86.7% no alcanzaron la ingesta de 400 µg diarios de folato recomendados por el IOM. Estos hechos colocan a dichas mujeres en situación de riesgo de deficiencia en folato en caso de tener que afrontar un embarazo no planificado, lo que de hecho sucede en el 19% de los embarazos analizados en la cohorte de gestantes NUTCIR, con las complicaciones del embarazo derivadas que dicha deficiencia conlleva.

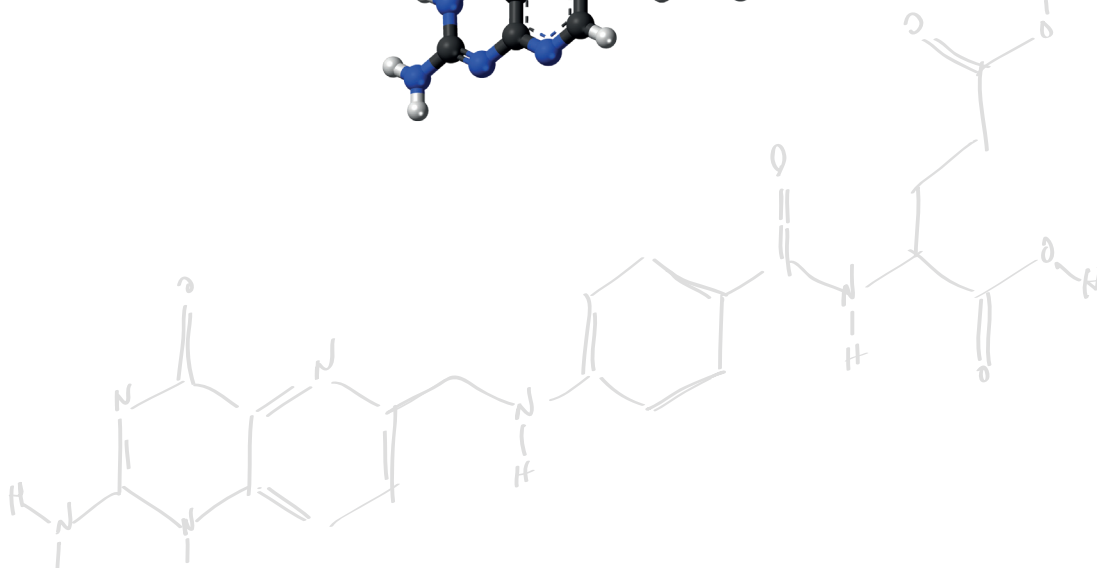
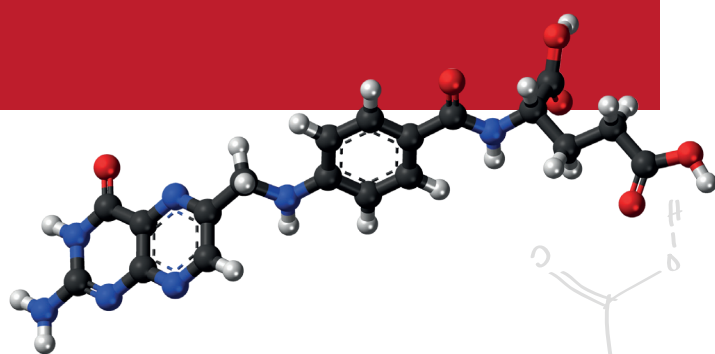
Además hay que tener en cuenta que entre dichas gestantes, hasta un 6% son dobles homocigotas para las parejas de polimorfismos que en el estudio poblacional se han relacionado con un incremento del riesgo de bajo estado en folatos, lo que las sitúa en una situación delicada.

Sin embargo, un 35% de las gestantes estudiadas que planificaron su embarazo consumieron suplementos vitamínicos durante la preconcepción. Además, un 47.4% se adhirió correctamente a la pauta de suplementación recomendada por la SEGO de 400 µg diarios de ácido fólico durante el primer trimestre. Estas dos características aseguran un correcto aporte de folato y por tanto reducen

considerablemente el riesgo de sufrir DTNs, ya que el tubo neural se cierra alrededor de la cuarta semana de gestación, cuando en muchas ocasiones la propia gestante desconoce la existencia del embarazo.

El efecto de determinadas combinaciones de genotipos sobre el estado en folato durante el embarazo no pudo ser analizado tan en profundidad como en la muestra de población general debido a los numerosos factores confusores presentes durante la gestación que hacían indispensable su inclusión en los modelos multivariados como variables de ajuste. Como consecuencia, el número final de gestantes que entraban en los modelos se redujo drásticamente y se perdió potencia estadística.

No obstante, pudimos comprobar que entre aquellas gestantes con un bajo o medio estado en folato plasmático (la respuesta biológica al uso de suplementación) la concentración de folato eritrocitario fue inferior en las homocigotas en relación a las que tenían genotipo salvaje para el polimorfismo *MTHFR* 677C>T. En cambio, cuando el estado en folato plasmático era elevado debido a una elevada suplementación con ácido fólico durante gran parte del embarazo, no hubo diferencias en cuanto al folato eritrocitario entre las distintas variantes del polimorfismo *MTHFR* 677C>T. De aquí se deduce que una elevada suplementación con ácido fólico más allá del primer trimestre compensa el efecto perjudicial de la presencia del polimorfismo *MTHFR* 677C>T, y por extensión posiblemente de las parejas de polimorfismos relacionadas con el riesgo de bajo estado en folato.



## CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

Para evidenciar la correspondencia de las conclusiones con los objetivos propuestos, antes de cada conclusión se ha repetido el correspondiente objetivo en letra atenuada.

### **Estudio poblacional**

#### *Objetivo 1: Describir el estado en folatos*

- Un 18.8% de la muestra estudiada presenta un estado deficiente en folatos (folato plasmático < 7 nmol/L). Este porcentaje disminuye con la edad siguiendo una tendencia lineal significativa. En el caso de las mujeres en edad fértil (18-44 años) este porcentaje aumenta hasta el 24.2%.

#### *Objetivo 2: Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos implicados en el metabolismo de los compuestos monocarbonados*

- Los polimorfismos más frecuentes en la muestra son *MTHFD1*- 105C>T, *MTRR* 66A>G y *SLC19A1* 80G>A, con una proporción de individuos homocigóticos de 28.5%, 23.7% y 23.5% respectivamente.

#### *Objetivo 3: Describir la relación de los polimorfismos estudiados y sus combinaciones con el estado en folatos*

- Los individuos homocigotos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentan una concentración de folato plasmático inferior y una concentración de tHcy superior en comparación con los individuos con genotipo salvaje. En cuanto al folato eritrocitario, tanto los homocigotos como los heterocigotos presentan una concentración menor que los salvajes. La presencia del genotipo *MTHFR* 677TT se asoció con un riesgo mayor de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario.
- Los individuos homocigotos y heterocigotos para el polimorfismo *SLC19A1* 80G>A presentan una concentración menor de folato eritrocitario que los salvajes. La probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario fue mayor en los individuos con el genotipo *SLC19A1* 80AA en comparación con aquellos que tenían el genotipo salvaje.
- Los individuos homocigotos para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T tienen un riesgo un 48% menor de hallarse en el tercil bajo de folato eritrocitario en relación a los salvajes.
- El estado en folatos fue peor en los dobles homocigotos que en los dobles salvajes para cualquier pareja de polimorfismos que incluyera el *MTHFR* 677 C>T.

- La concentración de folato eritrocitario fue inferior en aquellos individuos con el genotipo *SLC19A1* 80AA-*MTHFD1* -105TT y superior en aquellos con el genotipo *MTRR* 66GG-*MTHFD1* 1958AA en comparación con sus correspondientes combinaciones de genotipos salvajes.
- Las combinaciones de polimorfismos *MTHFR* 677C>T-*SLC19A1* 80G>A y *MTHFR* 677C>T-*MTHFD1* 1958G>A se asocian con un riesgo mayor de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático y eritrocitario a media que aumenta el número de alelos mutados para estas combinaciones.
- La probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático en los individuos no fumadores y en el tercil bajo de folato eritrocitario en todos los individuos con la combinación de genotipos *MTHFR* 677TT-*MTHFD1* -105TT fue superior a la de aquellos individuos con la correspondiente combinación de genotipos salvajes.
- La probabilidad de hallarse en el tercil bajo de folato plasmático en los individuos no fumadores y en el tercil bajo de folato eritrocitario en todos los individuos con la combinación de genotipos *MTHFR* 677TT-*DHFR* 19del fue superior a la de aquellos individuos con la correspondiente combinación de genotipos salvajes.

### **Estudio NUTCIR**

*Objetivo 4: Explorar las características ambientales de las gestantes en cada tercil de folato plasmático durante el primer trimestre*

- La distribución del nivel socioeconómico y la pauta de suplementación con ácido fólico empleada durante el primer trimestre son diferentes entre los terciles de folato plasmático del primer trimestre.
- En el tercil alto de folato plasmático del primer trimestre hay más gestantes que planifican su embarazo y se suplementan antes de la concepción, y menos fumadoras que en el tercil bajo.
- Las concentraciones de folato plasmático y eritrocitario y de cobalamina plasmática durante el primer trimestre fueron mayores en los terciles medio y alto de folato plasmático en relación al tercil bajo. La concentración de tHcy siguió el patrón inverso.

*Objetivo 5: Investigar el comportamiento del estado en folato a lo largo de la gestación en función de la pauta de suplementación seguida durante el primer trimestre*

- La evolución de la concentración de folato plasmático a lo largo del embarazo fue diferente en función de la pauta de suplementación con ácido fólico empleada durante el primer trimestre. Aquellas gestantes que se suplementaron por encima de la pauta recomendada

por la SEGO llegaron al final de la gestación con un mejor estado en folato plasmático y experimentaron una disminución más brusca de folato plasmático entre las semanas 15 y 24-27 que las que se adhirieron a la recomendación o no la alcanzaron.

- La evolución de la concentración de folato eritrocitario a lo largo del embarazo fue diferente en función de la pauta de suplementación con ácido fólico empleada durante el primer trimestre. Aquellas gestantes que se suplementaron por encima de la pauta recomendada por la SEGO llegaron al final de la gestación con un mejor estado en folato eritrocitario que aquellas que se adhirieron a la recomendación o no la alcanzaron.

*Objetivo 6: Investigar si el estado en folato plasmático enmascara el efecto del polimorfismo MTHFR 677C>T sobre las reservas de folato a lo largo del embarazo.*

- Las concentraciones elevadas de folato plasmático compensan el efecto perjudicial del genotipo MTHFR 677 TT sobre la concentración de folato eritrocitario.

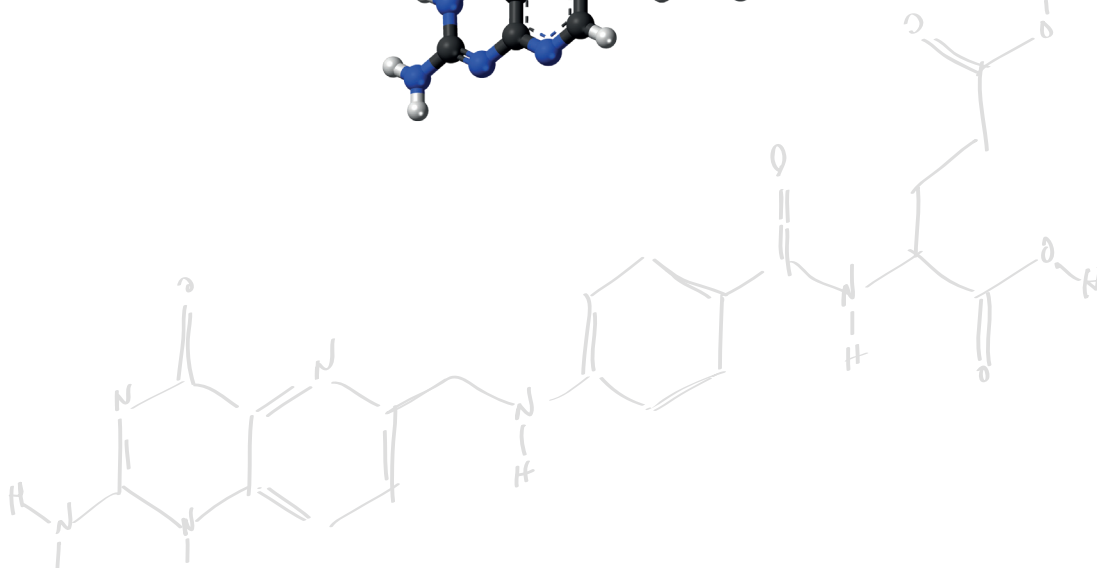
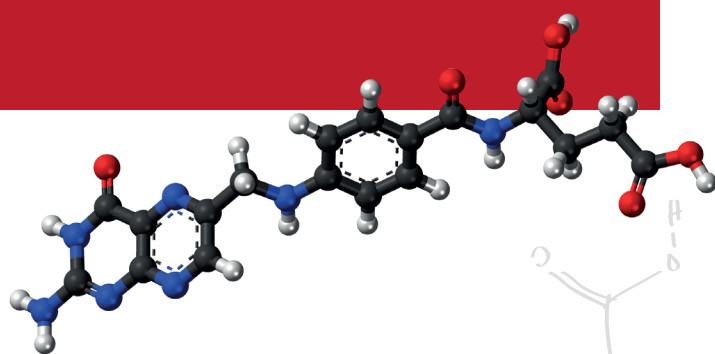


UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

1. Gregory JF, 3rd. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res* 1989;33:1-101.
2. Shane B. Folate Chemistry and Metabolism. In: Bailey LB, editor. *Folate in Health and Disease*. Second edition ed. Boca Raton: CRC Press. Taylor&Francis Group; 2010. p. 1.
3. Bailey LB. Folic Acid. In: Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW, editors. *Handbook of vitamins*. First ed. Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor and Francis Group; 2007. p. 385.
4. Ueland PM, Refsum H, Male R, Lillehaug JR. Disposition of endogenous homocysteine by mouse fibroblast C3H/10T1/2 Cl 8 and the chemically transformed C3H/10T1/2 MCA Cl 16 cells following methotrexate exposure. *J Natl Cancer Inst* 1986;77(1):283-289.
5. Christensen B, Refsum H, Vintermyr O, Ueland PM. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of non-transformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. *J Cell Physiol* 1991;146(1):52-62.
6. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999;100(11):1161-1168.
7. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-246.
8. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1(5):228-237.
9. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
10. Fernandez-Roig S, Cavalle-Busquets P, Fernandez-Ballart JD, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, Salat-Batlle J, et al. Low folate status enhances pregnancy changes in plasma betaine and dimethylglycine concentrations and the association between betaine and homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2013;97(6):1252-1259.
11. Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997;66:269-313.
12. Weissbach H, Taylor RT. Roles of vitamin B 12 and folic acid in methionine synthesis. *Vitam Horm* 1970;28:415-440.
13. Wilson MC, Farmer JL, Rothman F. Thymidylate synthesis and aminopterin resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1966;92(1):186-196.

- 14.Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981;2(8242):337-340.
- 15.Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250(3):459-477.
- 16.Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991;338(8760):131-137.
- 17.Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;346(8972):393-396.
- 18.Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59(4):536-545.
- 19.Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 2001;285(23):2981-2986.
- 20.Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, et al. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet* 1999;23(2):228-232.
- 21.Blencowe H, Cousens S, Modell B, Lawn J. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010;39 Suppl 1:i110-21.
- 22.Report on periconceptional folic acid supplementation for Austria - Special-Report-NTD-3rdEd-Part-I.pdf. Available at: <http://www.euocat-network.eu/content/Special-Report-NTD-3rdEd-Part-I.pdf>. Accessed 6/25/2013, 2013.
- 23.Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007;85(1):285S-288S.
- 24.Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 1):3731S-3739S.
- 25.Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(7):3290-3295.

- 26.Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998;395(6697):89-93.
- 27.Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 2005;83(3):296-321.
- 28.Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(7):3290-3295.
- 29.Duthie SJ, Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J* 1998;12(14):1491-1497.
- 30.Duthie SJ, Grant G, Narayanan S. Increased uracil misincorporation in lymphocytes from folate-deficient rats. *Br J Cancer* 2000;83(11):1532-1537.
- 31.Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 2004;38:445-476.
- 32.Dianov GL, Timchenko TV, Sinitsina OI, Kuzminov AV, Medvedev OA, Salganik RI. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. *Mol Gen Genet* 1991;225(3):448-452.
- 33.Moynahan ME, Jasin M. Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(17):8988-8993.
- 34.Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN, Fenech M. The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(10):1089-1096.
- 35.Elliott B, Jasin M. Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(2):373-385.
- 36.Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23(5):687-696.
- 37.Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313(18):1111-1116.
- 38.Brisson O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155(1):25-41.

39. Kim YI, Salomon RN, Graeme-Cook F, Choi SW, Smith DE, Dallal GE, et al. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. *Gut* 1996;39(5):732-740.
40. Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the *apcMin* mouse. *Cancer Res* 2000;60(19):5434-5440.
41. Kotsopoulos J, Medline A, Renlund R, Sohn KJ, Martin R, Hwang SW, et al. Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats. *Carcinogenesis* 2005;26(9):1603-1612.
42. Leu RK, Young GP, McIntosh GH. Folate deficiency reduces the development of colorectal cancer in rats. *Carcinogenesis* 2000;21(12):2261-2265.
43. Hultdin J, Van Guelpen B, Bergh A, Hallmans G, Stattin P. Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine and prostate cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer* 2005;113(5):819-824.
44. Stolzenberg-Solomon RZ, Chang SC, Leitzmann MF, Johnson KA, Johnson C, Buys SS, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):895-904.
45. Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006;55(10):1461-1466.
46. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(3):267-292.
47. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72(2):324-332.
48. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:93-109.
49. Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, Karakitsiou DE, Simancas-Racines D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;1:CD006612.
50. Reynolds EH. Neurological aspects of folate and vitamin B12 metabolism. *Clin Haematol* 1976;5(3):661-696.
51. Shorvon SD, Carney MW, Chanarin I, Reynolds EH. The neuropsychiatry of megaloblastic anaemia. *Br Med J* 1980;281(6247):1036-1038.

- 52.Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006;5(11):949-960.
- 53.Cantoni GL. The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Prog Clin Biol Res* 1985;198:47-65.
- 54.Surtees R, Leonard J, Austin S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 1991;338(8782-8783):1550-1554.
- 55.Gobbel GT, Bellinzona M, Vogt AR, Gupta N, Fike JR, Chan PH. Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1998;18(1):147-155.
- 56.Kruman II, Schwartz E, Kruman Y, Cutler RG, Zhu X, Greig NH, et al. Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279(42):43952-43960.
- 57.McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr* 2007;86(5):1563S-8S.
- 58.Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(11):5923-5928.
- 59.Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* 1997;25(3):335-358.
- 60.McMahon JA, Green TJ, Skeaff CM, Knight RG, Mann JI, Williams SM. A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance. *N Engl J Med* 2006;354(26):2764-2772.
- 61.Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* 2007;369(9557):208-216.
- 62.Tamura T, Stokstad EL. The availability of food folate in man. *Br J Haematol* 1973;25(4):513-532.
- 63.Gregory JF,3rd, Bhandari SD, Bailey LB, Toth JP, Baumgartner TG, Cerda JJ. Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1991;53(3):736-740.
- 64.Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347(9002):657-659.



65. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997;66(6):1388-1397.
66. Caudill MA. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am J Clin Nutr* 2010;91(5):1455S-1460S.
67. Hannon-Fletcher MP, Armstrong NC, Scott JM, Pentieva K, Bradbury I, Ward M, et al. Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. *Am J Clin Nutr* 2004;80(4):911-918.
68. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46(6):1016-1028.
69. Winkels RM, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB, Verhoef P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr* 2007;85(2):465-473.
70. van het Hof KH, Tijburg LB, Pietrzik K, Weststrate JA. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Br J Nutr* 1999;82(3):203-212.
71. Castenmiller JJ, van de Poll CJ, West CE, Brouwer IA, Thomas CM, van Dusseldorp M. Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids. *Ann Nutr Metab* 2000;44(4):163-169.
72. O'Leary K, Sheehy PJ. Effects of preparation and cooking of folic acid-fortified foods on the availability of folic acid in a folate depletion/repletion rat model. *J Agric Food Chem* 2001;49(9):4508-4512.
73. Delchier N, Ringling C, Le Grandois J, Aoude-Werner D, Galland R, George S, et al. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. *Food Chem* 2013;139(1-4):815-824.
74. Verwei M, Arkbage K, Mocking H, Havenaar R, Groten J. The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J Nutr* 2004;134(1):31-37.
75. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Disponible en [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6015&page=196](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6015&page=196). Consultado 6/9/2013, 2013.
76. Yang TL, Hung J, Caudill MA, Urrutia TF, Alamilla A, Perry CA, et al. A long-term controlled folate feeding study in young women supports the validity of the 1.7 multiplier in the dietary folate equivalency equation. *J Nutr* 2005;135(5):1139-1145.

77. Fazili Z, Pfeiffer CM, Zhang M. Comparison of serum folate species analyzed by LC-MS/MS with total folate measured by microbiologic assay and Bio-Rad radioassay. *Clin Chem* 2007;53(4):781-784.
78. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43-53.
79. Bailey LB. Folate status assessment. *J Nutr* 1990;120 Suppl 11:1508-1511.
80. Kohlmeier L. Future of dietary exposure assessment. *Am J Clin Nutr* 1995;61(3 Suppl):702S-709S.
81. Zettner A, Boss GR, Seegmiller JE. A long-term study of the absorption of large oral doses of folic acid. *Ann Clin Lab Sci* 1981;11(6):516-524.
82. Hesecker H, Schmitt G. Effect of long-term supplementation of folate on folate status in plasma and erythrocytes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1987;33(3):163-168.
83. CHANARIN I. Folate deficiency. In: Blakley RL, Whitehead VM, editors. *Folates and Pterins, Vol 3. Nutritional, pharmaceutical and physiological aspects.* Second ed. New York: Wiley-Interscience; 1986. p. 75.
84. Senti FR, Pilch SM. Analysis of folate data from the second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II). *J Nutr* 1985;115(11):1398-1402.
85. HIBBARD BM. The Role of Folic Acid in Pregnancy; with Particular Reference to Anaemia, Abruption and Abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964;71:529-542.
86. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327(26):1832-1835.
87. Centers for Disease Control (CDC). Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983-1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40(30):513-516.
88. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm Rep* 1992;41(RR-14):1-7.
89. Federal Register | Food Standards: Amendment of Standards of Identity for Enriched Grain Products to Require Addition of Folic Acid; Clarification. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/articles/1996/09/05/96-22606/food-standards-amendment-of-standards-of-identity-for-enriched-grain-products-to-require-addition-of>. Consultado 2/13/2012, 2012.
90. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron--worldwide, 2004 and 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;57(1):8-10.

- 91.Sayed AR, Bourne D, Pattinson R, Nixon J, Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82(4):211-216.
- 92.Chen LT, Rivera MA. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev* 2004;62(6 Pt 2):S40-3.
- 93.Hertrampf E, Cortes F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev* 2004;62(6 Pt 2):S44-8; discussion S49.
- 94.Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, et al. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* 2002;66(1):33-39.
- 95.Hertrampf E, Cortes F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr* 2003;133(10):3166-3169.
- 96.Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JI, et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988-2004. *Am J Clin Nutr* 2007;86(3):718-727.
- 97.Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340(19):1449-1454.
- 98.Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chem* 2000;70(3):275-289.
- 99.Bailey RL, Dodd KW, Gahche JJ, Dwyer JT, McDowell MA, Yetley EA, et al. Total folate and folic acid intake from foods and dietary supplements in the United States: 2003-2006. *Am J Clin Nutr* 2010;91(1):231-237.
- 100.Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. Vitamin B-12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997;66(4):741-749.
- 101.Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993;7(14):1344-1353.
- 102.Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007;85(1):193-200.

103. Mills JL, Carter TC, Scott JM, Troendle JF, Gibney ER, Shane B, et al. Do high blood folate concentrations exacerbate metabolic abnormalities in people with low vitamin B-12 status? *Am J Clin Nutr* 2011;94(2):495-500.
104. Miller JW, Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. *Am J Clin Nutr* 2009;90(6):1586-1592.
105. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007;7:41.
106. Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *J Nutr* 2006;136(1):189-194.
107. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356(9244):1795-1799.
108. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998;129(7):517-524.
109. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007;297(21):2351-2359.
110. Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in *Apc+/-Msh2-/-* mice. *Cancer Res* 2000;60(12):3191-3199.
111. Stevens VL, McCullough ML, Sun J, Jacobs EJ, Campbell PT, Gapstur SM. High levels of folate from supplements and fortification are not associated with increased risk of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2011;141(1):98-105, 105.e1.
112. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124(2):544-560.
113. Whetstone JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J* 2002;367(Pt 3):629-640.

114. Zhao R, Gao F, Hanscom M, Goldman ID. A prominent low-pH methotrexate transport activity in human solid tumors: contribution to the preservation of methotrexate pharmacologic activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):718-727.
115. Goldman ID. The characteristics of the membrane transport of amethopterin and the naturally occurring folates. *Ann N Y Acad Sci* 1971;186:400-422.
116. Zhao R, Russell RG, Wang Y, Liu L, Gao F, Kneitz B, et al. Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J Biol Chem* 2001;276(13):10224-10228.
117. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006;127(5):917-928.
118. Qiu A, Min SH, Jansen M, Malhotra U, Tsai E, Cabelof DC, et al. Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293(5):C1669-78.
119. Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta KY, Hatakeyama M, et al. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(3):G660-8.
120. Geller J, Kronn D, Jayabose S, Sandoval C. Hereditary folate malabsorption: family report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2002;81(1):51-68.
121. Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992;79(11):2807-2820.
122. Salazar MD, Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(1):141-152.
123. Rijnboutt S, Jansen G, Posthuma G, Hynes JB, Schornagel JH, Strous GJ. Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *J Cell Biol* 1996;132(1-2):35-47.
124. Sabharanjak S, Mayor S. Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(8):1099-1109.
125. Lacey SW, Sanders JM, Rothberg KG, Anderson RG, Kamen BA. Complementary DNA for the folate binding protein correctly predicts anchoring to the membrane by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Clin Invest* 1989;84(2):715-720.

- 126.Lee HC, Shoda R, Krall JA, Foster JD, Selhub J, Rosenberry TL. Folate binding protein from kidney brush border membranes contains components characteristic of a glycoinositol phospholipid anchor. *Biochemistry* 1992;31(12):3236-3243.
- 127.Shen F, Wu M, Ross JF, Miller D, Ratnam M. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry* 1995;34(16):5660-5665.
- 128.Spiegelstein O, Eudy JD, Finnell RH. Identification of two putative novel folate receptor genes in humans and mouse. *Gene* 2000;258(1-2):117-125.
- 129.Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ, Goldman ID. Comparison of transport properties of the reduced folate carrier and folate receptor in murine L1210 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 1995;50(8):1287 <last\_page> 1294.
- 130.Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA. Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Res* 1992;52(23):6708-6711.
- 131.Wu M, Gunning W, Ratnam M. Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(9):775-782.
- 132.Chancy CD, Kekuda R, Huang W, Prasad PD, Kuhnel JM, Sirotnak FM, et al. Expression and differential polarization of the reduced-folate transporter-1 and the folate receptor alpha in mammalian retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 2000;275(27):20676-20684.
- 133.Campbell IG, Jones TA, Foulkes WD, Trowsdale J. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51(19):5329-5338.
- 134.Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR,Jr, et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res* 1992;52(12):3396-3401.
- 135.Garin-Chesa P, Campbell I, Saigo PE, Lewis JL,Jr, Old LJ, Rettig WJ. Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein. *Am J Pathol* 1993;142(2):557-567.
- 136.Weitman SD, Frazier KM, Kamen BA. The folate receptor in central nervous system malignancies of childhood. *J Neurooncol* 1994;21(2):107-112.
- 137.Bueno R, Appasani K, Mercer H, Lester S, Sugarbaker D. The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(2):225-233.

138. Evans CO, Young AN, Brown MR, Brat DJ, Parks JS, Neish AS, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):3097-3107.
139. Ratnam M, Marquardt H, Duhring JL, Freisheim JH. Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry* 1989;28(20):8249-8254.
140. Reddy JA, Haneline LS, Srouf EF, Antony AC, Clapp DW, Low PS. Expression and functional characterization of the beta-isoform of the folate receptor on CD34(+) cells. *Blood* 1999;93(11):3940-3948.
141. Ross JF, Wang H, Behm FG, Mathew P, Wu M, Booth R, et al. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer* 1999;85(2):348-357.
142. Wang H, Zheng X, Behm FG, Ratnam M. Differentiation-independent retinoid induction of folate receptor type beta, a potential tumor target in myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(10):3529-3536.
143. Zhu H, Wlodarczyk BJ, Scott M, Yu W, Merriweather M, Gelineau-van Waes J, et al. Cardiovascular abnormalities in Folr1 knockout mice and folate rescue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79(4):257-268.
144. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003;22(47):7537-7552.
145. Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* 2005;65(10):4425-4430.
146. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat* 2006;9(4-5):227-246.
147. Rosenberg IH, Streiff RR, Godwin HA, Castle WB. Absorption of polyglutamic folate: participation of deconjugating enzymes of the intestinal mucosa. *N Engl J Med* 1969;280(18):985-988.
148. Rosenberg IH. 1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. *Am J Clin Nutr* 1990;51(4):531-534.
149. Wang TT, Chandler CJ, Halsted CH. Intracellular pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal mucosa. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 1986;261(29):13551-13555.

- 150.Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986;261(2):928-933.
- 151.Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65(6):1790-1795.
- 152.Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e4.
- 153.Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W. Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282(4):G720-6.
- 154.Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, et al. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res* 1997;57(16):3506-3510.
- 155.Weitman SD, Frazier KM, Kamen BA. The folate receptor in central nervous system malignancies of childhood. *J Neurooncol* 1994;21(2):107-112.
- 156.Birn H, Selhub J, Christensen EI. Internalization and intracellular transport of folate-binding protein in rat kidney proximal tubule. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 1):C302-10.
- 157.Shane B. Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 1989;45:263-335.
- 158.Horne DW, Patterson D, Cook RJ. Effect of nitrous oxide inactivation of vitamin B12-dependent methionine synthetase on the subcellular distribution of folate coenzymes in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1989;270(2):729-733.
- 159.Lin BF, Huang RF, Shane B. Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. III. Role of mitochondrial folylpoly-gamma-glutamate synthetase. *J Biol Chem* 1993;268(29):21674-21679.
- 160.Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J* 1991;5(12):2645-2651.
- 161.Sweeney MR, McPartlin J, Weir DG, Scott JM. Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;788(1):187-191.



- 162.Sweeney MR, McPartlin J, Weir DG, Daly L, Scott JM. Postprandial serum folic acid response to multiple doses of folic acid in fortified bread. *Br J Nutr* 2006;95(1):145-151.
- 163.Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000;70(4):310-315.
- 164.Whetstine JR, Gifford AJ, Witt T, Liu XY, Flatley RM, Norris M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. *Clin Cancer Res* 2001;7(11):3416-3422.
- 165.O'leary VB, Pangilinan F, Cox C, Parle-McDermott A, Conley M, Molloy AM, et al. Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defect risk. *Mol Genet Metab* 2006;87(4):364-369.
- 166.Morin I, Devlin AM, Leclerc D, Sabbaghian N, Halsted CH, Finnell R, et al. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* 2003;79(3):197-200.
- 167.Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Hum Mutat* 2007;28(9):856-865.
- 168.Pei L, Zhu H, Ren A, Li Z, Hao L, Finnell RH, et al. Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(6):430-433.
- 169.Pei L, Zhu H, Zhu J, Ren A, Finnell RH, Li Z. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China. *Ann Epidemiol* 2006;16(5):352-356.
- 170.Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006;83(3):708-713.
- 171.Yates Z, Lucock M. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life Sci* 2005;77(22):2735-2742.
- 172.Winkelmayer WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on

- folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* 2003;63(6):2280-2285.
- 173.Fodinger M, Dierkes J, Skoupy S, Rohrer C, Hagen W, Putteringer H, et al. Effect of glutamate carboxypeptidase II and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1314-1319.
- 174.Stanislawski-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, Kealey C, Young IS, et al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 2009;73(Pt 5):484-491.
- 175.Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(10):3832-3834.
- 176.Wang L, Chen W, Wang J, Tan Y, Zhou Y, Ding W, et al. Reduced folate carrier gene G80A polymorphism is associated with an increased risk of gastroesophageal cancers in a Chinese population. *Eur J Cancer* 2006;42(18):3206-3211.
- 177.Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 2002;108(1):1-6.
- 178.Vieira AR, Murray JC, Trembath D, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, et al. Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A* 2005;135(2):220-223.
- 179.Shang Y, Zhao H, Niu B, Li WI, Zhou R, Zhang T, et al. Correlation of polymorphism of MTHFRs and RFC-1 genes with neural tube defects in China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82(1):3-7.
- 180.Davies SM, Borowitz MJ, Rosner GL, Ritz K, Devidas M, Winick N, et al. Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008;111(6):2984-2990.
- 181.Christensen,K., Rozen,R. Genetic Variation. Effect on Folate Metabolism and Health. In: Bailey LB, editor. *Folate in Health and Disease*. Second edition ed. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group; 2010. p. 75.

182. Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs1051266. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1051266](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1051266). Consultado 11/30/2012, 2012.
183. Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Yang W, Finnell RH. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *Am J Epidemiol* 2003;158(8):747-752.
184. Zhang G, Zhang QY, Miao XP, Lin DX, Lu YY. Polymorphisms and mutations of the folate receptor-alpha gene and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Mol Med* 2005;15(4):627-632.
185. Bottiger AK, Hagnelius NO, Nilsson TK. Mutations in exons 2 and 3 of the FOLR1 gene in demented and non-demented elderly subjects. *Int J Mol Med* 2007;20(5):653-662.
186. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10(1):111-113.
187. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6(4):359-365.
188. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(26):14853-14858.
189. van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP, Trijbels FJ, Eskes TK, Mariman EC, et al. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med (Berl)* 1996;74(11):691-694.
190. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93(1):7-9.
191. Davis SR, Quinlivan EP, Shelnut KP, Maneval DR, Ghandour H, Capdevila A, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism and dietary folate restriction affect plasma one-carbon metabolites and red blood cell folate concentrations and distribution in women. *J Nutr* 2005;135(5):1040-1044.
192. Hustad S, Midttun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet* 2007;80(5):846-855.

193. Yang QH, Botto LD, Gallagher M, Friedman JM, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr* 2008;88(1):232-246.
194. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40(8):619-625.
195. Guillen M, Corella D, Portoles O, Gonzalez JI, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17(3):255-261.
196. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58(1):35-41.
197. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997;95(8):2032-2036.
198. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, et al. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288(16):2023-2031.
199. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346(8982):1070-1071.
200. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, et al. 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996;63(4):610-614.
201. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84(2):151-157.
202. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet* 1997;34(6):525-526.

203. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002;62(15):4519-4524.
204. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004;41(6):454-458.
205. de Bree A, Verschuren WM, Bjorke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003;77(3):687-693.
206. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62(5):1044-1051.
207. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57(6):835-840.
208. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003;103(2):200-207.
209. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, et al. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med (Berl)* 2001;79(9):522-528.
210. Parle-McDermott A, Mills JL, Molloy AM, Carroll N, Kirke PN, Cox C, et al. The MTHFR 1298CC and 677TT genotypes have opposite associations with red cell folate levels. *Mol Genet Metab* 2006;88(3):290-294.
211. Hum DW, MacKenzie RE. Expression of active domains of a human folate-dependent trifunctional enzyme in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 1991;4(4):493-500.
212. Hol FA, van der Put NM, Geurds MP, Heil SG, Trijbels FJ, Hamel BC, et al. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin Genet* 1998;53(2):119-125.

- 213.Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, Michaud J, Bigras JL, Richter A, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Hum Mutat* 2009;30(2):212-220.
- 214.Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, et al. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am J Hum Genet* 2002;71(5):1207-1215.
- 215.De Marco P, Merello E, Calevo MG, Mascelli S, Raso A, Cama A, et al. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *J Hum Genet* 2006;51(2):98-103.
- 216.Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, Troendle J, Mills JL, Kirke PN, et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet* 2009;125(3):247-256.
- 217.Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 2001;276(38):35558-35563.
- 218.Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;159(5):423-443.
- 219.Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 2002;41(45):13378-13385.
- 220.Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, et al. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur J Hum Genet* 2003;11(9):671-678.
- 221.Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis* 2003;168(2):315-322.
- 222.van der Linden IJ, den Heijer M, Afman LA, Gellekink H, Vermeulen SH, Kluijtmans LA, et al. The methionine synthase reductase 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida. *J Mol Med (Berl)* 2006;84(12):1047-1054.

223. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157(2):451-456.
224. Gos M, Sliwerska E, Szepecht-Potocka A. Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory genes in Polish families with neural tube defects. *J Appl Genet* 2004;45(3):363-368.
225. O'Leary VB, Mills JL, Pangilinan F, Kirke PN, Cox C, Conley M, et al. Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. *Mol Genet Metab* 2005;85(3):220-227.
226. Johnson WG, Stenroos ES, Spychala JR, Chatkupt S, Ming SX, Buyske S. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet A* 2004;124A(4):339-345.
227. Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJ, den Heijer M. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur J Hum Genet* 2007;15(1):103-109.
228. van der Linden IJ, Nguyen U, Heil SG, Franke B, Vloet S, Gellekink H, et al. Variation and expression of dihydrofolate reductase (DHFR) in relation to spina bifida. *Mol Genet Metab* 2007;91(1):98-103.
229. Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Gibney ER, Troendle J, et al. The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *Am J Med Genet A* 2007;143A(11):1174-1180.
230. Chanarin I, Rothman D, Ward A, Perry J. Folate status and requirement in pregnancy. *Br Med J* 1968;2(5602):390-394.
231. Hall MH, Pirani BB, Campbell D. The cause of the fall in serum folate in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83(2):132-136.
232. Bates CJ, Fuller NJ, Prentice AM. Folate status during pregnancy and lactation in a West African rural community. *Hum Nutr Clin Nutr* 1986;40(1):3-13.
233. Qvist I, Abdulla M, Jagerstad M, Svensson S. Iron, zinc and folate status during pregnancy and two months after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65(1):15-22.
234. Bruinse HW, van den Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61(1):31-37.

- 235.Caudill MA, Gregory JF, Hutson AD, Bailey LB. Folate catabolism in pregnant and nonpregnant women with controlled folate intakes. *J Nutr* 1998;128(2):204-208.
- 236.Gregory JF,3rd, Caudill MA, Opalko FJ, Bailey LB. Kinetics of folate turnover in pregnant women (second trimester) and nonpregnant controls during folic acid supplementation: stable-isotopic labeling of plasma folate, urinary folate and folate catabolites shows subtle effects of pregnancy on turnover of folate pools. *J Nutr* 2001;131(7):1928-1937.
- 237.Landon MJ, Hytten FE. The excretion of folate in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1971;78(9):769-775.
- 238.Fleming AF. Urinary excretion of folate in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1972;79(10):916-920.
- 239.Bruinse HW, van der Berg H, Haspels AA. Maternal serum folacin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1985;20(3):153-158.
- 240.McPartlin J, Halligan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet* 1993;341(8838):148-149.
- 241.Higgins JR, Quinlivan EP, McPartlin J, Scott JM, Weir DG, Darling MR. The relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy. *BJOG* 2000;107(9):1149-1154.
- 242.CHANARIN I, MACGIBBON BM, O'SULLIVAN WJ, MOLLIN DL. Folic-acid deficiency in pregnancy. The pathogenesis of megaloblastic anaemia of pregnancy. *Lancet* 1959;2(7104):634-639.
- 243.Landon MJ, Hytten FE. Plasma folate levels following an oral load of folic acid during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1972;79(7):577-583.
- 244.Spanish Society of Gynaecology and Obstetrics (SEGO) and Spanish National Health System. Recomendaciones sobre la suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;25:66-67.
- 245.McNulty B, McNulty H, Marshall B, Ward M, Molloy AM, Scott JM, et al. Impact of continuing folic acid after the first trimester of pregnancy: findings of a randomized trial of Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters. *Am J Clin Nutr* 2013;98(1):92-98.
- 246.Smith AM, Picciano MF, Deering RH. Folate supplementation during lactation: maternal folate status, human milk folate content, and their relationship to infant folate status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2(4):622-628.



247. Mitchell LE, Duffy DL, Duffy P, Bellingham G, Martin NG. Genetic effects on variation in red-blood-cell folate in adults: implications for the familial aggregation of neural tube defects. *Am J Hum Genet* 1997;60(2):433-438.
248. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349(9065):1591-1593.
249. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):13217-13220.
250. Martinez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdez-Leal R, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Limon-Benavides C, et al. Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 2001;32(4):277-282.
251. Ubeda N, Reyes L, Gonzalez-Medina A, Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras G. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: a longitudinal study in Spain. *Nutrition* 2011;27(9):925-930.
252. Amigou A, Rudant J, Orsi L, Goujon-Bellec S, Leverger G, Baruchel A, et al. Folic acid supplementation, MTHFR and MTRR polymorphisms, and the risk of childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 2012;23(8):1265-1277.
253. Steenweg-de Graaff J, Roza SJ, Steegers EA, Hofman A, Verhulst FC, Jaddoe VW, et al. Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr* 2012;95(6):1413-1421.
254. Weiner AS, Gordeeva LA, Voronina EN, Boyarskikh UA, Shabaldin AV, Filipenko ML. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of having an offspring with congenital anomalies in the West Siberian region of Russia: a case-control study. *Prenat Diagn* 2012;32(11):1041-1048.
255. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M, et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr* 2012;142(5):886-893.
256. Devlin AM, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Rozen R, Lentz SR. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood* 2004;103(7):2624-2629.

257. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):13217-13220.
258. Holmes VA, Wallace JM, Alexander HD, Gilmore WS, Bradbury I, Ward M, et al. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin Chem* 2005;51(3):629-634.
259. Wallace JM, Bonham MP, Strain J, Duffy EM, Robson PJ, Ward M, et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development Study. *Am J Clin Nutr* 2008;87(2):391-397.
260. Rule AD, Larson TS, Bergstralh EJ, Slezak JM, Jacobsen SJ, Cosio FG. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004;141(12):929-937.
261. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Disponible en: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>. Consultado 10/29/2012, 2012.
262. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. La medición de la clase social en ciencias de la salud. Barcelona: SG Editores; 1995.
263. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3-32.
264. Bevitel. Assessment of nutritional status by vitamin markers. Disponible en: <http://www.bevital.no/>. Consultado Febrero, 2013.
265. Ueland PM, Midttun O, Windelberg A, Svoldal A, Skalevik R, Hustad S. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(12):1737-1745.
266. Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. *J Clin Pathol* 1991;44(7):592-595.
267. Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM. High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50(2):391-402.
268. Miller JW, Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is

- more pronounced in older adults with elevated plasma folate. *Am J Clin Nutr* 2009;90(6):1586-1592.
- 269.Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, (SEGO). Recomendaciones sobre la suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;25:66.
- 270.Knol MJ, Pestman WR, Grobbee DE. The (mis)use of overlap of confidence intervals to assess effect modification. *Eur J Epidemiol* 2011;26(4):253-254.
- 271.Serra-Majem L, Ribas-Barba L, Salvador G, Serra J, Castell C, Cabezas C, et al. Compliance with dietary guidelines in the Catalan population: basis for a nutrition policy at the regional level (the PAAS strategy). *Public Health Nutr* 2007;10(11A):1406-1414.
- 272.Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006;136(6 Suppl):1731S-1740S.
- 273.Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, et al. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994;40(6):873-881.
- 274.Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270(22):2693-2698.
- 275.Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999;69(3):482-489.
- 276.Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001;73(3):613-621.
- 277.Brouwer DA, Welten HT, Reijngoud DJ, van Doormaal JJ, Muskiet FA. Plasma folic acid cutoff value, derived from its relationship with homocyst(e)ine. *Clin Chem* 1998;44(7):1545-1550.
- 278.Zhang G, Zhang QY, Miao XP, Lin DX, Lu YY. Polymorphisms and mutations of the folate receptor-alpha gene and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Mol Med* 2005;15(4):627-632.
- 279.DeVos L, Chanson A, Liu Z, Ciappio ED, Parnell LD, Mason JB, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr* 2008;88(4):1149-1158.

- 280.Pavlikova M, Sokolova J, Janosikova B, Melenovska P, Krupkova L, Zvarova J, et al. Rare allelic variants determine folate status in an unsupplemented European population. *J Nutr* 2012;142(8):1403-1409.
- 281.Fodinger M, Dierkes J, Skoupy S, Rohrer C, Hagen W, Puttinger H, et al. Effect of glutamate carboxypeptidase II and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1314-1319.
- 282.Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marcon F, Rossi S, Caiola S, et al. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis* 2003;24(6):1097-1103.
- 283.Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr* 2008;138(12):2323-2327.
- 284.Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. *Clin Chem* 1998;44(1):186-188.
- 285.Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):835-841.
- 286.Ulvik A, Ebbing M, Hustad S, Midttun O, Nygard O, Vollset SE, et al. Long- and short-term effects of tobacco smoking on circulating concentrations of B vitamins. *Clin Chem* 2010;56(5):755-763.
- 287.Sundquist J, Johansson SE. The influence of socioeconomic status, ethnicity and lifestyle on body mass index in a longitudinal study. *Int J Epidemiol* 1998;27(1):57-63.
- 288.Yu SM, Keppel KG, Singh GK, Kessel W. Preconceptional and prenatal multivitamin-mineral supplement use in the 1988 National Maternal and Infant Health Survey. *Am J Public Health* 1996;86(2):240-242.
- 289.Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of vitamins containing folic acid among women of childbearing age--United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53(36):847-850.
- 290.Relton CL, Hammal DM, Rankin J, Parker L. Folic acid supplementation and social deprivation. *Public Health Nutr* 2005;8(3):338-340.

291. Rees G, Brooke Z, Doyle W, Costeloe K. The nutritional status of women in the first trimester of pregnancy attending an inner-city antenatal department in the UK. *J R Soc Promot Health* 2005;125(5):232-238.
292. Colapinto CK, O'Connor DL, Dubois L, Tremblay MS. Folic acid supplement use is the most significant predictor of folate concentrations in Canadian women of childbearing age. *Appl Physiol Nutr Metab* 2012;37(2):284-292.
293. Sullivan KM, Ford ES, Azrak MF, Mokdad AH. Multivitamin use in pregnant and nonpregnant women: results from the Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Public Health Rep* 2009;124(3):384-390.
294. Branum AM, Bailey R, Singer BJ. Dietary supplement use and folate status during pregnancy in the United States. *J Nutr* 2013;143(4):486-492.
295. Haste FM, Brooke OG, Anderson HR, Bland JM, Shaw A, Griffin J, et al. Nutrient intakes during pregnancy: observations on the influence of smoking and social class. *Am J Clin Nutr* 1990;51(1):29-36.
296. West AA, Yan J, Perry CA, Jiang X, Malysheva OV, Caudill MA. Folate-status response to a controlled folate intake in nonpregnant, pregnant, and lactating women. *Am J Clin Nutr* 2012;96(4):789-800.
297. Velzing-Aarts FV, Holm PI, Fokkema MR, van der Dijs FP, Ueland PM, Muskiet FA. Plasma choline and betaine and their relation to plasma homocysteine in normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2005;81(6):1383-1389.
298. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002;76(3):614-619.
299. Brattstrom L. Pregnancy-related decrease in total plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2003;77(4):993; author reply 993-4.
300. Abstracts of the 4th International Conference on Homocysteine Metabolism. Basel, Switzerland, June 29-July 3, 2003. *J Inherit Metab Dis* 2003;26 Suppl 1:1-136.
301. Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 2001;85(1):49-58.
302. Vandevijvere S, Amsalkhir S, Van Oyen H, Moreno-Reyes R. Determinants of folate status in pregnant women: results from a national cross-sectional survey in Belgium. *Eur J Clin Nutr* 2012;66(10):1172-1177.

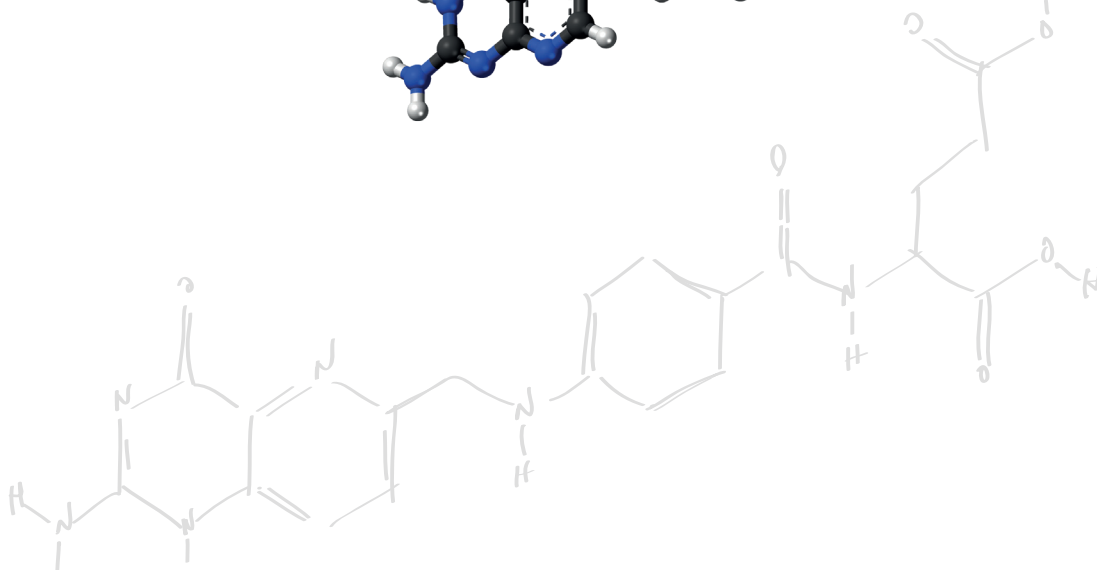
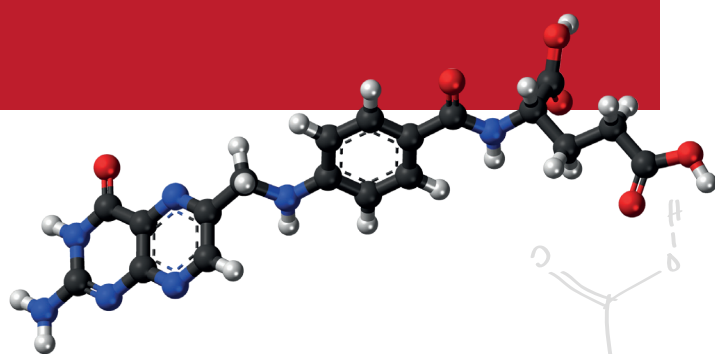
- 303.Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia ( $\geq 40$  micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996;98(9):2174-2183.
- 304.Zittoun J, Tonetti C, Bories D, Pignon JM, Tulliez M. Plasma homocysteine levels related to interactions between folate status and methylenetetrahydrofolate reductase: a study in 52 healthy subjects. *Metabolism* 1998;47(11):1413-1418.
- 305.Kauwell GP, Wilsky CE, Cerda JJ, Herrlinger-Garcia K, Hutson AD, Theriaque DW, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C-->T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism* 2000;49(11):1440-1443.
- 306.Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998;128(8):1336-1341.
- 307.Anderson CA, Beresford SA, McLerran D, Lampe JW, Deeb S, Feng Z, et al. Response of serum and red blood cell folate concentrations to folic acid supplementation depends on methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype: results from a crossover trial. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(4):637-644.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014



# APORTACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

## **Publicaciones**

**Olalla Bueno**, Anne M Molloy, Joan D Fernandez-Ballart, John M Scott, Per Magne Ueland, Bevital SNP platform, Michelle M Murphy. The combined effects of common polymorphisms affecting folate metabolism potentiate the risks of low folate status associated with individual polymorphisms alone. *Revisión intercolaborativa finalizada. En fase final previa la envío a la revista Molecular Nutrition & Food Research.*

## **Congresos**

Judith Salat-Batlle, Pere Cavallé-Busquets, Mónica Ballesteros, Joan Fernández-Ballart, **Olalla Bueno**, Sílvia Fernández-Roig, Per Magne Ueland, Klaus Meyer, Oivind Midttun, Åse Fredriksen, Michelle Murphy. Pregnancy cobalamin status is impaired in the presence of the *MTRR* 524C>T polymorphism but not the *TCII* 776C>G polymorphism. 8th International Conference on Homocysteine. Lisbon (Portugal). 2011.

**Olalla Bueno**, Michelle Murphy, John Scott, Anne Molloy, Per Magne Ueland, Åse Fredriksen, Klaus Meyer, Joan Fernandez-Ballart. *DHFR* 19del/del, *MTHFD1* 105CC and *RFC1* 80AA genotypes enhance the risk of folate deficiency associated with the *MTHFR* 677TT genotype in an unfortified Spanish population and sub-group of fertile women. 8th International Conference on Homocysteine. Lisbon (Portugal). 2011.

Murphy M, Garcia-Minguillan CJ, Cavallé-Busquets P, Fernández-Roig S, **Bueno O**, Ueland PM, et al. Low riboflavin (B2) status is associated with higher homocysteine during pregnancy and is a risk factor for gestational hypertension in a longitudinal study. FASEB-SRC – Folic acid, cobalamin and one carbon metabolism. Crete (Greece). 2012.

**Olalla Bueno**, Pere Cavallé-Busquets, Joan D Fernandez-Ballart, Monica Ballesteros, Maria Isabel Berrocal-Zaragoza, Judith Salat-Batlle, Silvia Fernández-Roig, Carlos J Garcia-Minguillan, Pol Solé Navais, Michelle M Murphy. Long term pregnancy plasma and red cell folate response to first trimester folic acid supplementation. World Forum for Nutrition Research Conference. Reus (Spain). 2013.

García-Minguillán CJ, Fernandez-Ballart JD, Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, **Bueno O**, Berrocal-Zaragoza MI, Solé P, Meyer K, Ueland PM and Murphy MM. The Effects of the *MTRR* 66 A>G

and *MTRR* 524 C>T Polymorphisms on Homocysteine During Pregnancy Vary Depending on Riboflavin and Cobalamin Status. 9<sup>th</sup> International Conference on Homocysteine and One Carbon Metabolism. Dublin (Ireland). 2013.

**Olalla Bueno**, Pere Cavallé-Busquets, Joan D Fernandez-Ballart, Monica Ballesteros, Maria Isabel Berrocal-Zaragoza, Judith Salat-Batlle, Silvia Fernàndez-Roig, Carlos J Garcia-Minguillan, Pol Solé Navais, Michelle M Murphy. First trimester folic acid supplementation enhances folate status throughout pregnancy and reduces the effect of the *MTHFR* 677C>T polymorphism. IUNS 20<sup>th</sup> International Congress of Nutrition. Granada (Spain). 2013.

Carlos J Garcia-Minguillan, Pere Cavallé-Busquets, Joan D Fernandez-Ballart, Monica Ballesteros, Maria Isabel Berrocal-Zaragoza, **Olalla Bueno**, Pol Solé Navais, Michelle M Murphy. Riboflavin status is inversely associated with homocysteine and determines the effect of the *MTHFR* 677C>T polymorphism on homocysteine during pregnancy. **IUNS 20<sup>th</sup> International Congress of Nutrition. Granada (Spain). 2013.**

### **Participación en proyectos**

Contribució de la capacitat de metilació materna y paterna a la funció vascular placentària i el desenvolupament fetal. **Funding:** Instituto de Salud Carlos III-FIS. **Ref:** 10/00335. **Duration:** 2011-2014. **PI:** Dra. Michelle Murphy.

### **Grupos de investigación reconocidos y financiados**

**CiberOBN.** Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03). **Center:** Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili. **Funding:** Instituto de Salud Carlos III. **Ref:** CB07/03/2004. **Duration:** from 2009. **PI:** Dr. Jordi Salas-Salvadó.

**NUTRCRSM.** Nutrició, Alimentació, Creixement i Salut Mental. Member of Consolidated Research Group – Generalitat de Catalunya (File 2009/SGR/1237). **Center:** Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili. **Duration:** 2009-2013. **PI:** Dr. Jordi Salas-Salvadó.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

REGULACIÓN GENÉTICO-NUTRICIONAL DEL ESTADO EN FOLATOS EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO EXPUESTA A ÁCIDO FÓLICO  
PROFILÁCTICO Y DURANTE EL EMBARAZO

Olalla Bueno Fraile

Dipòsit Legal: T. 78-2014