



**FACTORS METABÒLICS I GENÈTICS EN LA REGULACIÓ DE L'ESTAT EN
COBALAMINA, EN LA POBLACIÓ ADULTA I DURANT L'EMBARÀS**
Judith Salat Batlle

Dipòsit Legal: T. 286-2012

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 al contenido de esta tesis doctoral y su utilización ha de respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para la 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 otras utilizaciones se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos habrá que 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 finalidades de lucro ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDX. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDX (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto a los contenidos de la tesis como a sus resúmenes o índices.

Judith Salat Batlle

**FACTORS METABÒLICS I
GENÈTICS EN LA REGULACIÓ DE
L'ESTAT EN COBALAMINA, EN LA
POBLACIÓ ADULTA I DURANT
L'EMBARÀS**

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Michelle Murphy

Departament
de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Reus
2012



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
C/ Sant Llorenç, 21
43203 Reus
Tel. 977759305
Fax. 977759322

Michelle M. Murphy, professor agregat del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

FA CONSTAR:

Que el present treball, titulat "Factors metabòlics i genètics en la regulació de l'estat en cobalamina, en la població adulta i durant l'embaràs", que presenta la Judith Salat Batlle per l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat i que apleix els requeriments per poder optar a aquest títol.

Reus, 13 de gener de 2012

***"La posibilidad de realizar un **sueño** es lo que hace
que la **vida** sea interesante"***

Paulo Coelho

AGRAÏMENTS

A totes i a tots els que heu fet, en algun moment, aquest camí al meu costat. No us podré agrair prou la confiança que heu dipositat en mi, la manera com m'heu recolzat en els moments difícils i com heu aconseguit treure'm un somriure amb unes paraules, una abraçada o una simple mirada de complicitat.

Primer, agrair als quatre eixos amb els que es van fer els fonaments d'aquesta tesi.

A la meva directora de tesi, la Dra. Michelle Murphy per confiar-me un petit tresor com és l'estudi NutCIR perquè el portés a Tarragona. Per ensenyar-me com n'és d'important la constància en el treball, el ser minuciós i l'aprendre a espavilar-te i a buscar recursos per tu mateix.

Al Prof. Joan Fernàndez, per estar disposat a ajudar en tot moment i, per la paciència que sempre ha tingut per aconseguir adentrar-me en el món de l'estadística i el SPSS.

A la Dra. Maria Isabel Berrocal Zaragoza, perquè des del dia que la vaig conèixer, vaig entendre que estava entrant en un projecte molt especial.

Als participants i les pacients, sense la seva participació la nostra recerca no tindria sentit.

També agrair el finançament d'Italfarmaco i CICYT:SAF2005-05096.

A partir d'aquí comença el meu particular "tomb per la vida", per intentar donar les gràcies a les persones que han deixat petjada en el meu camí.

Al Llopart, per fer que la ciència passés a ser la meva vida.

A la Marian, per permetre que em sentís orgullosa de portar una bata blanca.

Al Narcís, la Teresa, la Tere i la Iolanda, per cuidar-me quan ja era fosc i tothom havia marxat.

Al Jordi B perquè sense dir-ho a ningú va fer que les llargues nits d'estudi tinguessin un altre sentit.

Al Pere perquè el disseny d'una coberta, les arts gràfiques i l'empatia poden ser el resultat feliç de set anys compartits.

A les meves gironines, i als companys que realment mai vam tenir però que eren part del pis. Per ser al meu costat en els moments difícils, escoltar-me i acompanyar-me quan tot es veia inacabable, gràcies per els *kinders* i les galetes sense gluten compartides, gràcies perquè en les nits que volia plorar em vàreu fer riure.

Al personal de Sant Joan de Déu per ensenyar-me el valor humà de 5 mL de sang, per formar-me i per ensenyar-me a no tenir por d'afrontar nous reptes.

A tot el servei de ginecologia i obstetrícia de l'Hospital Joan XXIII, encapçalat pel Dr. Miralles, als/a les zeladors/ores, a les auxiliars, a les infermeres, a les llevadores, a les residents i les ginecòlogues/òlegs, perquè durant dos anys vareu passar a ser la meva família, els meus amics, els meus confidents. A consulta, gràcies Montse per rebre'm cada dia amb un "*bon dia carinyo*". A sala de parts gràcies Dr. Albaigès i Dra. Ballesteros per permetre'm l'entrada a aquest món que tant m'ha fascinat. Al laboratori, al grup de recerca encapçalat pel Dr. Vendrell, gràcies Lluís i Carmen, perquè cada un de maneres diferents, m'heu donat un cop de mà i m'heu obert portes que sola no hagués aconseguit travessar.

A tot el personal del servei de ginecologia i obstetrícia de l'Hospital Sant Joan de Reus, encapçalat pel Dr. Cavallé-Busquets. Al Dr. Simó i a tots els membres del Laboratori Central. A la Dra. Vilella i a tot el seu equip del Biobanc. Sense la seva ajuda el NutCIR no hauria tan sols començat.

Al Dr. Ceruelo i la Dra. Ríos per la seva col·laboració des del CAP del Morell i Cambrils. Al Dr. Scott i la Dra. Molloy de Trinity College, per les determinacions microbiològiques de folats i cobalamina. Al Dr. Ueland de la Universitat de Bergen, per les determinacions als laboratoris de Bevitall de folats, cobalamina, àcid metilmalònic, cotinina i les determinacions genètiques.

Al relleu, l'Olalla, la Sílvia i el Carlos. Per considerar que a l'altre cantó de la porta tenien una companya amb qui parlar.

A la Gemma per ensenyar-me com donant molt poc pots rebre tant. A la Lolita per la seva inestimable companyia. A la Núria perquè l'amistat pot mostrar-se en un menjador amb una llarga bibliografia.

A la meva família, a la meva mare per la paciència i el suport incondicional en tots aquests anys, al meu pare per ensenyar-me que sempre es pot fer millor, als meus tiets, cosins i cosines perquè han aconseguit que sigui feliç de ser qui sóc i pel seu recolzament. Als meus avis que espero se sentin orgullosos de mi.

A la meva segona família de l'Arboç, per entendre els matins de feina, els dinars que no he pogut anar o dels que he marxat més d'hora, i per la il·lusió que han mostrat en el meu projecte, gràcies per fer-me sempre costat.

A la Marta perquè m'ha permès sentir què és tenir una germana i per ser un exemple de lluita i constància. Al Dani perquè durant dos anys, ja fos a altes hores de la matinada, Cap d'Any o Nadal, sempre estava a l'altre costat del telèfon.

Als Pastorets de l'Arboç, per ensenyar-me que els cops de pal poden ser una icona del companyerisme i de la feina ben feta. Al cos de dansa de l'Esbart Santa Tecla, per ensenyar-me que amb esforç tot acaba sortint natural, i que una abraçada pot aconseguir que ho vegis tot diferent.

Al Jaume, per el privilegi que fos ell qui m'ensenyés i em fes estimar la dansa. Perquè va confiar en mi i em va fer sentir una més. Sempre tindrè el teu record.

Al Jordi, per la comprensió que tantes vegades m'ha demostrat, per estimar-me com ho fa i per deixar que cada nit m'adormi agafada a la seva mà.

A les "meves mares NutCIRT", per deixar-me compartir una part tant important de la seva vida. Amb elles he viscut moments molt especials que ja formen part de mi i que mai podré oblidar.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

	Pàgina
ÍNDEX DE CONTINGUTS	11
ÍNDEX DE TAULES, FIGURES I GRÀFICS	14
ABREVIATURES	17
INTRODUCCIÓ GENERAL	20
1. Inici del descobriment de la cobalamina fins a la seva síntesi	21
2. Biodisponibilitat: la síntesi endògena, l'estructura química i les formes coenzimàtiques de la cobalamina	21
3. Funció coenzimàtica de la cobalamina	26
3.1.- Conversió de metilmalonil CoA a succinil CoA	26
3.2.- Conversió d'homocisteïna a metionina	27
4. Requeriments de cobalamina, fonts dietètiques i sintètiques	29
5. Procés d'absorció i transport de la cobalamina: haptocorrina, factor intrínsec i transcobalamina II	33
5.1.- Alliberació de la cobalamina dels aliments	33
5.2.- Unió de la cobalamina a l'haptocorrina	33
5.3.- Digestió de les haptocorrines per les proteases pancreàtiques i transferència de la cobalamina al FI	34
5.4.- Adhesió del complex cobalamina-FI al receptor específic en l'ili: cubilina-<i>amniolless</i>-megalina	35
5.5.- Endocitosi i unió intracel·lular a la transcobalamina II (TCII)	37
6. Marcadors bioquímics de l'estat en cobalamina	39
7. Tractaments en casos de deficiència	45
8. La cobalamina en la població	47
9. La cobalamina al llarg de l'embaràs	51
9.1.- Estat en cobalamina, infertilitat i complicacions en l'embaràs	62
10. Polimorfismes que afecten la intervenció de la cobalamina en el cicle de la metionina	67
10.1.- Polimorfismes del gen <i>TCII</i> 776C>G	67
10.2.- Polimorfismes del gen <i>MTHFR</i> 677C>T i 1298A>C	75
10.3.- Polimorfismes del gen <i>MTR</i> 2756A>G i del gen <i>MTRR</i> 66A>G i 524C>T	79
11. Interacció folat-cobalamina i polítiques de fortificació	83
11.1.- Interacció folat-cobalamina	83
11.2.- Àcid fòlic no metabolitzat	84
11.3.- Fortificació amb àcid fòlic	86
11.4.- Cofortificació àcid fòlic-cobalamina	88

	<i>Pàgina</i>
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	94
MATERIALS I MÈTODES	96
1. Estudi Poblacional	97
1.1.- Disseny de l'estudi i reclutament dels participants	97
1.2.- Recollida de les mostres sanguínies	98
1.3.- Processament de mostres i obtenció de les fraccions sanguínies	98
1.3.1.- Obtenció dels eritròcits rentats	99
1.3.2.- Obtenció dels leucòcits	99
1.3.3.- Extracció de l'ADN genòmic	99
1.4.- Determinacions bioquímiques i genètiques	100
2. Estudi d'embaràs: Estudi NutCIR	102
2.1.- Disseny de l'estudi i reclutament de les participants	102
2.2.- Recollida de les mostres sanguínies	105
2.3.- Determinacions bioquímiques i genètiques	106
ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI POBLACIONAL	108
RESULTATS DE L'ESTUDI POBLACIONAL	113
DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI POBLACIONAL	125
ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI NUTCIR	134
RESULTATS DE L'ESTUDI NUTCIR	141
DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI NUTCIR	171
APORTACIONS DE LA TESI	189
CONCLUSIONS	193
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	196
APORTACIONS CIENTÍFIQUES	245
ANNEXES	249

ÍNDEX DE TAULES, FIGURES I GRÀFICS

		Pàgina
TAULES		
Taula 1.	Fites essencials en la història del descobriment de la cobalamina fins arribar a la seva síntesi	22
Taula 2.	Quantitat de cobalamina absorbida d'una dosi oral de CNCbl en individus control	29
Taula 3.	Biodisponibilitat de la cobalamina ingerida en la dieta	30
Taula 4.	Recomanacions d'ingesta de cobalamina per la població espanyola i americana	32
Taula 5.	Comparació de l'ús individual de marcadors sèrics per al diagnòstic de la deficiència en cobalamina	44
Taula 6.	Estimació de la cobalamina necessària durant l'embaràs (40 setmanes) i en la lactància de 6 mesos i 1 any	53
Taula 7.	Estudis en què s'analitza la cobalamina plasmàtica durant l'embaràs	57
Taula 8.	Estudis en què s'analitza la cobalamina plasmàtica tant durant l'embaràs com en el nouat	60
Taula 9.	Estudis cas-control en què es compara l'estat en cobalamina matern entre casos d'embaràs afectat per DTN respecte embarassos sense complicacions	65
Taula 10.	Resultats d'estudis cas-control en què s'avalua el risc de DTN en associació amb indicadors d'estat en cobalamina matern	66
Taula 11.	Freqüències genotípiques de la <i>TCII 776C>G</i> dels estudis descriptius	72
Taula 12.	Freqüències genotípiques de la <i>TCII 776C>G</i> dels estudis cas-control	73
Taula 13.	Resum de qüestions per resoldre amb les aportacions de la tesi	92
Taula P1.	Característiques de la població segons els grups d'edat	114
Taula P2.	Indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats segons grup d'edat	115
Taula P3.	Estat en cobalamina i folats segons grup d'edat	116
Taula P4.	Freqüències de polimorfismes en gens implicats en la biodisponibilitat i transport de cobalamina i folats en la població	117
Taula P5.	Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució de factors ambientals i genètics a la variabilitat d'HoloTC i HoloTC/Cbl plasmàtiques	117
Taula P6.	Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors de l'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy	119
Taula P7.	Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors d'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy en les dones d'edat fèrtil	120
Taula P8.	Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors de l'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy en la gent gran	123
Taula P9.	Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors d'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy segons la combinació d'estat en cobalamina i estat en folats indicada	124
Taula E1.	Característiques de la població NutCIR	143
Taula E2.	Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó	144

	<i>Pàgina</i>
Taula E3. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó segons ús de suplementos prenatals	146
Taula E4. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó segons estat inicial en cobalamina	147
Taula E5. Freqüències de polimorfismes en gens implicats en la biodisponibilitat i transport de cobalamina i folats en gestants i nounats	148
Taula E6. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en folats durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme <i>MTHFR</i> 677C>T en gestants	150
Taula E7. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme <i>MTRR</i> 66A>G en gestants	151
Taula E8. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme <i>MTRR</i> 524C>T en gestants	152
Taula E9. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme <i>TCII</i> 776C>G en gestants	154
Taula E10. Factors associats amb els canvis en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina entre el primer i el tercer trimestre d'embaràs	159
Taula E11. Factors predictius de les fluctuacions de la tHcy al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó	160
Taula E12. Factors predictius de les fluctuacions de la tHcy al llarg de l'embaràs i al cordó en les gestants que inicien la gestació al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)	161
Taula E13. Factors predictius de les fluctuacions del MMA al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó	162
Taula E14. Factors predictius de les fluctuacions del MMA al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó en les gestants que inicien la gestació al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)	163
Taula E15. Factors predictius dels indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina al cordó	164
Taula E16. Factors de risc de creixement intrauterí retardat	165
Taula E17a. Factors de risc per un baix estat en cobalamina i HoloTC en diferents moments de l'embaràs	167
Taula E17b. Factors de risc per un elevat estat en MMA al final de l'embaràs	168
Taula E17c. Factors de risc per deficiència marginal en cobalamina o HoloTC al final de l'embaràs	169

FIGURES

Pàgina

Figura 1.	Distribució de la síntesi de cobalamina i l'ús entre els organismes vius	23
Figura 2.	Estructura de la cobalamina i els seus derivats	24
Figura 3.	Obtenció a nivell cel·lular dels derivats coenzimàtics de la cobalamina a partir de les seves formes metabòlicament inertes	25
Figura 4.	Tipus de funcions de la cobalamina com a coenzim	26
Figura 5.	Funció de la 5-desoxiadenosilcobalamina (AdoCbl) a nivell mitocondrial	27
Figura 6.	Funció de la metilcobalamina a nivell citosòlic	28
Figura 7.	Receptors ileals del complex cobalamina-FI	35
Figura 8.	Receptor ileals del complex cobalamina-FI. Format pel grup cubam (cubilina- <i>amnionless</i>) i la megalina	36
Figura 9.	Etapas del procés d'absorció i transport de la cobalamina	38
Figura 10.	Àcid metilmalònic i homocisteïna, marcadors per la deficiència en cobalamina	41
Figura 11.	Cicle metabòlic dels folats amb la seva interacció amb la cobalamina, la via del timidilat i el cicle de la metionina	84
Figura 12.	Comparació teòrica de la progressió de l'esgotament de la cobalamina, en situacions de pèrdua de factor intrínsec o de malabsorció de la cobalamina dels aliments	90
Figura 1M.	Reclutament de voluntaris per l'Estudi Poblacional	98
Figura 2M.	Reclutament de voluntàries per l'Estudi NutCIR	103
Figura 3M.	Disseny de l'estudi NutCIR	104

GRÀFICS

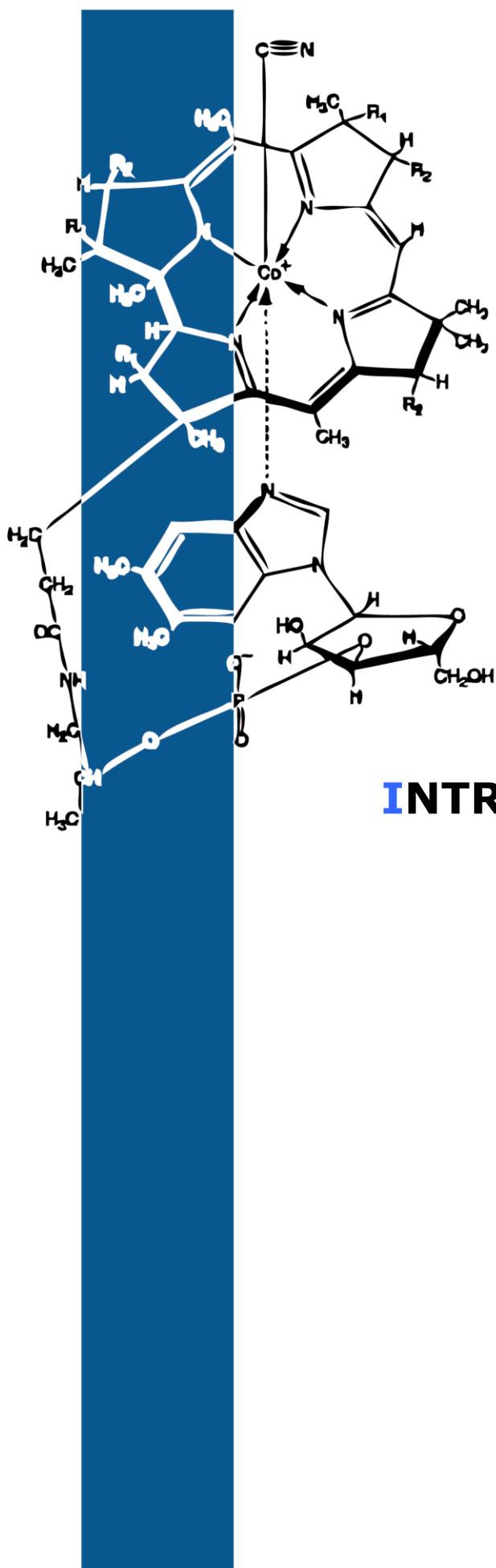
Pàgina

Gràfic E1.	Comparació de fluctuacions en MMA plasmàtic durant l'embaràs i al cordó segons el polimorfisme <i>MTRR</i> 524C>T en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica	153
Gràfic E2.	Comparació de fluctuacions en tHcy durant l'embaràs i al cordó segons el polimorfisme <i>TCII</i> 776C>G en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica	155
Gràfic E3.	Comparació de fluctuacions en MMA durant l'embaràs i al cordó de les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica segons l'estat en folats	170

ABREVIATURES MÉS UTILITZADES

Acrònim	Significat
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolat
5,10-MTHF	5,10-metilentetrahidrofolat
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AdoCbl	Adenosilcobalamina
ApoHC	Apohaptocorrina
ApoTC	Apotranscobalamina
ATRs	Adenosiltransferases
CIR	Creixement intrauterí retardat
CNCbl o vitamina B ₁₂	Cianocobalamina
Cubam	Cubilina- <i>amniotless</i>
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat-reductasa
DTN	Defectes del tub neural
EGOTAC	<i>Erythrocyte Glutamic-Oxaloacetic Transaminase Activation Coefficient</i>
EGRAC	<i>Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Coefficient</i>
ELISA	Tècnica d'enzimoimmunoassaig
FCE	Factor de creixement epitelial
FI	Factor intrínsec
HC	Haptocorrina
HoloHC	Holohaptocorrina
HoloTC	Holotranscobalamina
IDR	Ingesta diària recomanada
MeCbl	Metilcobalamina
MMA	Àcid metilmalònic
MS	Metionina-sintasa
MSR	Metionina-sintasa reductasa
MTHFR	Metilentetrahidrofolat-reductasa
NK	Cèl·lules "natural killer"
NutCIR	Nutrició i Creixement Intrauterí Retardat

Acrònim	Significat
OHCbl	Hidroxicobalamina
RIA	Radioimmunoassaig
SAH o AdoHcy	S-adenosilhomocisteïna
SAM o AdoMet	S-adenosilmetionina
SD	Síndrome de Down
TCII	Transcobalamina II
tHcy	Homocisteïna plasmàtica total en dejú
THF	Tetrahidrofolat



INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. INICI DEL DESCOBRIMENT DE LA COBALAMINA FINS A LA SEVA SÍNTESI

El 1824 Combe va descriure el cas d'un pacient amb una patologia molt peculiar: «Pacient feble, amb respiració accelerada en realitzar un mínim esforç, sequegat en la llengua, moviments i parla lèngüids, rebuig de l'estómac a gairebé tot tipus d'aliment, set constant i epidermis d'un color pàl·lid com un mort». Però no va ser fins que Addison va fer-ne la descripció anatomopatològica, que aquest tipus d'anèmia es va considerar com un quadre clínic diferenciat. Aquestes són les primeres descripcions detallades de les conseqüències de la deficiència d'una vitamina amb una de les estructures més complexes que existeixen, la cobalamina. Els seus requeriments fisiològics són baixos, però summament importants, a causa de les conseqüències fatals si la seva carència no és tractada. Biermer, el 1872, la va denominar anèmia *perniciosa* (*destrucció o mort violenta*) i la va definir com una malaltia incurable i progressiva, que, a més de l'afectació que presentava a nivell sanguini i digestiu, en fases avançades també danyava el sistema nerviós i arribava a causar una demència irreversible.

En el segle XX, les observacions a partir de tractaments amb ingesta de fetge i carn prèviament digerida amb suc gàstric d'individus sans, juntament amb la proposta de Castle d'un principi extrínsec antianèmic, van ser les diferents peces d'un trencaclosques complex que va acabar permetent la purificació i cristal·lització de la cobalamina. La seva descoberta i, sobretot, la possibilitat de sintetitzar-la químicament, treball realitzat per Woodward i un gran nombre de col·laboradors i que implicà més de 10 anys de treball, van obrir un nou camí en el tractament d'aquest tipus d'anèmia megaloblàstica i van fer que, actualment, el terme *perniciosa* no sigui més que un homenatge als seus descobridors (**Taula 1**).

2. BIODISPONIBILITAT: LA SÍNTESI ENDÒGENA, L'ESTRUCTURA QUÍMICA I LES FORMES COENZIMÀTIQUES DE LA COBALAMINA

La síntesi de cobalamina es limita a alguns bacteris i arqueus. Molts organismes, incloent-hi els humans i els protists, necessiten cobalamina però no la poden sintetitzar. Es creu que les plantes i els fongs ni sintetitzen ni utilitzen la cobalamina en el seu metabolisme; la presència de cobalamina en aquests organismes podria ser per la dificultat d'excloure la contaminació bacteriana en la mostra d'estudi¹ (**Figura 1**).

Taula 1. Fites essencials en la història del descobriment de la cobalamina fins arribar a la seva síntesi

1824-1855	Combe² i Addison³ : publiquen diverses descripcions de casos d'una misteriosa malaltia, caracteritzada per escassos glòbuls vermells i mida anormalment gran.
1860	Flint : observa que en aquests casos és freqüent una severa atròfia de l'estómac i relaciona la malaltia amb trastorns digestius ⁴ .
1872	Biermer : dona a la malaltia el nom d' <i>anèmia perniciosa</i> , patologia incurable i progressiva amb afectació a nivell sanguini i digestiu. En fases avançades, pot provocar danys al sistema nerviós, que poden ser causa d'una demència irreversible ⁵ .
1925	Whipple : arriba a la conclusió, experimentant al laboratori amb gossos als quals produïa anèmia per sagnia, que la ingesta de fetge era la manera que permetia reposar l'hemoglobina amb menys temps ⁶ .
1926	Minot i Murphy : clínicament, suggereixen la conveniència d'utilitzar la ingesta de fetge per intentar tractar els casos d'anèmia perniciosa. El resultat no va ser-ne només l'atenuació, sinó la recuperació absoluta dels pacients ⁷ .
1929	Castle : observa que la ingesta de carn, prèviament digerida amb suc gàstric d'individus sans, té beneficis equiparables a la ingesta de fetge en individus amb anèmia perniciosa. D'aquest fet en dedueix la necessitat d'un factor intrínsec, segregat al suc gàstric per les cèl·lules de l'estómac, que reaccionaria sobre la nova vitamina o factor extrínsec present en els aliments formant el principi antianèmic. L'alteració d'un dels dos factors o d'ambdós originaria l'anèmia perniciosa ⁸ .
1934	Whipple, Minot i Murphy : reben el premi Nobel de medicina i fisiologia pel seu treball en el tractament de l'anèmia perniciosa ⁹ .
1948	Rickes i Folkers¹⁰ : gairebé a la vegada que Lester Smith¹¹ , anuncien l'èxit en la purificació i cristal·lització de la vitamina B ₁₂ . Va rebre el nom de <i>vitamina B₁₂</i> abans de ser identificada, ja que mostrava propietats similars a les vitamines del grup B. Ells la van anomenar <i>cobalamina</i> , ja que, en cremar les seves mostres pures, en les cendres apareixien restes de cobalt ¹² .
1955	Dorothy Hodgkin : estableix l'estructura molecular de la cobalamina utilitzant cristal·lografia de raigs X ¹³ . El 1964 rep el premi Nobel de Química per la determinació d'importants substàncies biològiques ⁹ .
1965	Hall i Finkler : determinen que la cobalamina passa de l'intestí a la sang amb la transcobalamina II, però es redistribueix des del fetge tant en forma de transcobalamina II, com transcobalamina I ¹⁴ .
1972	Robert Woodward : amb l'ajuda d'un gran nombre de coinvestigadors i en més de 10 anys de treball, completa la síntesi química de la vitamina B ₁₂ ¹⁵ .

En la **Figura 1**, es mostren conclusions en la síntesi de cobalamina i el seu ús entre els organismes vius, però s'han documentat excepcions en algues i lleguminoses¹⁶⁻¹⁸.

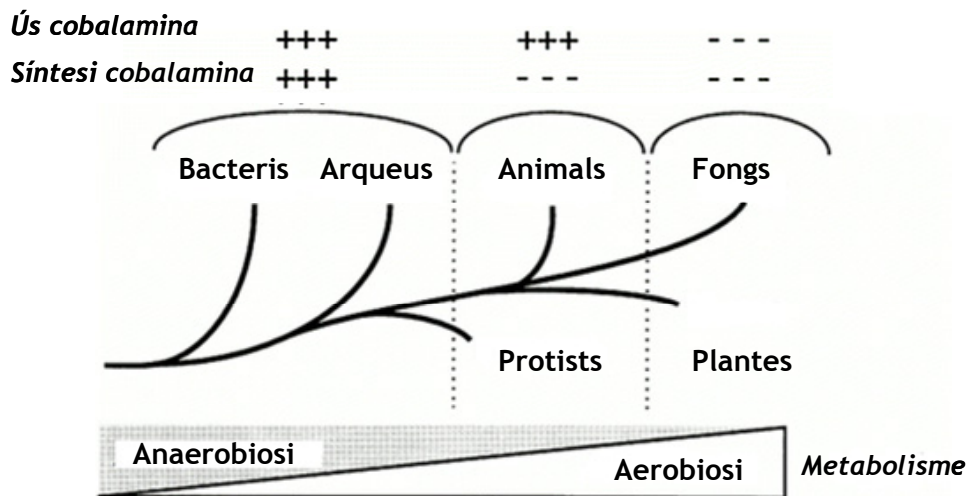


Figura 1. Distribució de la síntesi de cobalamina i l'ús entre els organismes vius¹

En la natura existeixen dues rutes de biosíntesi de la cobalamina: 1) ruta aeròbica, realitzada per organismes com *Pseudomonas denitrificans* i 2) ruta anaeròbica, investigada en organismes com *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium Shermanii* i *Salmonella typhimurium*¹⁹. La visió detallada de la síntesi de cobalamina per bacteris aerobis i anaerobis està fora de l'àmbit d'aquesta tesi, però hi ha literatura que tracta específicament aquest procés²⁰. A causa de la seva complexa naturalesa química, més de 30 gens són necessaris per a la biosíntesi de la cobalamina, cosa que equival al voltant de l'1% d'un genoma bacterià típic²¹. Els gens que codifiquen enzims que contribueixen a la biosíntesi aeròbica presenten el prefix *cob*, mentre que els gens involucrats en l'anaeròbia, normalment, porten el prefix *cbi*¹⁹.

El nucli de la cobalamina és un anell de corrina amb un àtom de cobalt en el centre. Aquest anell de corrina conté quatre unitats pirròliques. Dues (els anells A i D) estan unides directament, mentre que les altres estan enllaçades per ponts de metí. L'àtom de cobalt està unit als quatre nitrògens pirròlics. El cinquè substituent és un derivat del dimetilbenzimidazole que conté ribosa-3-fosfat i aminoisopropanol. Un dels àtoms de nitrogen del dimetilbenzimidazole s'uneix al cobalt. El grup amino de l'isopropanol enllaça en forma d'amida amb una cadena lateral. El sisè substituent de l'àtom de cobalt pot ser un grup ciano (cianocobalamina o vitamina B₁₂), hidroxil (hidroxicobalamina), metil (metilcobalamina) o 5'-desoxiadenosil (desoxiadenosilcobalamina, també anomenada adenosilcobalamina)²² (**Figura 2**).

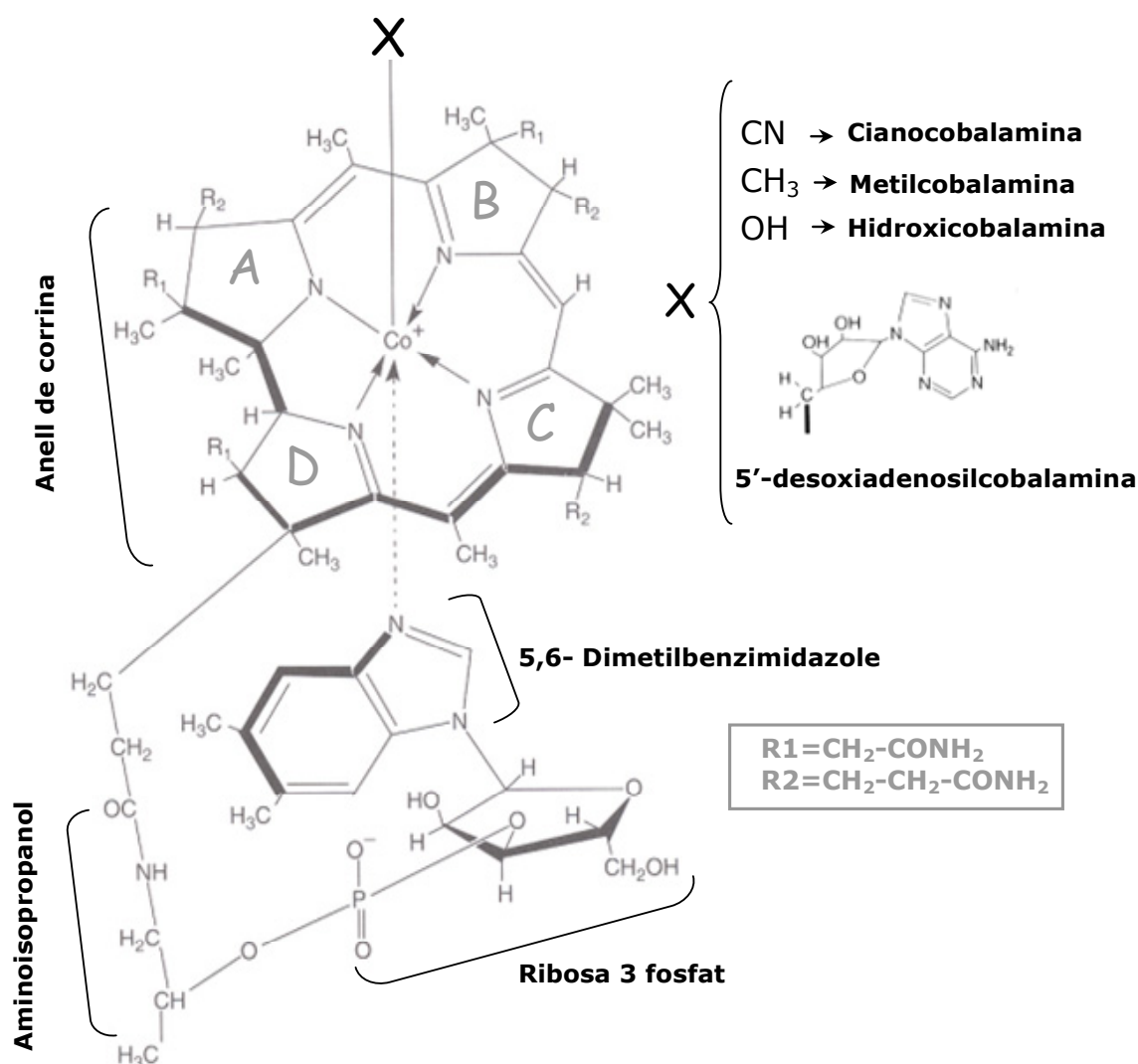


Figura 2. Estructura de la cobalamina i els seus derivats
(Modificació de Green R, 2007²³)

En la natura, la forma predominant és l'*adenosilcobalamina* (AdoCbl), que en els eucariotes es localitza, principalment, a nivell mitocondrial. Serveix com a cofactor per l'enzim metilmalonil-CoA mutasa. L'altra forma majoritària és la *metilcobalamina* (MeCbl), que és la forma predominant en el plasma humà i en el citosol. Serveix com a cofactor per l'enzim *metionina-sintasa* (MS). Tant AdoCbl com MeCbl, quan l'enllaç carboni-cobalt es veu afectat per l'exposició a la llum, es converteixen en hidroxicobalamina. A nivell cel·lular i tissular, s'han identificat altres formes de cobalamina com glutationilcobalamina, sulfitcobalamina i nitritcobalamina, però els seus papers fisiològics no són encara gaire clars²³.

Per a ser útils a nivell cel·lular, la *cianocobalamina* (CNCbl o vitamina B₁₂) i la *hidroxicobalamina* (OHCbl) han de convertir-se en AdoCbl i MeCbl, que són les dues formes metabòlicament actives o coenzims de la cobalamina.

En la CNCbl i OHCbl, l'estat d'oxidació de l'àtom de cobalt és Co³⁺ (cob(III)alamina), forma en la qual entra a les cèl·lules unida a la transcobalamina II (proteïna transportadora). Un cop dins, les reductases citosòliques actuen reduint el cobalt a Co²⁺ (cob(II)alamina). Durant aquesta reducció, els grups cianur i hidroxil són desplaçats del metall (cobalt). Part de la cob(II)alamina s'uneix, reduïda a Co¹⁺ (cob(I)alamina) per les reductases citosòliques, a la MS citosòlica i és metilada formant la MeCbl en la seva forma activa com a coenzim. La resta de les cob(II)alamines són reduïdes en el mitocondri per les reductases mitocondrials a cob(I)alamines, sobre les quals actuen *adenosiltransferases* (ATRs) per formar l'AdoCbl^{24,25} (**Figura 3**).

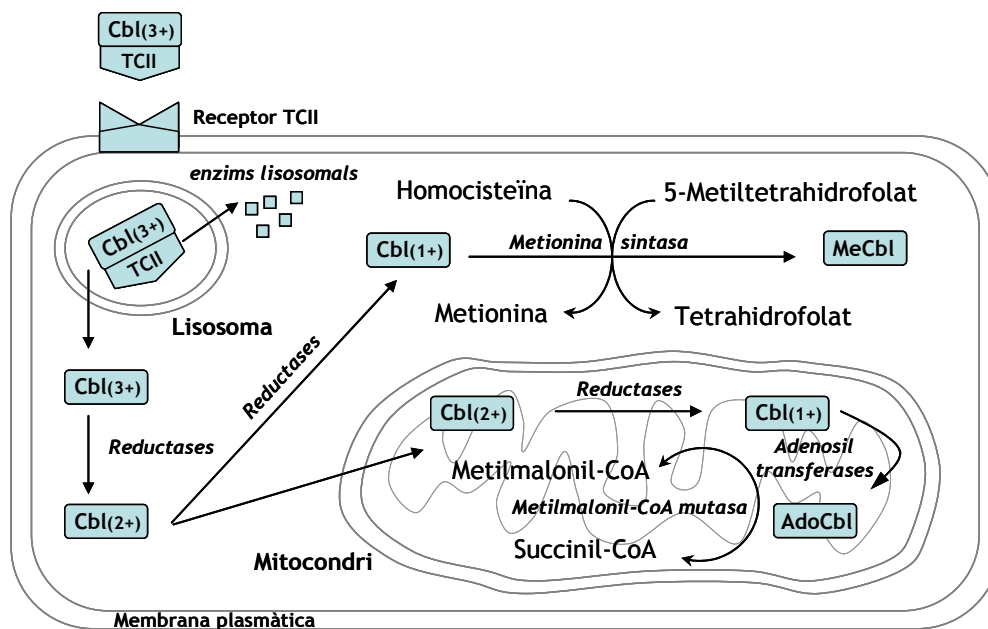


Figura 3. Obtenció a nivell cel·lular dels derivats coenzimàtics de la cobalamina a partir de les seves formes metabòlicament inertes (Modificació d'Andrès E, 2004²⁶)

3. FUNCIO COENZIMÀTICA DE LA COBALAMINA

En general, les funcions de la cobalamina com a coenzim són reordenaments intramoleculars, reducció de ribonucleòtids i transferència de grups metil (**Figura 4**). Però, més específicament, un cop dins la cèl·lula, la cobalamina participa com a cofactor en dues reaccions metabòliques importants, una a nivell mitocondrial, la conversió de metilmalonil CoA a succinil CoA, i l'altre a nivell citosòlic, la conversió d'homocisteïna a metionina.

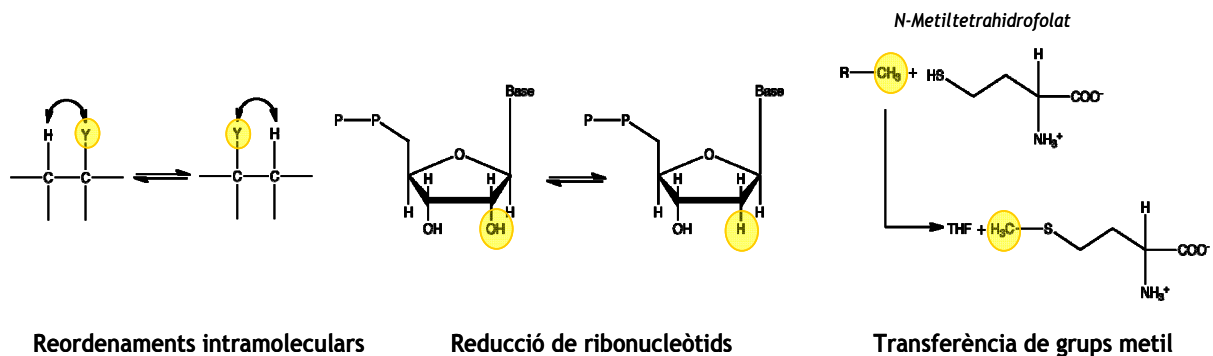


Figura 4. Tipus de funcions de la cobalamina com a coenzim²⁷

3.1.- Conversió de metilmalonil CoA a succinil CoA

En el mitocondri, l'AdoCbl és essencial per a la conversió de metilmalonil CoA a succinil CoA, reacció catalitzada per l'enzim metilmalonil CoA-mutasa^{28,29}. Aquest és un pas intermediari en l'obtenció de succinil CoA a partir de propionil CoA, fet que es dona en l'oxidació d'àcids grassos amb un nombre senar d'àtoms de carboni i de determinats aminoàcids: valina (Val), isoleucina (Ile), treonina (Thr) i metionina (Met). El succinil CoA pot entrar en el cicle de Krebs i, via piruvat, pot ser *glucogènic* (que promou la síntesi de glucosa) o bé, juntament amb la glicina, pot participar en la síntesi del grup hemo^{19,30} (**Figura 5**).

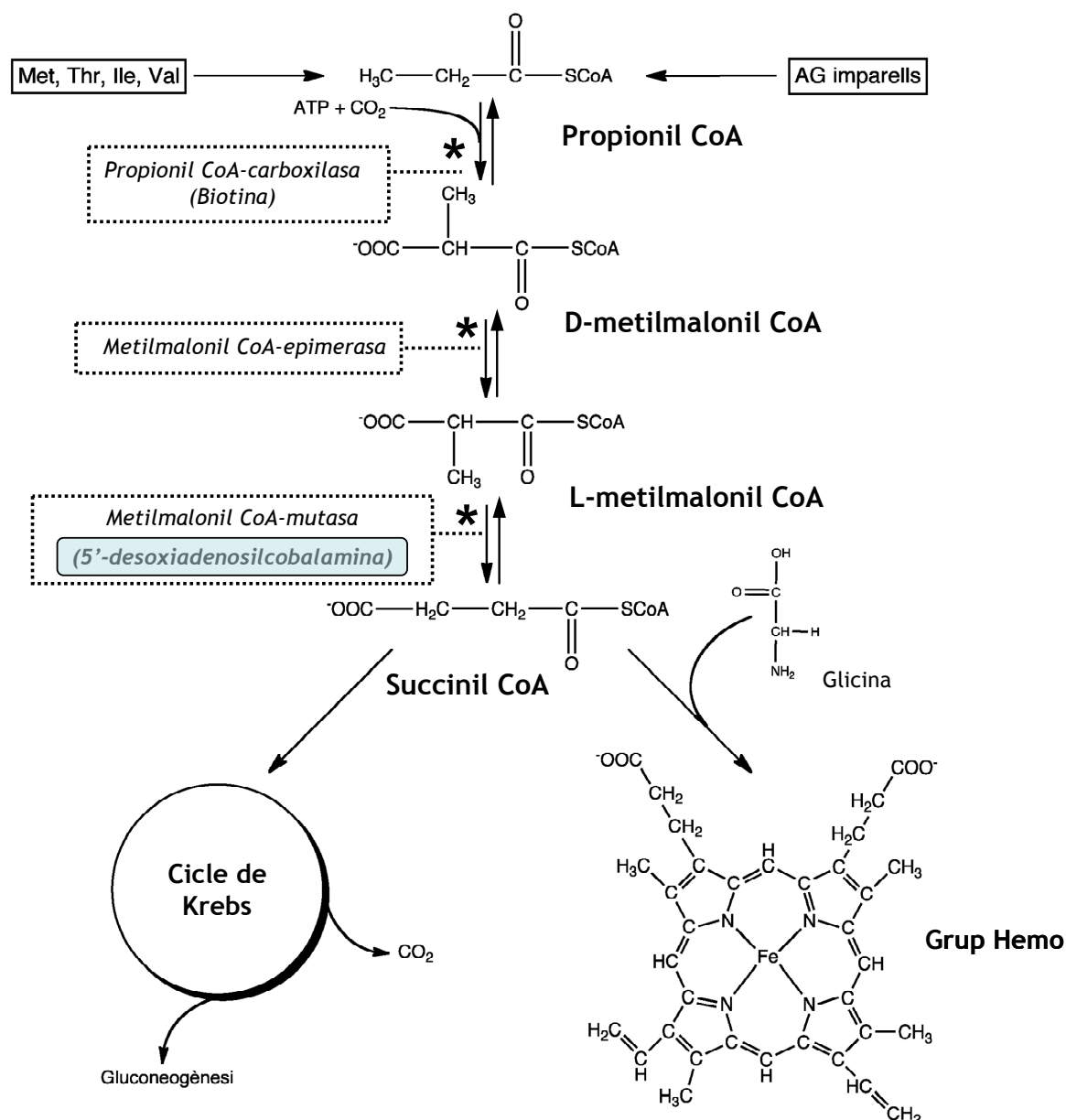


Figura 5. Funció de la 5-desoxiadensilcobalamina (AdoCbl) a nivell mitocondrial. Met, metionina; Thr, treonina; Ile, isoleucina; Val, valina; AG, àcids grassos; *punt d'actuació de l'enzim corresponent (Modificació de Kapadia CR, 1995²⁴)

3.2.- Conversió d'homocisteïna a metionina

En el citosol, la MeCbl és essencial per a l'acció de la MS, que catalitza la transferència d'un grup metil del 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) a l'homocisteïna (Hcy) formant la metionina³¹. Aquest és el punt de convergència entre el metabolisme de la cobalamina i dels folats. La metionina, a més de ser necessària per a la síntesi proteica, implicada en

la correcta estructuració de l'àcid desoxiribonucleic (ADN)³², és també una precursora clau pel manteniment de la capacitat de metilació a través de la síntesi de *S*-Adenosilmetionina (SAM) (vegeu l'apartat "Interaccions folat-cobalamina i polítiques de fortificació")^{33,34} (Figura 6).

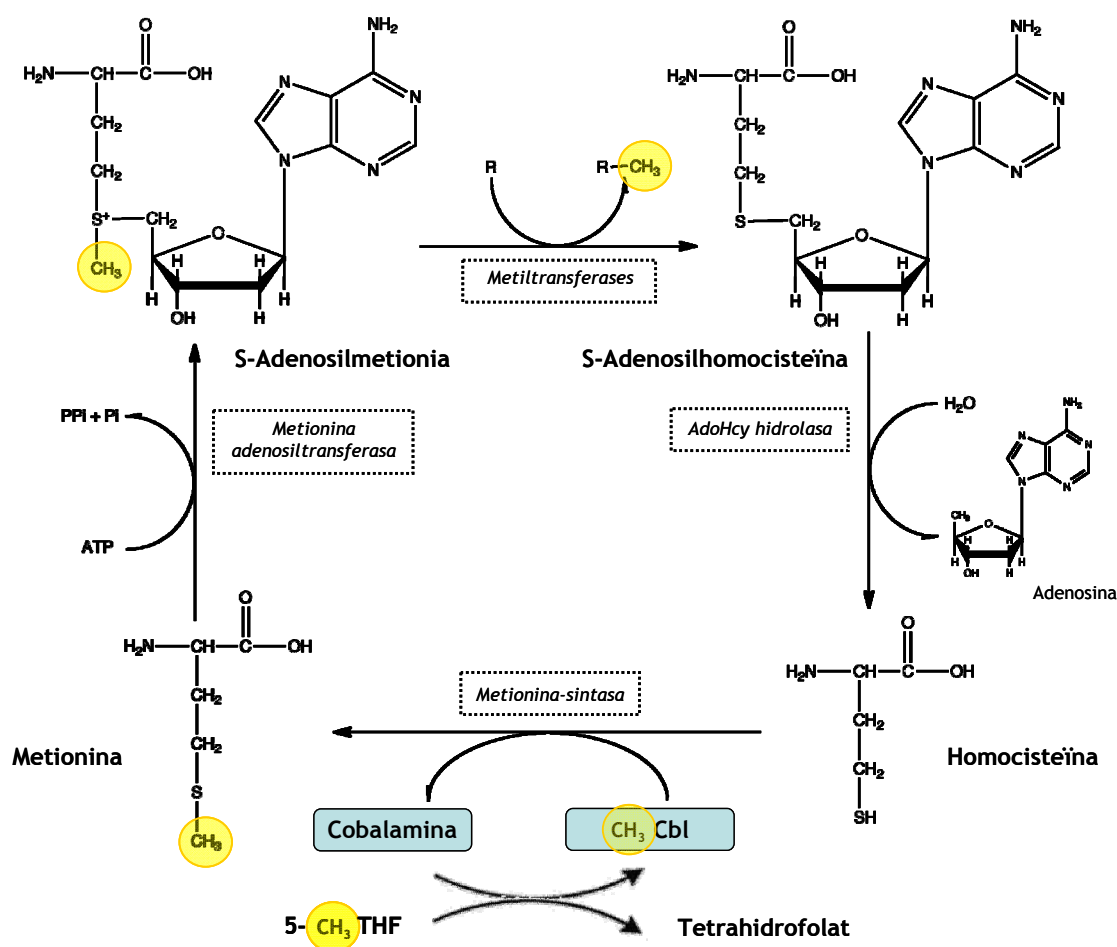


Figura 6. Funció de la metilcobalamina a nivell citosòlic. AdoHcy hidrolasa, adenosilhomocisteïna hidrolasa; CH₃Cbl, metilcobalamina; 5-CH₃THF, 5-metiltetrahidrofolat (Modificació de Thompson MD, 2009³⁵)

4. REQUERIMENTS DE COBALAMINA, FONTS DIETÈTIQUES I SINTÈTIQUES

La cobalamina és un nutrient essencial, a més de la suplementació o la fortificació d'alguns productes, l'única font dietètica és l'aliment d'origen animal. Tot i que és cert que la flora microbiana genera cobalamina, ho fa a l'intestí gros i no es pot aprofitar perquè l'absorció d'aquesta vitamina es dona a l'ili³⁶.

El percentatge de cobalamina absorbida disminueix a mesura que s'augmenta el seu consum (**Taula 2**), de manera que una ingesta de 0,1 µg, de CNCbl, en forma de suplement, correspon amb una mitjana del 77% d'absorció, 1,0 µg el 56% i amb 10 µg la mitjana d'absorció baixa al 16%. Quan es dona una ingesta ≥ 100 µg, l'eficiència en l'absorció baixa a l'1% i l'excés de vitamina s'excreta per l'orina³⁷.

Aquesta disminució d'absorció en augmentar la ingesta de cobalamina és conseqüència de que el sistema d'absorció intestinal, mitjançat pel *factor intrínsec* (FI), proteïna gàstrica que transporta la cobalamina, se satura al voltant de l'1,5-2,0 µg. Tot i això, un cop saturat el sistema, una petita quantitat de cobalamina pot ser absorbida per difusió passiva. Aquest fet es va comprovar en veure que pacients amb anèmia perniciosa també eren capaços d'absorbir cobalamina. L'anèmia perniciosa comporta deficiència en cobalamina, a causa d'una disminució o absència del FI, per atrofia de la mucosa gàstrica o per destrucció autoimmunitària de les cèl·lules parietals productores d'aquesta. En aquests pacients l'absorció de cobalamina és baixa, però es troba present sense FI, gràcies a la difusió passiva³⁸ (vegeu l'apartat "*Procés d'absorció i transport de la cobalamina: haptocorrina, factor intrínsec i transcobalamina II*").

Taula 2. Quantitat de cobalamina absorbida d'una dosi oral de CNCbl en individus control³⁷

Dosi oral de cobalamina µg	µg cobalamin absorbits	Mitjana d'absorció (%)	Rang d'absorció (%)
0,1	0,08	77	52-92
0,25	0,19	75	32-92
0,5	0,35	71	33-97
0,6	0,38	63	20-92
1,0	0,56	56	26-87
2,0	0,92	46	4-83
5,0	1,4	28	2-50
10,0	1,6	16	0-34
20,0	1,2	6	
50,5	1,5	3	

La cobalamina es troba present en carn vermella, pollastre i fetge, peix (incloent-hi el marisc), ous i productes làctics com la llet, els iogurts i el formatge. En la carn i el peix, es presenta majoritàriament en forma d'AdoCbl i OHCbl i, en els productes làctics i els ous, també n'és important la ingesta en forma de MeCbl³⁹. La biodisponibilitat no és igual en tots els aliments; així, doncs, l'objectiu de molts estudis ha estat calcular l'eficiència d'absorció de la cobalamina a partir de diferents queviures (**Taula 3**).

El marisc és un producte ric en cobalamina⁴⁰, però la diferència en la determinació de la cobalamina entre el mètode microbiològic i el de quimioluminescència, suggereix la presència d'anàlegs inactius de cobalamina que poden no ser biodisponibles en els humans; tot i això, s'ha comprovat que la part comestible continua sent una excel·lent font de cobalamina ($\geq 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)⁴¹. En el Japó, però, el producte amb major contingut en cobalamina és el *mefun* (ronyó de salmó salat i fermentat), que conté $328 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Ingerint només 0,8 g de *mefun* es pot suplir la ingesta diària de cobalamina recomanada en adults (**Taula 4**). Tot i ser un producte amb limitades aplicacions i gairebé només popular al Japó, el *mefun* podria ser l'aliment present en la natura amb la concentració més elevada de cobalamina⁴².

Taula 3. Biodisponibilitat de la cobalamina ingerida en la dieta

Aliment	Tipus	Ració ingerida (g)	Cobalamina biodisponible ^a (μg)	Absorció (%)
Carn	Xai ³⁸	100	0,9	67
		200	3,0	83
		300	5,1	52
	Pollastre ⁴³	100	0,5	65
		200	1,1	63
		300	1,6	61
Peix	Truita ⁴⁴	100	4,1	38
		200	9,2	42
		300	13,3	30
Llet	Pasteuritzada ⁴⁵	50 ^b	0,2	65

^avaria en funció de la cocció; ^bquantitat expressada en mL.

En tota ingesta d'aliments, el procés de cuinat és important a l'hora de parlar de biodisponibilitat. Un bon exemple el trobem en els ous. La quantitat de cobalamina present, majoritàriament, en el rovell és $\sim 1,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ⁴⁰, però la seva assimilació és inferior si es compara, per exemple, amb la que trobem en la carn^{38,46}. Aquest fet podria ser conseqüència d'un efecte inhibidor de l'absorció de cobalamina present tant en la clara (on l'ovoalbúmina representa el 54% del seu contingut proteic), com en el rovell⁴⁷.

El valor nutricional de la cobalamina dels ous ferrats i bullits, és lleugerament superior al que presenten els ous remenats, passant d'una mitjana d'assimilació de la cobalamina del 9% al 8% respectivament. Aquest fet sembla conseqüència de l'efecte inhibitori en l'absorció de la cobalamina més marcat de l'ovoalbúmina, ja que, si el remenat d'ous només es fa amb la clara, l'absorció de cobalamina és major que si s'inclou tot l'ou sencer^{48,49}. Un altre exemple de la importància en la cocció es mostra en la carn de boví. Respecte a la carn crua, el fet de rostir-la o fer-la a la planxa li produeix unes pèrdues d'aigua i greix que es reflecteix en una pèrdua entre el 27-33% de cobalamina⁵⁰. En el peix, respecte a la carn, les pèrdues de cobalamina en els diferents processos de cocció són menors, el percentatge es rebaixa al 2,3-4,8%⁵¹. També s'han avaluat les pèrdues que es donen en escalfar els aliments al microones. Es van posar a escalfar mostres de carn bovina, porcina i una mostra de llet durant 6 minuts i es va comprovar, com a resultat global, una pèrdua apreciable de cobalamina d'entre el 30-40%⁵².

Finalment, també s'ha estudiat quin efecte té sobre la retenció de cobalamina el procés de producció i facturació. Es van analitzar sis productes fermentats d'ús comú en la població: per una banda, dos tipus de llets fermentades (iogurts) i, per l'altra, quatre tipus de formatges, començant pel mató i acabant amb formatge blau. En la producció de les llets fermentades, es van observar pèrdues del 40-60% de cobalamina; aquestes no eren causa del procés de pasteurització, sinó com a resultat de l'emmagatzematge d'aquests productes a 4°C dues setmanes a partir de la fermentació. En l'elaboració dels formatges, es va observar que es retenia entre el 18-56% de la cobalamina present en la llet⁵³.

En la **Taula 4**, s'indiquen les recomanacions d'ingesta de cobalamina per la població espanyola (són les propostes més recents, en via d'aprovació) i americana (utilitzades en la majoria de publicacions internacionals). Les dues recomanacions varien en alguns punts. En els nadons, el punt inferior en el rang espanyol és inferior a la recomanació americana, mentre que, en els nens d'1 a 13 anys, els valors de recomanació espanyols són més elevats que els americans. A partir dels 14 i fins als 70 anys, les recomanacions es mantenen per tots els rangs d'edat; la recomanació americana és el valor més elevat del rang de recomanació espanyol.

En les recomanacions americanes, es considera que entre el 10-30% dels individus > 50 anys tenen gastritis atròfica i, per tant, han reduït l'absorció de cobalamina de la dieta. Es planteja que les fonts de cobalamina siguin, principalment, aliments fortificats o suplementos, ja que aquests presenten la cobalamina en forma de CNCbl, que presenta una biodisponibilitat més elevada que la cobalamina provinent de la dieta⁵⁵. En les

recomanacions espanyoles, tot i conèixer que a partir dels 50 anys sorgeixen problemes amb la biodisponibilitat de cobalamina, no s'estableixen uns requeriments majors fins a individus > 70 anys, conseqüència de la falta de dades amb relació a la quantificació d'aquesta biodisponibilitat⁵⁴.

En les dones durant l'embaràs i, sobretot, en la lactància, a causa de l'augment dels requeriments de cobalamina, les ingestes diàries recomanades (tant americanes com espanyoles) són les més elevades.

Taula 4. Recomanacions d'ingesta de cobalamina^a (indicada com a vitamina B₁₂) per la població espanyola⁵⁴ i americana⁵⁵

Edat ^b	Espanya Vitamina B ₁₂ (µg/dia)	Edat ^b	Estats Units Vitamina B ₁₂ (µg/dia)
0-6 mesos	0,3-0,5*	0-6 mesos	0,4*
7-12 mesos	0,3-0,8*	7-12 mesos	0,5*
1-3 anys	0,9-1,1	1-3 anys	0,9
4-5 anys	1,4-1,5	4-5 anys	1,2
6-9 anys	1,5-1,7	6-8 anys	1,2
10-13 anys	2,0-2,1	9-13 anys	1,8
14-18 anys	2,0-2,4	14-18 anys	2,4
19-30 anys	2,0-2,4	19-30 anys	2,4
31-50 anys	2,0-2,4	31-50 anys	2,4
51-70 anys	2,0-2,4	51-70^c anys	2,4
> 70 anys	2,0-3,0	> 70 anys	2,4
Dones			
Embaràs	2,2-2,6	Embaràs	2,6
Lactància	2,6-2,8	Lactància	2,8

^aEls valors són ingestes diàries recomanades (IDR), excepte els valors marcats amb asterisc (*) que, en no poder-se'n calcular la IDR, s'exposen com a ingestes adequades (IA). ^bEn els diferents rangs, els valors són iguals per a homes i dones. ^cEn els individus > 50 anys, es recomana la ingesta d'aliments fortificats amb vitamina B₁₂ o de suplementes que en continguin, per tal de mantenir les IDR davant de possibles problemes de malabsorció de la cobalamina.

5. PROCÉS D'ABSORCIÓ I TRANSPORT DE LA COBALAMINA: HAPTOCORRINA, FACTOR INTRÍNSEC I TRANSCOBALAMINA II

El tracte gastrointestinal humà està previst d'un complex sistema per a l'absorció eficient de les mínimes quantitats de cobalamina de la dieta, ja que, a causa de la seva elevada polaritat, les quantitats diàries necessàries no es poden aconseguir per simple difusió⁵⁶. El procés d'absorció es basa en 5 etapes (**Figura 9**).

5.1.- Alliberació de la cobalamina dels aliments

Després de la ingesta, la cobalamina entra a l'estómac unida a proteïnes animals i és alliberada d'aquestes proteïnes en el medi àcid, generat per les secrecions gàstriques de pepsina i àcid clorhídric^{23,57,58,59}.

5.2.- Unió de la cobalamina a l'haptocorrina

La cobalamina lliure s'uneix a l'*haptocorrina* (HC) provinent de la saliva i les secrecions gàstriques⁶⁰. La HC és una glicoproteïna amb una elevada afinitat d'unió a la cobalamina i als seus anàlegs en el medi àcid de l'estómac^{61,62,63}. Se sintetitza, bàsicament, a les glàndies salivals, mucosa gàstrica i cèl·lules mieloides. La quantitat de cobalamina que circula lliure és negligible; majoritàriament, és transportada per la HC⁶⁴. La fracció de HC lligada amb cobalamina s'anomena *holohaptocorrina* (HoloHC) i la fracció lliure, *apohaptocorrina* (ApoHC). Aquesta unió amb la HC es considera com una possible defensa davant la captació de cobalamina per part de microorganismes intestinals^{57,65}.

A l'estómac, a més, es dona la secreció del FI, que és una glicoproteïna termolàbil, estable en medi alcalí i resistent a la digestió proteolítica, que s'uneix a la cobalamina amb elevada afinitat i especificitat, reduint l'absorció i incorporació d'anàlegs de la cobalamina⁶⁶. El pH àcid, en el qual la HC presenta elevada afinitat d'unió a la cobalamina, és el que inhibeix la funció del FI. Tot i ser present, fins a la degradació de la HC en medi alcalí, el FI no es pot unir a la cobalamina⁶⁷.

Una persona adulta té emmagatzemats uns 2000-5000 µg de cobalamina, poc menys del 80% dels quals, aproximadament, es troben en el fetge⁶⁸. Entre 5 i 10 µg de cobalamina se secreten diàriament en la bilis, units a la HC^{69,70}; aquests complexos cobalamina-HC són tractats en l'intestí exactament igual que aquells que provenen de l'estómac²⁶. La HC de la bilis pot provenir de la captació dels hepatòcits o de la seva síntesi en el fetge. Independentment del seu origen, serà degradada en el lumen intestinal per les proteases pancreàtiques⁷¹.

La participació de la cobalamina en la circulació enterohepàtica genera un important estalvi de cobalamina i com a conseqüència, la seva deficiència exclusivament dietètica pot tardar anys a manifestar-se clínicament. Cal considerar també en aquest fet, la influència de la difusió passiva als teixits de la cobalamina lliure, no obstant, tan sols contribueix en aproximadament l'1% de la concentració total de cobalamina^{72,73}.

5.3.- Digestió de les haptocorrines per les proteases pancreàtiques i transferència de la cobalamina al FI

Quan els complexos cobalamina-HC passen al duodè, són exposats a les proteases pancreàtiques i al pH alcalí de l'intestí⁷⁴. La HC és degradada i la cobalamina s'allibera del complex i s'uneix al FI, formant el complex cobalamina-FI^{75,76}. El pH en el duodè és més neutre que a l'estómac; en aquestes condicions, el FI té una elevada afinitat per unir-se a la cobalamina. En contrast amb la HC, el FI és resistent als enzims gastrointestinals i com a resultat el complex cobalamina-FI es manté fins al final de l'ili^{75,77,78,79}, on és reconegut per la cubilina, proteïna de membrana⁸⁰.

Tot i que se segrega una important quantitat de FI en l'estómac, la seva capacitat d'absorció es limita a 1-1,5 µg/dia de cobalamina⁸¹. Aquest fet es deu a la restricció de l'expressió de la cubilina al final de l'ili i, així, a la limitada disponibilitat de llocs d'unió del complex FI-cobalamina, juntament amb un procés lent de reciclatge del receptor. Herbert V., en el seu treball del 1959⁸², proposava que la limitació en l'absorció podia ser conseqüència d'un excés de FI que podia unir-se sense la cobalamina als receptors (**Figura 7**). Es va comprovar, però, que l'absorció depenia del nombre de receptors, ja que aquests eren específics a la unió amb el complex cobalamina-FI. Per si sols, ni el FI ni la cobalamina es poden adherir al receptor⁸³.

Tot i la importància del FI, en presència de quantitats suprafisiològiques de cobalamina, s'observa absorció per un mecanisme paral·lel, basat en la difusió de petites quantitats de cobalamina sense necessitar la presència de FI^{82,84,85,86,87}.

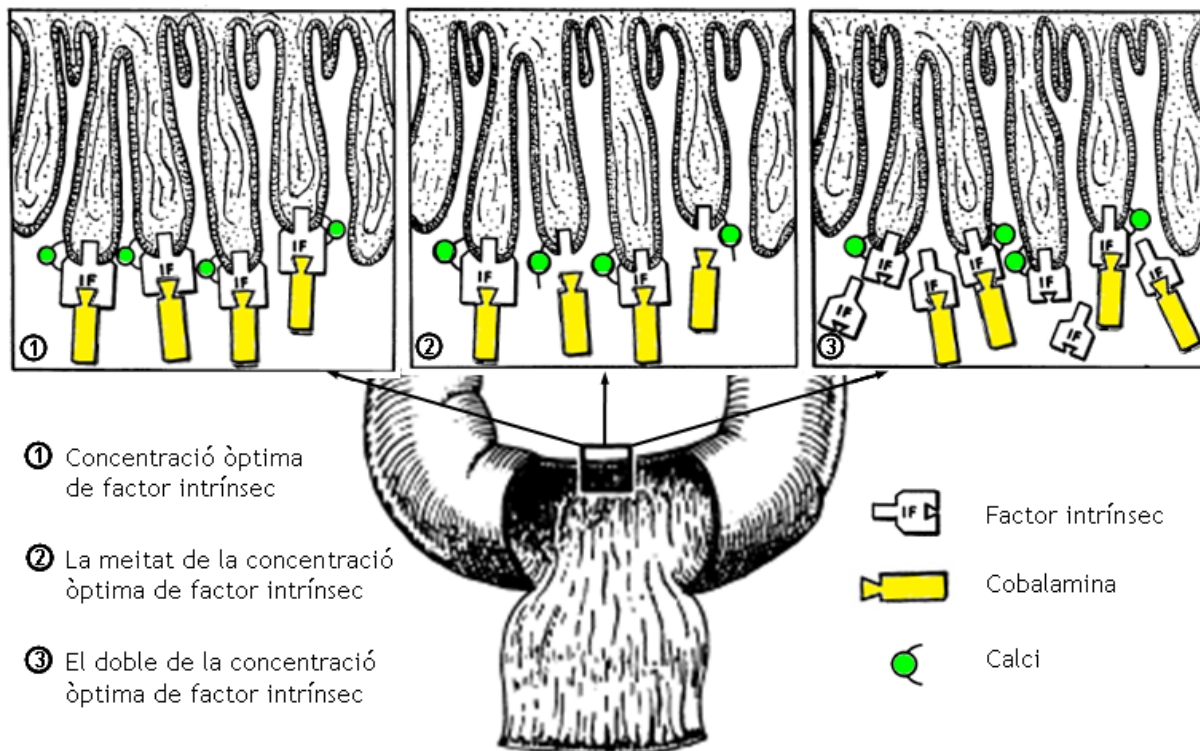


Figura 7. Receptors ileals del complex cobalamina-FI segons Herbert V^{82,84}

5.4.- Adhesió del complex cobalamina-FI al receptor específic en l'ili: cubilina-*amniotless*-megalina

En arribar a l'ili, els complexos cobalamina-FI comencen a unir-se a receptors específics presents en les microvellositats de les cèl·lules de la mucosa⁸⁸. La freqüència d'aquests receptors augmenta en aproximar-se la part distal⁸⁹, amb la seva densitat màxima en les proximitats de la vàlvula ilio-cecal⁹⁰. També es troben receptors en la superfície apical de les cèl·lules tubulars proximals del ronyó⁹¹, que permeten la reabsorció del FI filtrat i prevenen la pèrdua de cobalamina per l'orina⁹².

La interacció amb el receptor és altament específica, no s'uneix a la cobalamina incorporada a altres proteïnes transportadores, ni a complexos de FI amb anàlegs de cobalamina^{36,57}. El complex cobalamina-FI s'uneix a la cubilina, proteïna de membrana de 460 KDa^{80,91,93}. El seu nom prové del fet que, aproximadament, el 88% de la seva massa proteica és formada per dominis CUB⁹⁴. Aquest elevat nombre de dominis permet la unió de diferents lligands com ara la megalina o l'*amniotless*⁹⁵ (**Figura 8**).

La primera hipòtesi que es va formular sobre aquest receptor es basava en el fet que era format per la cubilina i la megalina^{96,97}. Més endavant, però, el model es va canviar pel complex "cubilina-*amniotless*" (cubam)^{98,99,100}, comprovant com la presència del grup cubam permet l'endocitosi del lligand cobalamina-FI en absència de megalina.

L'*amnionless* és una proteïna de membrana de 50 kDa amb capacitat d'acoblar-se a la cubilina formant el complex endocític *cubam*. La unió es dóna en la zona formada per 8 repeticions contigües del *factor de creixement epitelial* (FCE). La cubilina és l'únic lligand conegut de *amnionless*^{95,99}. És una peça clau tant en la sortida de la cubilina del reticle endoplasmàtic, com en la seva expressió en la membrana apical i, per tant, és bàsica per permetre l'absorció del complex cobalamina-FI¹⁰¹.

La megalina és una altra proteïna de membrana de 600 kDa^{80,93,102,103}, que podria intervenir tant en l'estabilització de la cubilina a la superfície cel·lular, com en el procés d'endocitosis de la cubilina unida al seu lligand^{95,104}. S'han identificat tres zones d'unió de la cubilina a la megalina: *a*) fragment que conté l'extrem N terminal, els 8 dominis FCE i els dominis CUB 1 i 2, *b*) dominis CUB 12-17, *c*) dominis CUB 22-27¹⁰⁵ (**Figura 8**).

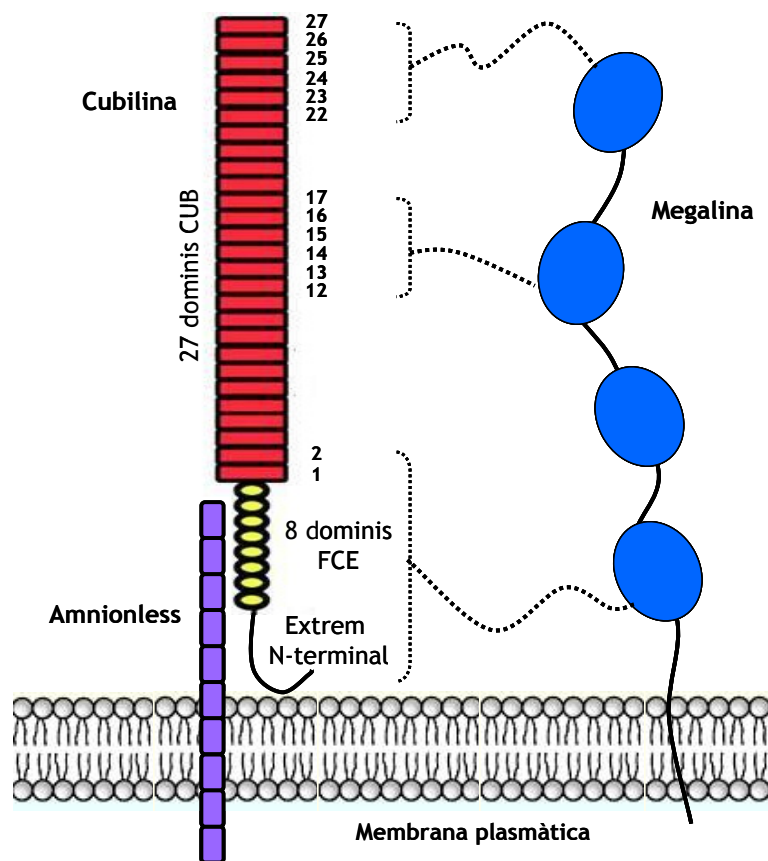


Figura 8. Receptor ileals del complex cobalamina-FI. Format pel grup cubam (cubilina-*amnionless*) i la megalina. FCE, Factor de Creixement Epitelial (Modificació de Kozyraki R,2007⁹⁵)

S'ha comprovat en les cèl·lules del túbul contornejat proximal, com el complex cubam en absència de megalina, és capaç només d'absorbir una mínima quantitat de grups cobalamina-FI, mostrant el paper promotor de la megalina en el procés d'endocitosi¹⁰⁶.

Considerant totes les dades, sembla que la contribució d'ambdós, megalina i *amnionless*, és necessària tant per la funcionalitat de la cubilina com a receptor, com perquè la captació dels lligands i la seva absorció es doni a un nivell òptim.

5.5.- Endocitosi i unió intracel·lular a la transcobalamina II (TCII)

El complex cobalamina-FI és endocitat per la cara apical o luminal de la cèl·lula ilial⁹³. En la via endosoma-lisosoma, el receptor és reciclat cap a les microvellositats per la captació de nous complexos cobalamina-FI^{98,107} i, en el lisosoma, es dona la degradació del FI^{108,109}. Els lisosomes contenen transportadors de membrana específics que permeten als productes de la degradació, com, en aquest cas, la cobalamina, ser transportats al citosol, on la cobalamina entra en vesícules de secreció⁹⁷, que contenen la *transcobalamina II* (TCII)¹⁰⁷. El complex cobalamina-TCII se secreta via membrana basolateral per entrar al sistema circulatori^{109,110,111}.

Des de la degradació del FI en els lisosomes fins a l'alliberació del complex cobalamina-TCII, passen unes 4 hores^{97,112,113}, i la màxima concentració de cobalamina en sang es detecta, aproximadament, 8 hores després de la ingesta¹¹⁴.

La TCII és una proteïna de transport formada per dues subunitats¹¹⁵ i sintetitzada, principalment, a l'endoteli vascular¹¹⁶, tot i que també es troba en fibroblasts¹¹⁷, fetge i ronyó^{118,119}. Quan la TCII s'uneix a la cobalamina, s'anomena *holotranscobalamina* (HoloTC), però, majoritàriament, es troba com a fracció lliure, identificada com *apotranscobalamina* (ApoTC)¹²⁰.

L'entrada del complex cobalamina-TCII a nivell cel·lular es dona via un receptor específic de TCII, situat en la membrana plasmàtica^{121,122}, i que té més afinitat per l'HoloTC que per l'ApoTC^{122,123}. El receptor de TCII s'expressa en la seva forma dimèrica tant en la superfície basal com en l'apical de les cèl·lules epitelials, ronyó^{121,124}, intestí, placenta i en el fetge. Així el complex cobalamina-TCII es pot filtrar en el glomèrul, seguit d'una reabsorció tubular que en prevé la pèrdua per l'orina; en aquest procés, la megalina situada en els túbuls proximals del ronyó és essencial^{124,125,126}.

Un cop endocitat el complex cobalamina-TCII, la TCII és degradada en els lisosomes i la cobalamina lliure es converteix en les seves formes coenzimàtiques: AdoCbl i MeCbl^{127,128,129} (vegeu l'apartat "Biodisponibilitat: la síntesi endògena, l'estructura química i les formes coenzimàtiques de la cobalamina").

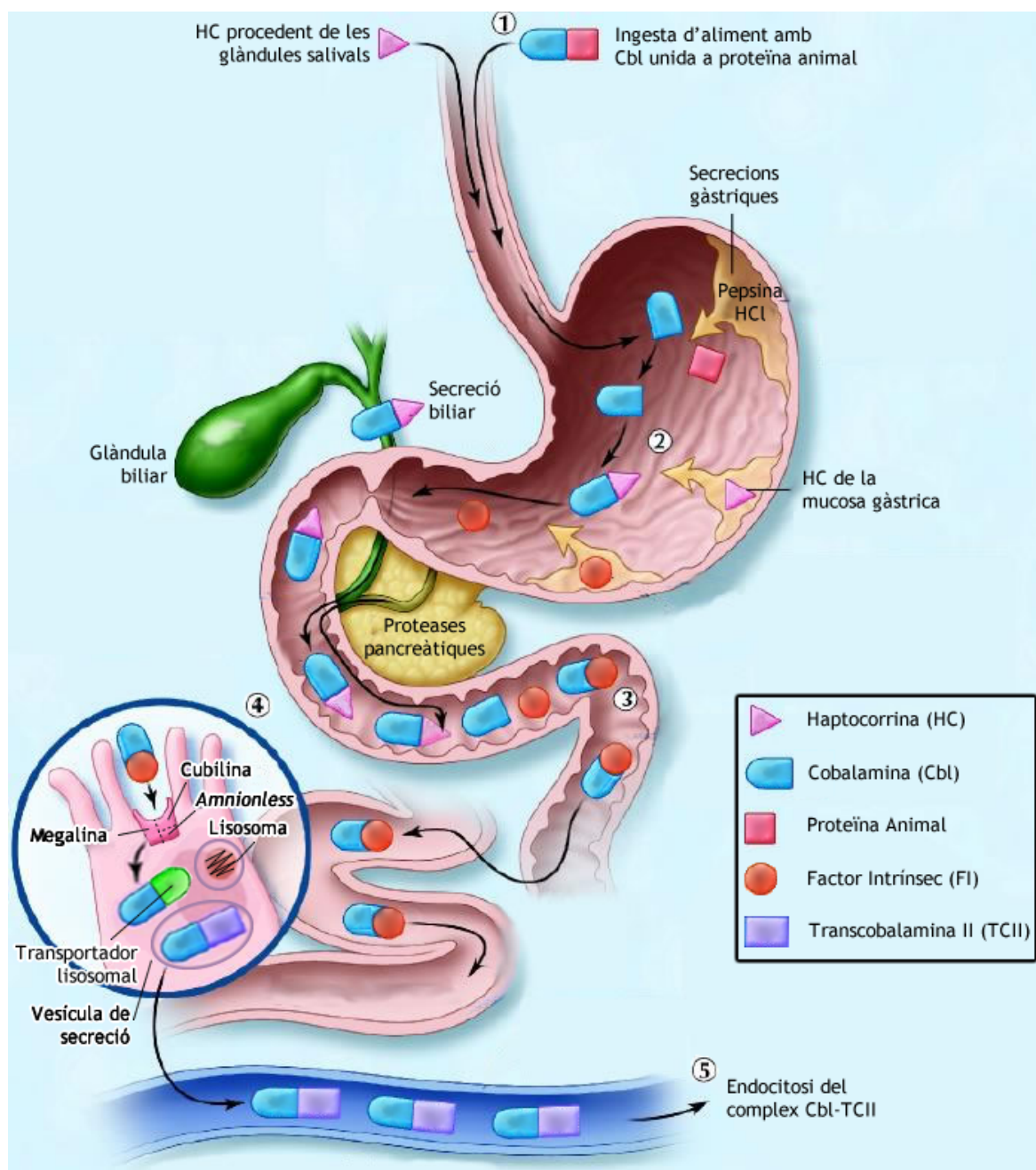


Figura 9. Etapes del procés d'absorció i transport de la cobalamina: 1. Alliberació de la Cbl dels aliments, 2. Unió de la Cbl a la HC, 3. Digestió de les HC i unió Cbl-FI, 4. Adhesió Cbl-FI al receptor, 5. Endocitosi i unió Cbl-TCII (Modificació d'Andrès E, 2004²⁶)

6. MARCADORS BIOQUÍMICS DE L'ESTAT EN COBALAMINA

La detecció de la deficiència en cobalamina mitjançant l'anàlisi de la cobalamina total sèrica és vigent des de principi del 1950¹³⁰. Tot i que avui en dia encara és una prova en vigor, es considera que té una limitada especificitat. Baixes concentracions de cobalamina sèrica poden ser presents sense símptomes clínics^{131,132}. També hi ha controvèrsia amb relació a la seva sensibilitat, s'observen concentracions sèriques d'àcid metilmalònic (MMA) elevades, davant concentracions dins el rang normal de cobalamina sèrica^{133,134}. Qualsevol intent de millorar-ne l'especificitat baixant els punts de tall per la deficiència en cobalamina donaria lloc a una marcada pèrdua de sensibilitat (**Taula 5**).

Referent als problemes de sensibilitat en la determinació de la cobalamina total plasmàtica, trobem pacients deficients en cobalamina que presenten concentracions plasmàtiques característiques d'un estat adequat o baix, però no deficient, en cobalamina^{135,136}. Una possible explicació és que la mesura de la cobalamina total inclou tant la transportada per la HC, aproximadament el 90% de la cobalamina circulant¹³⁷, com la que ho fa amb la TCII. Aquesta diferència en el percentatge de cobalamina transportada per la HC i per la TCII, és conseqüència de que la HC té un aclariment plasmàtic lent, vida mitjana d'uns 10 dies¹³⁸, mentre que la vida mitjana de la TCII és de poques hores^{139,140}. Si es considera que només la cobalamina unida a TCII (HoloTC) és la que es troba disponible a nivell cel·lular^{120,141,142}, sembla que seria específicament la detecció d'aquesta HoloTC la que permetria conèixer substancialment l'estat en cobalamina^{143,144,145,146,147,148,149}.

La determinació de la cobalamina sèrica total, no és sensible a la deficiència en cobalamina disponible a nivell cel·lular, associada a baixes concentracions d'HoloTC en conjunció amb un augment de la fracció d'HoloHC. La deficiència en HoloHC no s'associa a la deficiència clínica de cobalamina¹⁵⁰, presumiblement perquè la fracció d'HoloTC és normal. A més, s'ha observat que l'HoloTC és un marcador més sensible al canvi en la ingesta de cobalamina en forma de suplement, ja que, respecte la cobalamina total, augmenta abans en resposta a la suplementació i és el que disminueix primer en atura-la¹⁵¹. Aquest fet podria implicar una falta d'associació entre l'HoloTC i la deficiència en cobalamina, si la suplementació no es té en consideració¹⁵².

En individus amb falta hereditària de factor intrínsec o defectes en la cubilina o l'*amnionless*, s'ha comprovat com el canvi en les concentracions sèriques d'HoloTC és significativament inferior, després de 24 hores de suplementació amb cobalamina, respecte el present en individus sans¹⁵³. La resposta de l'HoloTC suggereix la seva

utilització com un bon marcador d'absorció¹⁵³. Tot i això s'han donat casos de solapament de concentracions sèriques d'HoloTC, entre pacients suplementats amb problemes de malabsorció i els controls, la qual cosa fa que hi hagi discrepàncies sobre el grau d'afectació de l'absorció de cobalamina sobre les concentracions d'HoloTC^{154,155}.

Tot i que, ja des del 1980^{156,157}, es tractava l'HoloTC com un bon marcador per detectar la deficiència en cobalamina, no és fins al 2002 quan es troben assaigs disponibles per a la seva determinació^{158,159}. Inicialment, es tractava de tècniques manuals i no apropiades per un elevat nombre de mostres, tal com necessita un laboratori clínic, fins que el 2003 es va posar a punt una *tècnica de radioimmunoassaig* (RIA) per a la seva detecció¹⁶⁰. No va ser, però, fins el 2006 quan es va disposar d'un anticòs monoclonal de rata amb elevada especificitat per a l'HoloTC humana, que permetria la utilització de la *tècnica d'enzimoimmunoassaig* (ELISA)¹⁶¹ i el posterior ús d'analitzadors d'immunoassaig automatitzats¹⁶².

En comparar la precisió diagnòstica en la deficiència en cobalamina, en individus ≥ 60 anys, entre l'HoloTC, l'anàlisi de la cobalamina total i la combinació d'ambdós, es va observar com les dues proves juntes tenien una sensibilitat major que la presentada només per l'anàlisi de la cobalamina total, però igual que l'obtinguda només amb l'HoloTC. En referència a l'especificitat, va ser lleugerament menor a la calculada per les dues proves fetes per separat. Tot i que aquests resultats suggereixen que no hi ha cap avantatge en combinar les dues proves, s'ha comprovat com, davant de concentracions baixes d'ambdós paràmetres, les concentracions plasmàtiques de MMA i *d'homocisteïna plasmàtica total en dejú* (tHcy), són més altes en comparació a les presents, quan només hi ha baixa concentració de cobalamina o HoloTC¹⁶³. En presència de la deficiència en cobalamina, per una banda, la metilmalonil Coa-mutasa no pot convertir per falta d'AdoCbl, el metilmalonil CoA en succinil CoA, fet que resulta en un augment en la concentració de MMA i, per l'altra, la metionina-sintasa, tot i tenir el grup metil procedent del 5-MTHF, no pot remetilar la Hcy per la manca de MeCbl, fent que augmenti la concentració de tHcy (**Figura 10**).

Miller i els seus col·laboradors¹⁶³, en una població de gent gran de mediana de 70 anys, amb un mínim i un màxim de 60-101 anys, van classificar els casos amb cobalamina < 148 pmol/L i HoloTC < 35 pmol/L com a *probables deficients*, els que només presentaven un dels dos paràmetres baixos com a *possibles deficients*, i els que no presentaven cap dels dos paràmetres afectats es van anomenar *improbables deficients*. Les concentracions plasmàtiques mitjanes de MMA i tHcy eren majors en els *probables deficients* (576 nmol/L i 16,9 μ mol/L) respecte els *possibles deficients* (252 nmol/L i

11 µmol/L) i aquests presentaven concentracions majors que els *improbables deficients* (152 nmol/L i 9,6 µmol/L). Aquesta categorització és important per la inclusió de *possibles deficients*, ja que considera la possibilitat que individus amb concentracions de cobalamina dins dels intervals de referència, puguin estar en risc de ser deficients, tal com indicaria la baixa concentració d'HoloTC. Així, segons Miller, fent les dues proves combinades es podrien identificar més individus en risc de deficiència.

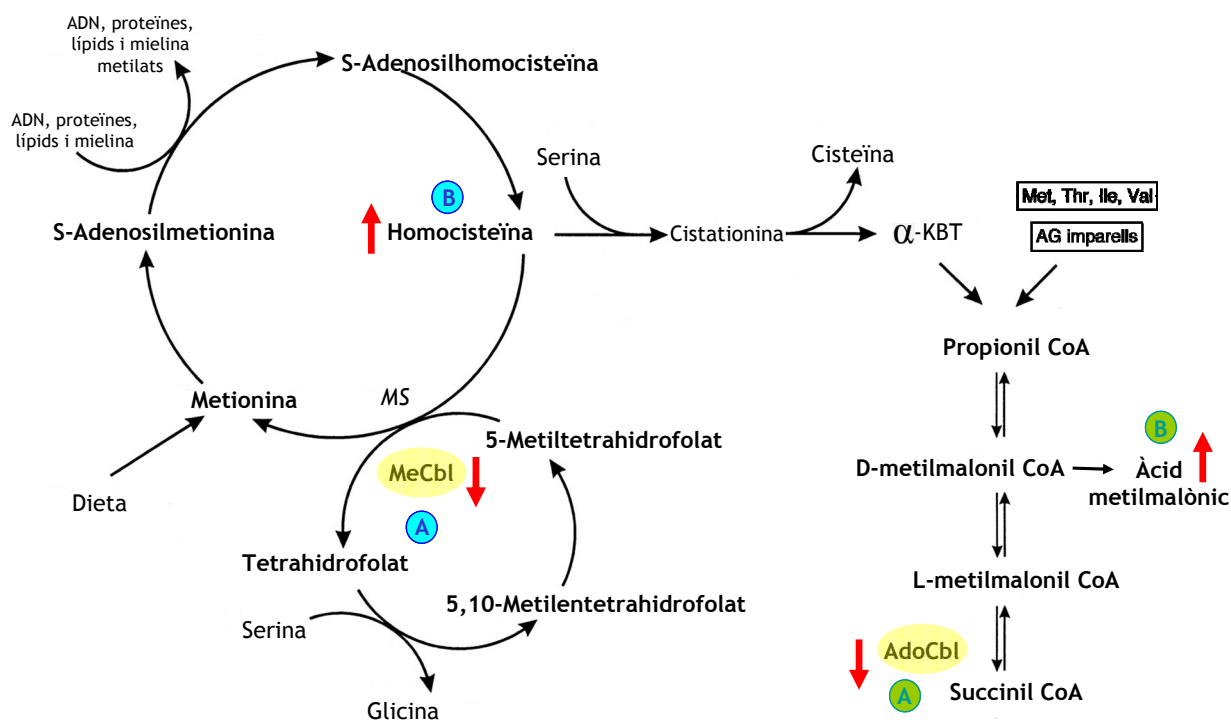


Figura 10. Àcid metilmalònic i homocisteïna, marcadors per la deficiència en cobalamina. A, B: davant la deficiència en cobalamina, pot donar-se un augment tant d'homocisteïna com d'àcid metilmalònic. α-KBT, alfa-cetobutirat; Met, metionina; Thr, treonina; Ile, isoleucina; Val, valina; AG, àcids grassos; MS, metionina-sintasa; AdoCbl, adenosilcobalamina; MeCbl, metilcobalamina (Modificació de Herrmann W, 2000¹³⁴)

Garrod i els seus col·laboradors¹⁶⁴, a mitjan 2008, van investigar la rellevància clínica de la raó HoloTC/Cbl en l'avaluació de l'estat en cobalamina. Consideraven que la raó HoloTC/Cbl, el valor de la qual presenta una diferència interindividual que es troba típicament entre el 20-30%¹⁶⁵, podria donar informació sobre la cobalamina disponible per ser alliberada als teixits i una mesura sensible de l'estat en cobalamina. L'estudi realitzat en individus amb una mediana de 70 anys, va mostrar com la raó HoloTC/Cbl s'associava a la funció cognitiva en individus amb símptomes depressius, de manera que la disminució de la raó es relacionava amb un augment dels problemes cognitius, i podia reflectir millor l'estat adequat de cobalamina necessari per mantenir la funció del sistema nerviós, respecte a l'HoloTC o la cobalamina per separat¹⁶⁴. L'ús de l'HoloTC en una raó per avaluar l'estat en cobalamina ja s'havia donat anteriorment, però en el context de

percentatge de TC total unit a la cobalamina, o també anomenat percentatge de saturació de la TC i calculat com la raó HoloTC/TC¹⁶⁶, analitzat majoritàriament com a marcador d'aborsció de cobalamina^{120,167}.

Com s'ha comentat anteriorment, conseqüència de que en la funció coenzimàtica de la cobalamina, l'AdoCbl intervingui en la conversió del metilmalonil Coa a succinil CoA i la MeCbl en la remetilació de la Hcy a metionina, tant la determinació d'elevades concentracions de MMA a l'orina^{168,169}, o al plasma/sèrum^{170,171,172,173,174,175,176}, com de la tHcy^{177,178,179,180,181}, es consideren marcadors sensibles de la deficiència en cobalamina¹⁸².

Clarke i els seus col·laboradors¹⁸³, en una població ≥ 75 anys, van definir com individus amb elevat risc de deficiència en cobalamina, aquells amb concentracions de cobalamina < 200 pmol/L, punt d'inflexió de la corba que relaciona la tHcy i el MMA, i que correspon al percentil 80 de tHcy ($> 15,0$ $\mu\text{mol/L}$) i MMA ($> 0,35$ $\mu\text{mol/L}$) en els individus amb funció renal normal. Davant el fet de l'elevat cost i la baixa disponibilitat dels assaigs amb MMA, aquest estudi mostra que elevades concentracions de tHcy podrien detectar, aproximadament, les $\frac{3}{4}$ parts de les identificacions de deficiència en cobalamina, que es farien per elevades concentracions de MMA.

En referència a la sensibilitat d'aquests marcadors, és important considerar que la insuficiència renal, correlacionada amb elevades concentracions de creatinina¹⁸⁴, pot associar-se amb concentracions elevades tant d'HoloTC sèrica/plasmàtica^{146,185,186}, tHcy^{187,188,189,190} com de MMA sèric /plasmàtic^{176,191,192,193}. Tot i això diferents estudis han mostrat com l'HoloTC, igual que la cobalamina total, no es correlaciona amb la disfunció de la funció renal^{163,194}, considerant en poblacions propenses a patir insuficiència renal, l'HoloTC com un marcador més sensible respecte el MMA i la tHcy en la detecció de la deficiència en cobalamina (**Taula 5**).

En el cas del MMA, ja des del 1960, se centren esforços cap a desenvolupar un mètode per a la seva anàlisi, primer en orina¹⁹⁵ i després tant en sèrum com en plasma^{196,197}, que sigui ràpid, simple, sensible i específic. Tot i millorar la tècnica^{198,199,200,201,202,203,204} i haver-ne obtingut, fins i tot, assaigs que permeten la determinació de MMA i tHcy simultàniament²⁰⁵, continua sent una anàlisi costosa, amb cromatografia acoplada amb espectrometria de masses, que limita la seva disponibilitat als laboratoris (**Taula 5**).

Els assaigs per a la detecció de la tHcy també han anat evolucionant^{206,207,208,209,210,211} i s'han aconseguit tècniques amb un cost més baix i major disponibilitat que les del MMA,

però amb l'inconvenient que, en interpretar la tHcy, cal considerar que la seva sensibilitat cap a la deficiència en cobalamina està afectada per l'estat en folats^{177,212,213,214,215} (**Taula 5**). Per aquest motiu, la utilització de la tHcy es recomana juntament amb la del MMA^{216,217}, la seva combinació permet tant el diagnòstic de la deficiència en cobalamina com de folats i la seva diferenciació^{218,219}. Per altra banda, s'ha comprovat com, en individus amb baixes concentracions en cobalamina, elevades concentracions de folats s'associen a un empitjorament de les conseqüències metabòliques, com augments més important tant de tHcy com de MMA. S'ha plantejat que elevades concentracions de folats poden ser precursors de l'exacerbació de les manifestacions clíniques pròpies de la deficiència en cobalamina^{220,221,222}.

L'anàlisi de la cobalamina total plasmàtica/sèrica, que permetria distingir els individus deficients dels que tenen un bon estat en cobalamina, és l'opció més utilitzada per valorar l'estat en cobalamina. La resta de marcadors permet distingir els individus presents en la *zona gris*, definida entre els límits de 125-150 pmol/L i 250 pmol/L de cobalamina plasmàtica/sèrica^{59,223}, englobant els individus al límit de la deficiència, els que presenten un estat baix-adequat en cobalamina i els que en tenen un estat adequat-bo. La determinació de MMA i tHcy conjuntament, discriminaria els individus amb deficiència en folats, cosa que augmentaria la sensibilitat de l'anàlisi considerant però, que entre MMA i tHcy la primera opció és la preferible, ja que millora el grau d'especificitat de la tHcy, tot i que aquesta tingui un cost menys elevat i major disponibilitat^{59,224} (**Taula 5**). El fet d'utilitzar com a marcador discriminatiu de la *zona gris* l'HoloTC²²³, podria millorar l'especificitat de la prova conjunta amb la tHcy com alternativa a l'elevat cost del MMA; tot i això falten encara més estudis per tal de decidir la validesa de l'HoloTC com a marcador únic o en combinació amb un altre dels marcadors.

Taula 5. Comparació de l'ús individual de marcadors sèrics per al diagnòstic de la deficiència en cobalamina (Modificació de Carmel R, 1990²²⁵)

Marcador ^a	Cbl	HoloTC	MMA	tHcy	
Comportament davant	Deficiència clínica en cobalamina	Disminueix	Disminueix	Augmenta	Augmenta
	Deficiència preclínica en cobalamina^b	Disminueix o es manté dins el rang normal	Disminueix	Augmenta	Augmenta
	Deficiència en folats	Disminueix o es manté dins el rang normal	Disminueix o es manté dins el rang normal	Es manté dins el rang normal	Augmenta
	Insuficiència renal	Augmenta o es manté dins el rang normal	Augmenta o es manté dins el rang normal	Augmenta	Augmenta
Disponibilitat	Àmplia i de rutina	Àmplia, però no de rutina	En pocs laboratoris	Àmplia però no de rutina	
Sensibilitat	Discutible	Elevada	Elevada	Elevada	
Especificitat	Discutible	Raonable	Discutible	Baixa	

^aCbl, cobalamina; HoloTC, holotranscobalamina; tHcy, homocisteïna total plasmàtica en dejú; MMA, àcid metilmalònic. ^bdeficiència preclínica: estat en el qual hi ha evidències metabòliques de la insuficiència en cobalamina en una persona sense símptomes o anèmia.

7. TRACTAMENTS EN CASOS DE DEFICIÈNCIA

Els punts de tall, sèrics i plasmàtics, recomanats per al diagnòstic de la deficiència en cobalamina i per a la detecció d'estrés en les reserves són < 148 pmol/L i < 221 pmol/L respectivament. Estan basats en l'aparició de símptomes clínics (neurològics, cognitius i/o hematològics), que es donen, normalment, per concentracions de cobalamina sèrica < 148 pmol/L o bé per la presència de signes d'insuficiència bioquímics a partir de marcadors de cobalamina (p. ex. augment MMA o tHcy, que normalment comencen amb concentracions de cobalamina sèrica < 221 pmol/L)²²⁶.

El tractament clàssic per la deficiència en cobalamina, si la causa no és deficiència en la dieta, és l'administració parenteral que en la majoria de països, suposa injecció intramuscular en forma de CNCbl i OHCbl o, més rarament MeCbl, que per altra banda és la forma utilitzada amb més freqüència en el Japó^{227,228,229}. L'OHCbl es reté molt millor en l'organisme, injeccions amb 1 mg d'OHCbl cada 1,5-3 mesos són suficients, la mateixa quantitat de CNCbl seria necessària cada 2 setmanes^{230,231,232,233,234,235}. A més, hi ha determinades patologies que necessiten un potent antagonista de cianur, propietat que compleix l'OHCbl, però no la CNCbl^{236,237}.

El tractament per injecció intramuscular té, però, inconvenients: els pacients que l'han de rebre són, majoritàriament, gent gran, que a més acostuma a necessitar l'assistència d'algun professional, sigui a nivell mèdic a la consulta o bé la visita d'una infermera per poder-se injectar; tot això implica elevats costos que, amb un tractament oral, es podrien evitar^{238,239,240}. Diferents estudis demostren que entre 500-2000 µg de CNCbl oral diària, en contrast amb l'administració parenteral mensual, permeten tractar adequadament tant les deficiències per problemes d'absorció com per deficiència de FI, necessari per a l'absorció de la cobalamina^{241,242,243,244,245,246,247}.

Davant la millor retenció en l'organisme del tractament parenteral amb OHCbl respecte CNCbl, el 1999 es va plantejar un impuls comercial per a l'ús terapèutic oral, ja que no hi havia preparacions orals produïdes comercialment^{248,249}, tot i que, clínicament ja s'havia utilitzat com a tractament terapèutic amb dosis diàries de 1000 µg²⁵⁰.

Actualment, tot i trobar preparats orals, els estudis continuen referint-se a l'OHCbl, majoritàriament, com a tractament parenteral^{251,252}. El tractament oral davant casos de deficiència en cobalamina es considera eficient²⁵³, però sense determinar-ne una estratègia concreta pel que fa a la forma (OHCbl o CNCbl), freqüència i/o durada del tractament²⁵⁴. Tot i això, en casos de pacients amb problemes neurològics greus, les

dades actuals no són suficients per donar suport a l'ús de CNCbl oral, en dosis de 1000-2000 µg, com a teràpia efectiva²⁵⁵.

També cal considerar els pacients amb diarrea, vòmits o incapaçs de prendre medicació per via oral; per això, també s'ha provat el tractament sublingual i, fins i tot, intranasal amb cobalamina com a alternativa a l'oral i parenteral. En un primer estudi, la dosi sublingual diària va ser de 2000 µg de cobalamina durant 7-12 dies; entre els individus estudiats, n'hi havia amb anèmia perniciosa, vegetarians i amb malaltia de Crohn, tots amb deficiència en cobalamina (< 148 pmol/L). Es va aconseguir el restabliment de la concentració sèrica en cobalamina en tots els casos²⁵⁶. En un estudi posterior, es van provar dosis més baixes, fent que individus deficients en cobalamina (< 138 pmol/L), el 50% dels quals eren vegetarians, prenguessin 500 µg diaris de cobalamina sublingual durant 8 setmanes, i es va aconseguir també en tots els casos la correcció de les concentracions de cobalamina sèrica²⁵⁷. El tractament intranasal amb 1500 µg d'OHCBi en 6 individus deficients en cobalamina (< 148 pmol/L) amb diferents patologies: malaltia de Crohn passada o actual o bé problemes intestinals, siguin inflamacions recurrents o defectes causats per una enteritis crònica, també va corregir les concentracions de cobalamina sèrica. La correcció de la deficiència en tots els casos es va donar amb 4 setmanes de tractament²⁵⁸.

Tot i les bones perspectives que mostren els diferents estudis d'acord amb alternatives a les injeccions intramusculars, la recomanació de cobalamina per via oral com a tractament definitiu, encara no ha estat plenament validada en la pràctica clínica actual.

8. LA COBALAMINA EN LA POBLACIÓ

La deficiència en cobalamina es considera poc comuna a la població general no vegetariana, perquè els requeriments són relativament petits i ingerits normalment en una dieta omnívora²⁵⁹ i, perquè la vitamina es conserva eficientment en la circulació enterohepàtica⁸⁴. Hi ha però la possibilitat d'una ingesta insuficient relacionada amb un nivell socioeconòmic baix^{260,261}. En els últims anys l'estat en cobalamina ha estat un tema recurrent en les poblacions amb fortificació obligatòria d'àcid fòlic de productes derivats del blat, seguit de prop pels països que es plantegen la implementació d'aquesta intervenció en la població (*vegeu l'apartat "Interaccions folat-cobalamina i polítiques de fortificació"*).

S'estima que entre la població occidental el 5-15% de la gent gran poden tenir deficiència en cobalamina, definida per concentracions sèriques elevades de MMA (> 271 nmol/L), amb o sense concentracions elevades de tHcy (> 16,2 µmol/L), en combinació amb concentracions sèriques baixes o baixes-normals de cobalamina (rang normal 150-590 pmol/L)^{136,262}. La definició de rang normal en les concentracions de cobalamina, aplicat tant a adults com a gent gran és un tema controvertit. La variabilitat entre els diferents estudis, en la selecció d'individus, els mètodes d'assaig i les aproximacions analítiques que es tenen en compte, podrien explicar la diferència en la prevalença, d'entre el 0-45%^{263,264,265}, de deficiència en cobalamina.

En l'estudi Framingham, basat en una investigació epidemiològica sobre la malaltia coronària²⁶⁶, es va observar com el 28% dels individus amb concentracions de cobalamina sèrica < 185 pmol/L, presentaven concentracions sèriques elevades de MMA (> 376 nmol/L) respecte les persones amb millor estat en cobalamina²⁶⁷. Per altra banda, en l'estudi d'individus amb evidències clíniques de deficiència en cobalamina, s'han trobat concentracions d'aquesta vitamina en un rang de 160-350 pmol/L¹³⁵. Tots aquests fets demostren que considerar les baixes concentracions de cobalamina com a únic indicador de la seva deficiència, deixa molts individus fora dels nivells de detecció.

Dels 2000-5000 µg de cobalamina emmagatzemats en una persona adulta, aproximadament el 80% es troben en el fetge⁶⁸. La cobalamina se segrega des del fetge amb la bilis. La major part és reabsorbida a l'intestí prim i entra en el cicle enterohepàtic. La mitjana de vida de la cobalamina és de 2 a 3 anys²⁶⁸, com a conseqüència la deficiència es desenvolupa lentament²⁶⁹. S'ha suggerit que la majoria de casos de deficiència són per ingesta inadequada²⁷⁰ i malabsorció²⁴⁵, però l'estil de vida, com ara

fumar o un consum elevat d'alcohol^{271,272}, i determinades malalties, medicaments²⁷³ i defectes enzimàtics també poden afectar el metabolisme de la cobalamina²⁷⁴.

El 1855 Thomas Addison³ va descriure els símptomes mentals i neurològics de l'anèmia perniciosa, a més dels hematològics, considerats avui com els símptomes clàssics de la deficiència en cobalamina juntament amb els gastrointestinals. Aquests símptomes clàssics normalment es donen en estadis avançats de la deficiència. Carmel R el 1996²⁷⁵, en un estudi de 729 individus ≥ 60 anys, va determinar que el 2% dels casos de deficiència en cobalamina s'explicaven per l'anèmia perniciosa, malaltia caracteritzada per la pèrdua de la secreció del FI.

En la gent gran, la ingesta dietètica pobra en cobalamina rares vegades és la causa de les seves baixes concentracions, comunes en aquest sector de la població^{276,277}. Alguns autors, però, no veuen tan clara aquesta falta d'associació. La baixa ingesta d'aquesta vitamina s'ha trobat com a causa important de la deficiència en cobalamina, tant en un nombre reduït d'individus ingressats en un geriàtric²⁷⁸, com en mostres més grans que impliquen un sector més ampli de la població²⁷⁰.

L'envelliment de la mucosa intestinal pot provocar un menor grau d'absorció i reabsorció²⁷⁹. L'alta prevalença de la deficiència en cobalamina entre la gent gran, tot i la ingesta adequada, es relaciona amb canvis intestinals produïts per l'edat, que dificulten l'alliberament de la cobalamina dels aliments²⁶³. La capacitat de produir àcid gàstric disminueix amb l'edat^{280,281}, la causa més comuna de la qual és la gastritis atròfica. Fins al 30% d'individus de 65 anys es veuen afectats²⁸² per aquesta inflamació de la mucosa, i s'ha estimat²⁸³ que la prevalença arriba a ser fins al 40% entre persones ≥ 80 anys. La disminució de la producció d'àcid gàstric altera tant l'absorció de cobalamina com de folats. La infecció per *Helicobacter pylori* es considera una de les causes importants de la gastritis atròfica²⁸⁴ i afecta, aproximadament, el 50% de les persones ≥ 60 anys en els països industrialitzats, i una proporció major en els països en desenvolupament²⁸⁵. Aquestes condicions poden donar lloc a deficiències moderades tant de cobalamina com de folats, que no són detectables per les proves rutinàries de laboratori.

En diferents articles^{286,287} s'han proposat revisions periòdiques en la població de gent gran per tal de detectar les primeres etapes de la deficiència en cobalamina. Aquest fet passà a ser més rellevant a partir de la introducció de la fortificació obligatòria amb àcid fòlic de productes de gra als EUA el 1998, que, posteriorment, s'ha aplicat a altres països. S'ha comprovat com un estat baix en cobalamina s'associa de manera més evident amb la deficiència en cobalamina quan l'estat en folats és elevat^{288,289}. També

s'ha observat com un elevat consum d'àcid fòlic pot prevenir el desenvolupament de l'anèmia característica en la deficiència en cobalamina, i aquest emmascarament, afavorir la progressió de la malaltia neurològica^{290,291} (vegeu l'apartat "*Interaccions folat-cobalamina i polítiques de fortificació*").

El problema, accentuat en la gent gran, no és la detecció de deficiències greus en cobalamina, sinó la detecció de les deficiències marginals. Diferents estudis han mostrat que un deteriorament cognitiu lleu podria ser un símptoma inicial²⁹². La funció neurològica disminueix amb l'edat, fent que la incidència de casos de demència augmenti amb l'edat, amb una prevalença del 25% en adults entre 85 i 89 anys. Diferents estudis prospectius i transversals han mostrat que concentracions elevades de tHcy i la deficiència en cobalamina, són factors de risc per al deteriorament cognitiu²⁹³, tot i que no tots els estudis han pogut mostrar associacions positives entre els indicadors bioquímics de cobalamina i la demència²⁹⁴.

S'ha investigat la possible associació de baixes concentracions de cobalamina amb símptomes depressius. Hi ha estudis fets tant als Països Baixos²⁹⁵ com a Irlanda²⁹⁶, en què les concentracions de cobalamina < 258 pmol/L, obtingudes a partir de 806 individus amb una mitjana d'edat de 73 anys, i concentracions d'HoloTC (mitjana: 44,4 pmol/L) en el quartil baix de 252 individus amb nivell socioeconòmic baix i una mitjana d'edat de 78 anys, respectivament, es relacionen amb els símptomes depressius. Per contra, estudis fets a Austràlia²⁹⁷ amb 412 individus, en els quals l'estat baix en cobalamina es considera < 97 pmol/L, o als Estats Units²⁹⁸, on es compara la concentració de cobalamina dels individus amb elevats símptomes depressius de la resta, ampliant el nombre d'individus i el rang d'edat, no troben aquesta relació.

Elevades concentracions sèriques de MMA o tHcy es troben sovint en la població de gent gran^{136,262}. En aquest sector de la població, s'ha vist com elevades concentracions de tHcy (> 15 µmol/L) s'han correlacionat inversament amb mesures de benestar, com l'estat d'ànim, l'habilitat espacial o la memòria de reconeixement²⁹⁹ i amb un deteriorament físic més ràpid³⁰⁰.

En un estudi fet amb 101 individus sota sospita de deficiència en cobalamina, amb una mitjana d'edat de 53 anys, es va proposar l'HoloTC com un millor marcador de deficiència respecte a la cobalamina, i es va trobar una millor correlació entre aquest marcador i una possible situació de malabsorció¹⁵⁴. En un altre estudi fet amb 700 individus amb edats compreses entre els 63 i els 97 anys, es va confirmar que, dels indicadors investigats, (la cobalamina, l'HoloTC, la tHcy i el MMA) com a marcadors de deficiència en cobalamina

(cobalamina eritrocitària < 33 pmol/L), l'HoloTC era el millor indicador en aquest estrat de la població³⁰¹.

Hi ha, però, una escassetat de dades sobre la relació de les concentracions de cobalamina, folats, HoloTC, tHcy i MMA i les seves interrelacions entre la població general. Molts dels estudis en gent gran estan basats en grups de pacients/participants sense conèixer si són representatius de la població general; o són basats en la població, però amb exclusions bastant extenses, per diverses raons, fent que la representativitat dels resultats es pugui veure alterada, dificultant la comparació dels resultats de diferents estudis.

Un exemple d'aquestes limitacions es troba en tres estudis realitzats a Nova Zelanda. En el més recent, realitzat al 1991, hi van participar²⁷⁷ 257 individus \geq 65 anys. Un cop exclosos el 2,4% d'individus que prenién suplementes de cobalamina, es va observar que el 7,3% presentaven baixes concentracions de cobalamina (< 114 pmol/L). En dos estudis anteriors fets en la mateixa regió, es va observar que el 3% tenia baixes concentracions (cobalamina < 162 pmol/L), més d'un terç de la població estudiada prenia suplementes³⁰², i en l'estudi en què la població estava formada per individus ingressats en geriàtrics, el 23% presentaven baixes concentracions (cobalamina < 135 pmol/L)³⁰³.

La importància de l'estat en cobalamina es desgrana en diferents sectors de la població. Com a punt comú, s'ha de considerar el factor genètic, en el qual diferents polimorfismes poden afectar la biodisponibilitat de la cobalamina. Com a fet diferencial, l'assoliment de les necessitats actuals. Les ingestes diàries recomanades augmenten amb l'edat, i consideren la gent gran com sector diana vulnerable a la deficiència en cobalamina. Per altra banda, donen especial importància a l'embaràs i la lactància, i converteixen en objectiu col·lateral la necessitat d'un bon estat en cobalamina en les dones d'edat fèrtil. En aquest entramat, hi ha dues peces clau que cal considerar en valorar l'estat en cobalamina de la població, l'ús de multivitamínics i l'aplicació de la fortificació obligatòria amb àcid fòlic.

9. LA COBALAMINA AL LLARG DE L'EMBARÀS

Per facilitar la lectura i comprensió d'aquest apartat s'han resumit de forma esquemàtica les característiques principals dels estudis citats. La informació s'ha dividit en dues taules per tal de diferenciar els estudis en què s'analitza la cobalamina plasmàtica durant l'embaràs (**Taula 7**), dels que es centren més en l'estat en cobalamina mare-cordó (**Taula 8**).

L'embaràs es caracteritza per molts canvis fisiològics, l'objectiu i significat de molts dels quals encara no s'entenen del tot. En els últims anys diferents estudis han intentat descriure els canvis de l'estat en cobalamina durant l'embaràs. Una limitació important és la falta de concentracions de referència específiques per l'embaràs, i s'ha comprovat que l'ús de la població com a referència pot ser inapropiat³⁰⁴. S'ha observat que la concentració de cobalamina sèrica en les embarassades pot arribar a ser, ja en el primer trimestre, inferior respecte a la de les dones no embarassades^{305,306,307}. Aquest fet es va confirmar en l'estudi fet per Murphy i els seus col·laboradors³⁰⁸, en el qual els controls eren les mateixes embarassades en la preconcepció. En el primer trimestre, les concentracions plasmàtiques de cobalamina ja eren inferiors que en la preconcepció. Fins i tot s'ha observat que en gestants, les concentracions de cobalamina sèrica en resposta a la suplementació amb 150 µg de cobalamina injectada, segueixen sent inferiors a les concentracions que es troben fora de l'embaràs³⁰⁹.

Tot i trobar estudis en gestants sanes, no vegetarianes, en els quals no s'observin signes de deficiència funcional³⁰⁸, la concentració de la cobalamina sèrica disminueix al llarg de l'embaràs^{306,310,311,312}. Estudis longitudinals durant l'embaràs han mostrat, fins i tot en dones amb un bon estat nutricional, una disminució gradual aproximadament del 30% en cobalamina sèrica, entre el primer i el tercer trimestre^{304,308}. Baker i els seus col·laboradors³⁰⁷ van observar una disminució més marcada de l'estat en cobalamina a la segona meitat de l'embaràs, però cal considerar que tot i recollir mostres dels tres trimestres d'embaràs, les gestants eren diferents en cada punt. Aquesta disminució progressiva es considera en la majoria de casos com un fet fisiològic, assumint un augment de les necessitats de cobalamina ja en les primeres setmanes de gestació, per l'augment de l'eritropoesi materna i embrio-fetal³¹³. Però hi ha embarassades en les quals la disminució arriba a concentracions properes a la deficiència, sobretot, en el tercer trimestre^{304,309,314} i es desconeix si això representa una exageració de la caiguda fisiològica o bé una deficiència a nivell dels teixits.

Deficiències clínicament significatives només s'han documentat en embarassades amb dietes tradicionalment vegetarianes^{315,316} amb concentracions de cobalamina sèrica entre 66-96 pmol/L^{317,318,319}. Tot i això, la deficiència en cobalamina definida com a baixa concentració d'aquesta es pot arribar a donar en el 10-28% dels embarassos normals³²⁰.

En una embarassada tant amb un patró alimentari mediterrani com occidentalitzat, la ingesta total de cobalamina en l'embaràs es troba al voltant dels 2800 µg³²¹ amb una mitjana d'absorció aproximada de 1568 µg³⁷. En l'embaràs els requeriments de la gestant, basats en la *ingesta diària recomanada* (IDR)⁵⁴, i del fetus són de 728 µg i 84 µg^{322,323} respectivament. Aquest fet permet assumir que el primer embaràs monofetal té un impacte mínim en les reserves maternes, calculades en uns 3000 µg de cobalamina^{324,325}. No obstant, dones que inicien l'embaràs amb baixes reserves d'aquesta vitamina podrien tenir problemes en proporcionar-ne suficient quantitat al fetus^{306,326,327,328,329,330}. A més cal considerar el posterior període de lactància, on el cost de cobalamina materna és fins i tot major que durant l'embaràs^{54,331} (**Taula 6**).

En un estudi realitzat a la Xina, en què s'analitzava l'estat en cobalamina en dones durant l'any anterior a la concepció, es va observar que les dones amb concentracions preconceptionals de cobalmina < 258 pmol/L, tenien el 60% més de risc de tenir un part preterme respecte a les que presentaven concentracions ≥ 258 pmol/L³³². Relacionat amb aquest fet, en un estudi realitzat a l'Índia³³³, en el que es van recollir mostres de sang dels tres trimestres d'embaràs, es va observar que, en el segon trimestre, el fet d'estar en el tercil baix de cobalamina (cobalamina sèrica ≤ 122 pmol/L) respecte al tercil alt (cobalamina sèrica ≥ 240 pmol/L) augmentava el risc de creixement intrauterí retardat fins a 9 vegades. Aquesta relació no sempre és tan clara i es poden donar resultats discrepants. Si es compara l'estat en cobalamina sèrica de l'estudi fet a l'Índia amb el d'un estudi realitzat als Països Baixos³³⁴, en què no s'observa una relació entre la cobalamina plasmàtica al tercer trimestre i pes al néixer, s'observa que la mediana [interval de confiança 95%] de cobalamina sèrica de l'estudi holandès 179 [134-219] pmol/L, és més proper a l'estat en cobalamina de les gestants del tercil alt 182 [169-210] pmol/L de la mateixa fase de l'embaràs de l'estudi indi. És probable, doncs, que l'estat en cobalamina als Països Baixos no sigui suficientment baix com per presentar un risc de creixement intrauterí retardat. També cal considerar que, en poblacions amb baixa ingesta d'aliments rics en cobalamina, la poca variabilitat i el baix estat en cobalamina entre les gestants, poden reduir les possibilitats d'identificar una relació amb el pes al néixer³³⁵.

Taula 6. Estimació^a de la cobalamina necessària durant l'embaràs (40 setmanes) i en la lactància de 6 mesos i 1 any

EMBARÀS (280 dies)	
Cobalamina necessària	
Embarassada IDR 2,2-2,6 µg/dia	(2,6 x 280) = 728 µg
Fetus necessitats 0,1-0,3 µg/dia	(0,3 x 280) = 84 µg
Cost total: (728 + 84)	812 µg
Consum de cobalamina	
Ingesta en la dieta 9-10 µg/dia ³²¹	(10 x 280) = 2800 µg
Mitjana d'absorció de 10 µg ³⁷ (56%)	1568 µg
LACTÀNCIA (180 dies)	
Cobalamina necessària	
Composició de la llet 0,6- 1 µg/L ^b	(1 x 180) = 180 µg
Lactants IDR 2,6-2,8 µg/dia	(2,8 x 180) = 504 µg
Cost total: (180 + 504)	684 µg
Consum de cobalamina	
Ingesta en la dieta 9-10 µg/dia	(10 x 180) = 1800 µg
Mitjana d'absorció de 10 µg (56%)	1008 µg
LACTÀNCIA (360 dies)	
Cobalamina necessària	
Composició de la llet 0,6- 1 µg/L ^b	(1 x 360) = 360 µg
Lactants IDR 2,6-2,8 µg/dia	(2,8 x 360) = 1008 µg
Cost total: (360 + 1008)	1368 µg
Consum de cobalamina	
Ingesta en la dieta 9-10 µg/dia	(10 x 360) = 3600 µg
Mitjana d'absorció de 10 µg (56%)	2016 µg
BALANÇ DE LA COBALAMINA INGERIDA I LA NECESSÀRIA	
Embaràs i lactància (6 mesos)	
Ingesta (1568 + 1008) µg - Necessitats (812 + 684) µg = 1080 µg	
Embaràs i lactància (1 any)	
Ingesta (1568 + 2016) µg - Necessitats (812 + 1368) µg = 1404 µg	

^aEn trobar dades en rangs s'ha agafat sempre el valor més elevat; ^bValors basats en volums de 600-1000 mL/dia. IDR, ingesta diària recomanada.

L'estudi sobre la nutrició materna fet a l'Índia (Pune Maternal Nutrition Study) amb dones que, majoritàriament, presentaven dieta vegetariana, va ser el primer estudi que va investigar la relació entre l'estat en cobalamina i folats de la gestant, i el risc que el nounat pateixi diabetis tipus 2 i malaltia cardiovascular²²². Es va observar que, en el segon trimestre, el baix estat en cobalamina en les embarassades (cobalamina plasmàtica < 150 pmol/L) predisposava tant les gestants com els seus nounats a l'adipositat excessiva i a la resistència a la insulina, factors de risc per a la diabetis tipus 2. Els nounats que presentaven riscos més accentuats eren els procedents de mares que, a més de baix estat en cobalamina presentaven elevat estat en folats^{222,336}.

Tot i el clar efecte de l'hemodilució durant l'embaràs, aquest no explica del tot la disminució de la cobalamina plasmàtica^{308,337,338}. Per altra banda, la paritat³³⁹ i l'edat materna^{304,340}, s'associen amb l'empitjorament de l'estat en cobalamina. S'ha trobat associació entre paritat i edat materna tant en l'estat en cobalamina matern com dels nounats³²⁶. Respecte a les dones nul·lípare, les que han passat tres embarassos anteriors, presenten concentracions de cobalamina sèrica inferiors durant tot l'embaràs³¹⁰. Hi ha estudis en què la paritat i/o l'edat materna no s'associen amb l'estat en cobalamina, però, en aquests casos, s'ha de considerar que el nombre de gestants estudiades era petit i podria faltar potència estadística suficient per a detectar una associació. Una altra limitació es dóna en el cas d'un rang estret de paritat³³⁷ o d'edat materna, fet que no permetria trobar diferències^{309,341}.

Hi ha informes sobre les fluctuacions de l'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs basats en estudis transversals, que consideren diferents gestants en cada punt analitzat de l'embaràs^{342,343} i inclús s'han barrejat punts transversals amb algun seguiment longitudinal³¹⁰. En no comparar mostres de diferents punts de l'embaràs de la mateixa gestant, sinó de gestants diferents, s'ha arribat a concloure que la concentració sèrica de cobalamina no disminueix a mesura que progressa l'embaràs.

Les mesures de MMA^{222,314}, tHcy^{312,338} i HoloTC^{308,339}, metabòlits relacionats amb vies dependents de cobalamina i el seu transport, s'han utilitzat per a investigar la deficiència de la vitamina a nivell funcional. El fet de determinar les setmanes gestacionals en les quals es fa l'extracció és important, ja que, investigar l'associació entre metabòlits i cobalamina és difícil en un sol anàlisi en el que les mostres sanguínies engloben diferents fases de l'embaràs^{344,345}. Hi ha poques evidències de deficiències funcionals associades a un estat baix en cobalamina en els dos primers trimestres^{344,345}, però, en canvi, s'han trobat concentracions baixes de cobalamina sèrica, en el tercer trimestre juntament amb un augment de tHcy i MMA, fet que suggereix que la deficiència subclínica pot aparèixer en aquest punt, particularment en mares amb dietes inadequades³³⁸. El MMA plasmàtic augmenta a partir de mig embaràs, tot i que es manté la influència de l'hemodilució que causa la seva disminució a principis d'embaràs³⁰⁸. Amb l'absència de l'hemodilució es preveu que la concentració del MMA plasmàtic seria més elevada.

L'HoloTC plasmàtica disminueix en aproximadament un 24% durant la primera meitat de l'embaràs. A partir d'aleshores, tot i la continuada tendència a la reducció de la cobalamina plasmàtica, la concentració d'HoloTC es manté estable³⁰⁸. Morkbak i els seus col·laboradors³⁴⁶ van afirmar que les concentracions d'HoloTC no variaven en tot

l'embaràs. No obstant, en iniciar l'estudi a partir de les 18 setmanes de gestació no van observar la disminució inicial. L'estabilitat de l'HoloTC plasmàtica durant la fase de l'embaràs en la que l'estat matern en cobalamina està més estressat, podria ser conseqüència d'un possible mecanisme compensatori per tal d'assegurar que hi hagi suficient aportació de cobalamina al fetus en el tercer trimestre. El fet que, a diferència d'altres indicadors sèrics d'estat en cobalamina, la concentració d'HoloTC es mantingui estable al final de l'embaràs^{308,346}, ha propiciat que es consideri com un bon predictor per l'estat en cobalamina del nounat³³⁹.

Tot i que en les fluctuacions de cobalamina plasmàtica podria influir l'ús de suplementes amb cobalamina, la majoria d'estudis recents no han considerat aquest fet. Si hi ha o no suplementació, durant quant de temps i la dosi implicada donen informació precisa que pot explicar les diferents concentracions trobades³⁴⁷. Moltes vegades algun d'aquests paràmetres no ha estat controlat i això pot dificultar la interpretació dels resultats. Diferents estudis d'intervenció han mostrat que la cobalamina plasmàtica segueix la tendència a disminuir durant l'embaràs, tot i l'ús exclusiu de suplementes amb àcid fòlic, 5 mg, o cobalamina, 25³¹⁰ o 50 µg³⁴⁸. En presència de suplementació combinada d'àcid fòlic i cobalamina, sí que es redueix la baixada en cobalamina plasmàtica, però si s'inicia durant el tercer trimestre l'estat en cobalamina no respon a la suplementació³⁴⁹, probablement perquè l'inici es massa tardà.

Les concentracions maternes de cobalamina sèrica i plasmàtica es recuperen en el postpart^{314,337,348,350}. S'ha calculat que l'augment de cobalamina és d'uns 3,3 pmol/L per dia postpart³⁰⁹, fet que la recuperació sigui evident sempre i quan les determinacions no es facin en un període massa curt, com ara una setmana postpart³⁵¹. Tot i la recuperació palesa, l'efecte de la lactància pot contribuir de forma rellevant en la disminució de l'estat en cobalamina al postpart³⁵².

Les concentracions de cobalamina sèriques i plasmàtiques maternes i dels cordons dels nounats, estan altament correlacionades. Així, en un estudi fet al Brasil, es va observar que la concentració en nounats de mares del quartil baix de cobalamina, és inferior als nounats de mares del quartil alt³⁵³. Tot i això, la concentració de cobalamina en els nounats és major^{308,309,326,341,354,355,356,357} i arriba a augmentar fins a 4 vegades les concentracions maternes³⁵⁸, fet que es considera indicatiu del pas d'aquesta vitamina de la gestant al fetus^{359,360}. S'han trobat en el còrion placentari concentracions de cobalamina, fins i tot, més elevades que les trobades en els nounats^{361,362}. Pel que fa al transport, s'han fet paleses concentracions d'HoloTC majors en els cordons dels nounats que en les gestants^{166,308}.

El pes del nounat s'associa negativament a la concentració de cobalamina plasmàtica, ja que els nounats més grans tenen pitjor estat en aquesta vitamina³³⁹. Però la correlació entre concentració de cobalamina al cordó i el pes al néixer es perd en nounats d'edat gestacional ≥ 40 setmanes. S'ha suggerit que, a partir de les 40 setmanes gestacionals, la placenta podria començar a degradar-se i perdre part de la seva funcionalitat, per la qual cosa es perdria la relació pes-cobalamina³⁵⁷. Sigui quina sigui l'explicació, el pes al néixer no està associat a l'estat en cobalamina als 6 mesos, fet que suggereix que un elevat pes al néixer no és un factor de risc per baix estat en cobalamina més tard en la infància³³⁹. L'estat en cobalamina en els nounats no presenta efecte en la velocitat de creixement d'aquests³⁴¹.

Diferents estudis han observat que la concentració de tHcy en el cordó és inferior a la de les gestants^{363,364,365}. La falta de diferència en la tHcy mare-cordó, observada en un estudi fet per Pardo i els seus col·laboradors³⁶⁶, podria ser deguda a la falta de potència estadística conseqüència de l'anàlisi d'un petit nombre de gestacions. Pel que fa al MMA plasmàtic, la concentració en el cordó és major a la concentració de la gestant en el moment del part, tot i que l'estat en cobalamina del cordó és més elevat^{166,308,363}. Una de les explicacions de les elevades concentracions de MMA trobades en el cordó podria ser la necessitat de satisfer l'alta taxa metabòlica durant la vida postnatal³⁵⁶. A més la presència de receptors de lipoproteïnes³⁶⁷ i activitats lipasa³⁶⁸ en la placenta facilita que els àcids grassos presents en els triglicèrids plasmàtics materns passin al fetus.

Contràriament a l'estat en cobalamina matern després del part, s'ha observat que, durant les primeres 6 setmanes, l'estat en els nounats disminueix, fet acompanyat per l'augment en el MMA plasmàtic i la tHcy. Aquest augment és més accentuat en els nounats amb concentracions de cobalamina < 150 pmol/L³⁶⁹. Bjorke-Monsen i els seus col·laboradors³⁷⁰ van observar que en nounats de 6 setmanes, la suplementació amb injeccions intramusculars de cobalamina va aconseguir corregir tant les elevades concentracions plasmàtiques de MMA com de tHcy. Aquest fet recolza l'argument que l'alta incidència d'elevades concentracions plasmàtiques de MMA i tHcy, està relacionada amb el baix estat en cobalamina tot i que no es pot descartar que pugui ser un fet comú en el període neonatal³⁶⁹.

Taula 7. Estudis en què s'analitza la cobalamina plasmàtica durant l'embaràs

Autor/any	Lloc	Participants	Estudi Longitudinal	Recollida de la mostra (tipus de mostra)	Suplementació	Punts de tall baix estat Cbl
Boger WP, 1956 ³⁰⁵	Estats Units	502 ^a	No	181-270 dies, 91-180 dies i 0-90 dies abans del part (Sèrum)	ND (Exclusió de dones que revien injeccions amb B ₁₂)	< 73,8 pmol/L
Erdberg MR, 1958 ³⁵¹	Estats Units	13 ^a	Si	3r trimestre 1a setmana postp (Sèrum)	No	ND
Young JE, 1959 ^{b310}	Estats Units	105 ^a	No	13, 26 i 39 SG (Sèrum)	ND	ND
Young JE, 1959 ^{c310}	Estats Units	75 ^a (< 17 SG)	Si	Cada mes fins a les 27 SG Cada 3 setmanes entre les 27-32 SG Cada 2 setmanes entre les 32-36 SG Cada setmana a partir de les 36 SG (Sèrum)	Grup A ¹ : no suplementació Grup B ¹ : 25 µg B ₁₂ /dia Grup C ¹ : 100 µg B ₁₂ /dia Grup D ¹ : 5 mg àcid fòlic/dia Grup E ¹ : (5 mg àcid fòlic + 25 µg B ₁₂)/dia	ND
Lowenstein L, 1960 ^{b309}	Canadà	30 ^a	No	1r, 2n i 3r trimestre (Sèrum)	ND	ND
Lowenstein L, 1960 ^{c309}	Canadà	45 ^a	No	Abans del part Dies 1 i 2, 4, 8 i 21 postp (Sèrum)	ND	ND
Lowenstein L, 1960 ^{d309}	Canadà	9 ^a	Si	3r trimestre, abans de la injecció 7 i 15-16 dies després de la injecció (Sèrum)	Injecció amb 150 µg de B ₁₂ al 3r trimestre	ND
Metz J, 1965 ³⁴⁸	Sud-àfrica	175 ^a	Si	Durant embaràs: intervals de 4 setmanes 6 setmanes postp (Sèrum)	Grup 1: 200 mg ferro/dia Grup 2: suplementació grup 1 + 5 mg àcid fòlic/dia Grup 3: suplementació grup 2 + 50 µg B ₁₂ /dia	< 158 pmol/L
Edelstein T, 1968 ³⁴⁹	Sud-àfrica	396 ^a	No	32-40 SG Dins de les 48 h postp 6 i 12 setmanes postp (Sèrum)	Suplementació de les 28st fins al part Grup àcid fòlic: (5 mg d'àcid fòlic + 200 mg ferro)/dia Grup Cbl: (50 µg B ₁₂ + 5 mg d'àcid fòlic + 200 mg ferro)/dia Grup ferro: 200mg ferro/dia	ND
Temperley IJ, 1968 ³⁰⁶	Irlanda	155 ^a	Si	10-24, 32, 36 SG Al part (Sèrum)	ND	< 150 pmol/L
Brabin BJ, 1986 ³⁴²	Kenya	291 ^a	No	A la 1a visita prenatal (SG independent) (Sèrum)	No <i>Dieta basada en blat de moro i iuca</i>	< 125 pmol/L
Van den Berg, 1988 ³³⁷	Holanda	70 ^e	Si	16, 34 SG Al part 6 setmanes i 6 mesos postp (Sèrum)	ND	< 180 pmol/L
Bartels PC, 1989 ³¹¹	Països Baixos	23 ^a	Si	12, 20, 28 i 36 SG (Sèrum)	ND	ND

(Continua a la pàgina següent)

Autor/any	Lloc	Participants	Estudi Longitudinal	Recollida de la mostra (tipus de mostra)	Suplementació	Punts de tall baix estat Cbl
Allen LH, 1995 ³⁵²	Mèxic	42 ^a	Si	Durant els mesos 5-8 Als 7 mesos de lactància (Plasma)	No	< 74 pmol/L
Bruinse HW, 1995 ³⁵⁰	Països Baixos	70 ^a	Si	16, 28 i 34 SG 6 dies, 6 setmanes i 6 mesos postp (Sèrum)	No	ND
Gadowsky SL, 1995 ³⁴⁷	Canadà	58 ^{a,f}	No	Entre les 32-34 SG (Plasma)	82% embarassades van consumir suplementes Consum mig diari en suplementes: 479 µg àcid fòlic, 31 mg ferro i 2 µg B ₁₂	≤ 148 pmol/L
Metz J, 1995 ³⁴⁴	Austràlia	75 ^a	No	Entre les 12-40 SG (Sèrum)	NO suplementació amb B ₁₂	< 148 pmol/L
Pardo J, 2000 ³⁴⁵	Israel	64 ^e	No	Entre 11-14 SG (Sèrum)	ND	≤ 100 pmol/L
Bondevik GT, 2001 ³⁴³	Nepal	328 ^a	No	A la 1a visita prenatal (SG independent) (Sèrum)	ND <i>Predomini dieta vegetariana</i>	< 150 pmol/L
Berg MJ, 2001 ²⁵⁹	Estats Units	15 ^a	Si	2n i 3r trimestre 4 i 6 mesos postp (Sèrum)	Consum mig diari en suplementes: Embaràs: 905 µg àcid fòlic i 4 µg B ₁₂ Postp: 314 µg àcid fòlic i 1,7 µg B ₁₂	< 111 pmol/L
Baker H, 2002 ³⁰⁷	Estats Units	563 ^a	No	1r, 2n i 3r trimestre ND	Diàriament un multivitamínic amb 12 µg B ₁₂ + 1 mg d'àcid fòlic	ND
Koebnick C, 2002 ³⁰⁴	Alemanya	39 ^e	Si	9-12, 20-22 i 36-38 SG (Sèrum)	31% embarassades van prendre suplementes amb B ₁₂ i el 44% amb àcid fòlic	< 150 pmol/L
Chéry C, 2002 ³³⁸	França	15 ^a	Si	4t, 6è i 9è mes d'embaràs (Sèrum)	No	ND
Barón MA, 2003 ³¹³	Veneçuela	122 ^{a,f}	No	En el 1r control d'embaràs (< 14st SG) (Sèrum)	No	< 150 pmol/L
Koebnick C, 2004 ³¹⁵	Alemanya	109 ^e	No	9-12, 20-22 i 36-38 SG (Sèrum)	27% embarassades van prendre suplementes amb B ₁₂ i el 35% amb àcid fòlic <i>Tipus de dieta: 25% embarassades ovo-lacto-vegetariana, 39% màxim 2 porcions carn/setmana i 36% ingesta diària de carn</i>	< 130 pmol/L ⁹
García-Casal MN, 2005 ³⁴⁰	Veneçuela	1289 ^a	No	1r, 2n i 3r trimestre (Sèrum)	ND	< 148 pmol/L
Yajnik CS, 2005 ³³⁵	Índia	80 ^e	No	28 SG (Plasma)	A partir de les 18 SG consum diari de 60 mg ferro i 0,5 mg d'àcid fòlic (50% població vegetariana)	< 150 pmol/L
Muthayya S, 2006 ^{333,357}	Índia	478 ^e	Si	12, 24 i 34 SG (Sèrum)	Cada dia: 60mg ferro + 500µg àcid fòlic	ND
Milman N, 2006 ³¹⁴	Dinamarca	406 ^a	Si	18, 32 i ,39 SG 8 setmanes postp (Plasma)	No	< 150 pmol/L

(Continua a la pàgina següent)

Autor/any	Lloc	Participants	Estudi Longitudinal	Recollida de la mostra (tipus de mostra)	Suplementació	Punts de tall baix estat Cbl
Takimoto H, 2007 ³¹²	Tòquio	94 ^e	Si	7-14, 26-29 i 34-36 SG (Sèrum)	4% embarassades van prendre suplementes d'àcid fòlic al primer trimestre i un 5% als segon	ND
Murphy MM 2004 ³⁶⁴ i 2007 ³⁰⁸	Espanya	92 ^e (dones amb intenció de quedar-se embarassades)	Si	Pregestacional: 7-12 dies cicle menstrual 8, 20 i 32 SG Treball de part Sang de cordó (Plasma)	NO en la precepció ni en el 1r trimestre 73% embarassades no van prendre suplementació amb B ₁₂ 1% embarassades a partir de les 20 SG i un 26% a partir de les 32 SG van prendre suplementes amb 5-10 µg de B ₁₂	< 150 pmol/L
Morkbak AL, 2007 ³⁴⁶	Dinamarca	141 ^a	Si	18, 32 i 39 SG 8 setmanes postp (Plasma)	ND	ND
Yajnik CS, 2008 ²²²	Índia	797 ^e	Si	18 i 28 SG (Plasma)	A partir de les 18st els donen diàriament 60 mg ferro i 500 µg d'àcid fòlic <i>No ingesta de carn, peix ni ous: 33% 18 SG, 38% 28 SG</i>	< 150 pmol/L
Baker PN, 2009 ²⁶¹	Regne Unit	293 ^{e,f}	No	3r trimestre (Sèrum)	Suplementació preconcepcional amb àcid fòlic 7%, fins a les 20 SG 44% àcid fòlic, ferro 8% i multivitamines 4% i només a partir de les 28 SG 2% àcid fòlic, 15% ferro i 2% multivitamines	ND
Krishnaveni GV, 2009 ³³⁶	Índia	774 ^e	No	30 SG (Plasma)	31% embarassades van prendre suplementes amb B ₁₂ i 8% suplementes amb àcid fòlic	< 150 pmol/L

ND, no hi ha dades disponibles; SG, setmanes gestacionals; postp, postpart; ^aND sobre l'exclusió de bessons; ^bprimer estudi de l'article; ^csegon estudi de l'article; ^dquart estudi de l'article; ^ebessons exclosos; ^fadolescents amb una mitjana d'edat de 17 anys; ⁹1r trimestre < 130 pmol/L, 2n trimestre < 120 pmol/L i 3r trimestre < 100 pmol/L; ¹cada grup està format per 15 gestants.

Taula 8. Estudis en què s'analitza la cobalamina plasmàtica tant durant l'embaràs com en el nounat*

Autor/any	Lloc	Participants	Mostra materna (tipus mostra)	Mostra nounat (tipus mostra)	Suplementació
Okuda K, 1956 ³⁵⁹	Estats Units	25	Part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Ziffer H, 1958 ³⁵⁴	Estats Units	113	Part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Lowenstein L, 1960 ³⁰⁹	Canadà	100	Poques hores després part i/o entre 12-22 hores postp (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Baker H, 1975 ³⁵⁸	Estats Units	174	Part (Plasma)	Cordó (Plasma)	77% prenen suplement amb 5-8 µg B ₁₂ i 0,5-1,5 mg àcid fòlic
Giugliani ER, 1985 ³⁶²	Brasil	51	Postp, després expulsió placenta (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	51% suplementació amb B ₁₂ No suplementació amb àcid fòlic
Abbas A, 1994 ³⁶⁰	Regne Unit	75	Just abans de la mostra del nounat (Sèrum)	Cordó ^a (Sèrum)	ND
Bjorke-Monsen AL, 2001 ³⁶⁹	Noruega	169	96-108h postp (Sèrum)	Nounat 96-108h postp (Sèrum)	63% embarassades no suplementades, 18% prenen suplement diàriament, i 18% entre 2-3 dies a la setmana (el 74% dels suplement portaven B ₁₂)
Guerra-Shinohara EM, 2002 ³⁵³	Brasil	69	8h abans del part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Molloy AM 2002 ³⁵⁵ i 2005 ³⁶⁵	Irlanda	201	Just després part (Plasma)	Cordó (Plasma)	ND
Schulpis K, 2004 ²⁶⁰	Grècia	1025 gregues 908 albaneses (immigrants a Grècia)	Just després part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	No hi ha suplementació excepte amb ferro 1-2 mesos abans del part
Pardo J, 2004 ³⁶⁶	Israel	32	Part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Guerra-Shinohara EM, 2004 ³⁶³	Brasil	119	12h abans part (Sèrum)	Placenta (Sèrum)	Infreqüent suplementació amb B ₁₂

(Continua a la pàgina següent)

Autor/any	Lloc	Participants	Mostra materna (tipus mostra)	Mostra nounat (tipus mostra)	Suplementació
Obeid R, 2005 ³⁵⁶	Alemanya	82	1-12h abans part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	17% embarassades prenen suplement amb àcid fòlic
Relton CL, 2005 ³²⁶	Regne Unit	504 ^b	A la 1a visita prenatal (mitjana 11,5 SG) (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Muthayya S, 2006 ³⁵⁷	Índia	185	12, 24 i 34 SG (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	Cada dia: 60mg ferro + 500µg àcid fòlic
Obeid R, 2006 ¹⁶⁶	Alemanya	92	1-12h abans part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	19% embarassades prenen suplement amb àcid fòlic, cap prenia suplement amb B ₁₂
Koc A, 2006 ³²⁷	Turquia ^c	180	Entre 1-3h abans part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	71% embarassades no suplementades, 6% suplementades amb ferro i 19% amb multivitamínics (4% ND)
Hussein L, 2009 ³⁴¹	El Caire	84	Després part (Sèrum)	Cordó (Sèrum)	ND
Hay G, 2010 ³³⁹	Noruega	364	Entre 17-19 SG (Plasma)	Cordó (Sèrum)	51% embarassades prenen suplement amb àcid fòlic i el 54% amb B ₁₂
Hogeveen M, 2010 ³³⁴	Països Baixos	366	30-34 SG (Plasma)	Cordó (Plasma)	57% embarassades prenen suplement amb àcid fòlic

ND, no hi ha dades disponibles; Postp, postpart; SG, setmanes gestacionals.^a22 mostres obtingudes per cordocentesi; ^bnomés el 32% de les mares s'han analitzat amb els seus corresponents nounats; ^cestudi fet en una àrea amb alta prevalença de deficiència en cobalamina, el vegeterianisme és rar però hi ha la creença que la carn és dolenta en l'embaràs i la lactància.

*Els estudis de Murphy MM^{308,364} tot i disposar de sang de cordó s'ha considerat incloure'ls en la taula on s'analitzen els valors de la cobalamina al llarg de l'embaràs, perquè a més de disposar de mostres dels tres trimestres també disposen d'una mostra pregestacional.

9.1.- Estat en cobalamina, infertilitat i complicacions en l'embaràs

L'anèmia perniciosa és una causa establerta d'infertilitat^{371,372,373}, i la deficiència clínica en cobalamina s'ha associat amb avortaments en etapes molt inicials de l'embaràs^{374,375}. Tot i que severes insuficiències en cobalamina són inusuals entre les embarassades no vegetarianes, la prevalença global de baix estat en cobalamina entre dones i nens podria ser major del que es pensava inicialment. En els estudis poblacionals de prevalença de deficiència en cobalamina, les embarassades i els nens estan infrarepresentats davant els adults i la gent gran³⁷⁶. En un estudi realitzat a Canadà en dones d'edat fèrtil, es va concloure que 1 de cada 20 dones podria començar l'embaràs amb concentracions deficientes de cobalamina sèrica (< 125 pmol/L)³⁷⁷. Diferents estudis han considerat els efectes de la deficiència nutricional en cobalamina en la salut tant de les mares com dels seus nounats, considerant, entre altres aspectes, casos preterme³³², baix pes al néixer³⁵⁷ o defectes del tub neural (DTN)^{378,379}.

Estudis realitzats el 1951 ja van trobar relació entre el baix estat en cobalamina de la gestant i casos d'hidrocefàlia, en els quals la seva prevenció no era eficaç amb tractament únic amb àcid fòlic, però sí, amb la suplementació amb cobalamina^{380,381,382}. Investigant la causa dels DTN, es van trobar concentracions de cobalamina sèrica molt baixes en mares amb fetus amb anencefàlia³⁸³, així com en casos d'omfalocèle³⁸⁴ (**Taula 9**). S'ha suggerit la deficiència en cobalamina com a factor de risc per als DTN, tant per l'estreta relació metabòlica entre la cobalamina i els folats, com per la influència de l'estat en cobalamina sobre les concentracions de tHcy.

Tot i que comparar estudis és complex, entre d'altres, a causa de les diferències en la mida de la mostra, la selecció de casos i controls i els mètodes de mesura de la cobalamina, un gran nombre d'estudis han trobat que les gestants amb baix estat en cobalamina tenen un risc més elevat de tenir nounats amb DTN^{385,386,387,388,389,390,391} (**Taula 9 i 10**). Aquest risc és més pronunciat quan, per a definir estat normal i no normal de cobalamina, s'utilitzen punts de tall més extrems, com ser al quartil de cobalamina sèrica més baix respecte a ser al quartil més alt^{385,390}. Aquest augment del risc, però, es pot veure infravalorat pel fet d'estudiar l'estat de la mare ja en el postpart^{392,393}, per la suplementació de la població estudiada³⁸⁸ o bé per la baixa potència associada a una mostra petita³⁹⁴ (**Taules 9 i 10**).

No obstant això, l'associació entre insuficiència de cobalamina materna i risc de DTN es manté, fins i tot, quan es controlen factors de risc materns com ara l'estat en folats^{388,390,395,396,397} (**Taula 10**). Un elevat estat en folats pot encobrir signes de

deficiència en cobalamina³⁹⁸, així l'excés del consum d'àcid fòlic en presència de deficiència materna en cobalamina, podria emmascarar les manifestacions hematològiques (megaloblasts) i bioquímiques (hiperhomocisteïnèmia).

Dos estudis realitzats als Estats Units³⁸⁸ i al Canadà³⁹⁶, en els quals durant la realització del treball de camp es va donar la implementació de la fortificació obligatòria de la farina amb àcid fòlic, van trobar el triple de risc de tenir nounats amb DTN en les mares del quintil més baix respecte al més alt en cobalamina³⁸⁸ o en el quartil més baix respecte al més alt d'HoloTC³⁹⁶. Donat que la política de fortificació obligatòria amb àcid fòlic no resulta en una protecció absoluta contra els DTN, altres factors que podrien estar implicats serien factors genètics³⁹⁹ i el baix estat nutricional en cobalamina. Aquest és un dels motius de proposar que l'addició de cobalamina als suplementes d'àcid fòlic o, fins i tot, als aliments fortificats podria reduir més el risc de DTN³⁹⁶ (**Taula 10**). Fora de l'embaràs, un estudi fet a Irlanda amb 30 homes i 23 dones sans, d'entre 34-65 anys, va mostrar que després de la reducció de tHcy amb àcid fòlic, la cobalamina és el principal determinant de la tHcy. Aquest resultat va portar als autors a suggerir que les polítiques de fortificació basades en l'àcid fòlic, podrien ser més efectives amb la inclusió de la cobalamina⁴⁰⁰ (vegeu l'apartat "*Interaccions folat-cobalamina i polítiques de fortificació*").

En analitzar l'efecte de l'estat en cobalamina sobre el risc de DTN, els estudis que consideren les primeres setmanes d'embaràs^{385,391}, molt properes a les etapes finals de tancament del tub neural, entre la 3a i 4a setmana de gestació, observen un augment de 5 vegades el risc de DTN, mentre que els estudis que comencen a finals del primer i, sobretot, del segon trimestre, observen un augment del risc triplicat^{390,401}. Si l'anàlisi es fa a les poques setmanes postpart, la relació observada es mostra encara més feble³⁸⁸ (**Taula 10**). Tot i que molts investigadors no troben diferències en les concentracions de cobalamina, plasmàtiques o sèriques, entre casos i controls^{394,401,402,403,404,405,406} (**Taules 9 i 10**), s'ha observat com la mitjana de cobalamina és consistentment inferior en el líquid amniòtic dels embarassos afectats per DTN, respecte als embarassos normals^{384,407,408,409} (**Taula 9**). Les concentracions de cobalamina en el líquid amniòtic són majoritàriament més altes que les presents a nivell plasmàtic. Steegers-Theunissen i els seus col·laboradors⁴⁰⁴ van observar com en mostres de sang recollides al segon trimestre, tant les gestants amb nounats amb DTN com les gestants controls, presentaven concentracions de cobalamina sèriques (casos: 219 pmol/L, controls: 238 pmol/L) inferiors a les concentracions presents en el líquid amniòtic (casos: 379 pmol/L, controls: 481 pmol/L). Es consideren com a possibles explicacions tant la síntesi de cobalamina en la placenta, com l'excreció renal d'aquesta vitamina per part del

fetus en el compartiment del líquid amniòtic⁴¹⁰. Hi ha, però, algun cas⁴⁰³ en el que la concentració de cobalamina és més baixa en el líquid amniòtic (**Taula 9**).

La necessitat tant dels folats com de la cobalamina per la formació del tub neural, podria ser conseqüència a la interdependència que tenen aquestes vitamines tant a nivell cel·lular, com en el flux de grups metil derivats del folat i destinats a la síntesi d'ADN o a les reaccions de metilació. Tot i que la síntesi d'ADN és essencial per al desenvolupament embrionari, altres factors que provoquen canvis en el desenvolupament, poden veure's influenciats per les reaccions de metilació, com ara l'expressió diferencial de gens i l'activació o repressió de vies apoptòtiques.

Taula 9. Estudis cas-control en què es compara l'estat en cobalamina matern entre casos d'embaràs afectat per DTN respecte embarassos sense complicacions

Autor/any	Lloc	Nombre Participants		Recollida de la mostra (tipus de mostra)	Suplementació amb Cbl	Mitjana (DE) cobalamina (pmol/L)		Valor de p
		Casos DTN	Controls			Casos	Controls	
Schorah CJ, 1980 ³⁸³	Regne Unit	6	48	1r trimestre (Sèrum)	No	228 (ND)	308 (ND)	NS
Molloy AM, 1985 ⁴⁰²	Irlanda	28	363	1r, 2n i 3r trimestre (Sèrum)	ND	219 (314) ^a	204 (683) ^a	NS
Gardiki-Kouidou, 1988 ³⁸⁴	Grècia	16	65	2n trimestre (LA)	No	111 (108) ^b	162 (239) ^b	0,03
Economides DL, 1992 ⁴⁰³	Regne Unit	8	24	2n trimestre (Sèrum i LA)	No	Sèrum 151 (125) ^a LA 92 (103) ^a	Sèrum 170 (218) ^a LA 207 (679) ^a	NS < 0,01
Weekes EW, 1992 ⁴⁰⁷	Estats Units	8	47	2n trimestre (LA)	ND	140 (90)	600 (380)	0,0001
Wild J, 1993 ³⁹²	Regne Unit	29	29	Postpart ^c (Sèrum)	No	331 (201-732) ^a	361 (229-858) ^a	NS
Stegers-Theunissen RP, 1994 ³⁹³	Països Baixos	41	50	Postpart 3-240 mesos Sèrum	No	268 (100)	288 (107)	NS
Stegers-Theunissen RP, 1995 ⁴⁰⁴	Països Baixos	27	31	2n trimestre (Sèrum i LA)	No	Sèrum 219 (67) LA 379 (298)	Sèrum 238 (66) LA 481 (278)	NS
Mills JL, 1995 ³⁸⁶	Dublín	81	323	Primera visita prenatal (Plasma)	ND	194 (76)	219 (82)	0,008
Wald NJ, 1996 ⁴⁰⁵	Internacional	18	75	1r trimestre (Sèrum)	ND	170(ND) ^a	177(ND) ^a	NS
Steen MT, 1998 ⁴⁰⁸	Estats Units	15	63	2n trimestre (Plasma)	ND	111 (80-325) ^d	399 (355-531) ^d	0,02
Stoll C, 1999 ⁴⁰⁶	França	170	340	1r trimestre (Plasma)	No	303 (111)	325 (148)	NS
Dawson EB, 1999 ⁴⁰⁹	Estats Units	11	29	2n trimestre (LA)	ND	226 (109)	618 (285)	≤ 0,02

Cbl, cobalamina; DE, desviació estàndard; ND, no hi ha dades disponibles; NS, no significatiu ($p > 0,05$); LA, líquid amniòtic. ^aMediana (rang); ^bmediana (rang interquartílic); ^cmesos postpart: mediana (rang interquartílic) casos 23 (17,5) controls 48 (92); ^dmediana (IC 95%).

Taula 10. Resultats d'estudis cas-control en què s'avalua el risc de DTN en associació amb indicadors d'estat en cobalamina matern

Autor/any	Lloc	Nombre de participants		Recollida de la mostra (tipus de mostra)	Definició de grups de comparació	Odds ratio ¹	IC 95%	Ajust per folats ^a
		Casos DTN	Controls					
Mills JL, 1992 ³⁹⁴	Finlàndia	6	48	1r trimestre ^b (Sèrum)	augment en 1 pg/mL de cbl	1,1	0,9-1,2	No ^c
Kirke PN, 1993 ³⁸⁵	Irlanda	81	247	1r, 2n i 3r trimestre ^d (Plasma)	≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de cbl i folats	5,4	1,2-25,2	No ^e aplicable
Van der Put NM, 1997 ³⁸⁷	Holanda	60	94 (24% homes)	Casos: Postpart (ND) ^d Controls: PG ^d (Plasma)	≤ percentil 5 vs. > percentil 5 de cbl	3,9	1,3-11,9	No
Wilson A, 1999 ³⁹⁹	Canadà	58	89	Postpart (ND) ^b (Sèrum)	≤ quartil més baix vs. > quartil més baix de cbl considerant només no homozigots per <i>MTRR</i>	2,1	0,9-5,2	No ^f
					≤ quartil més baix i homozigots per <i>MTRR</i> vs. > quartil més baix de cbl i no homozigots per <i>MTRR</i>	4,8	1,5-15,8	
Afman LA, 2001 ³⁹⁵	Holanda	46	73 (100% dones)	Casos: Postpart (ND) ^d Controls: PG ^d (Plasma)	≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de cbl	1,8	0,6-5,2	No ^f
					≤ quartil més baix vs. > quartil més alt d'HoloTC	2,9	0,9-9,2	
					≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de proporció d'HoloTC ^g	5	1,3-19,3	
Suarez L, 2003 ³⁸⁸	Estats Units	157	186	Postpart: 5-6 setmanes ^d (Sèrum)	≤ quintil més baix vs. > quintil més alt de cbl	2,6	1,2-5,4	No ^h
Groenen PM, 2004 ³⁸⁹	Països Baixos	44	83	Postpart: 1-3 anys ^d (Sèrum)	≤ 185 pmol/L vs. > 185 pmol/L de cbl	3,5	1,3-8,9	No ⁱ
Ray JG, 2007 ³⁹⁶	Canadà	89	422	2n trimestre ^d (Sèrum)	≤ quartil més baix vs. > quartil més alt d'HoloTC	2,9	1,2-6,9	Si ^j
					≤ quartil més baix vs. > quartil més alt d'HoloTC però només amb els embarassos que es donen després de la fortificació de la farina amb àcid fòlic (49% casos i 48% controls)	3,2	0,9-11,0	
Molloy AM, 2009 ³⁹⁰	Irlanda	Embaràs amb DTN: Grup 1 (N = 95) 1983-86 Grup 3 (N = 76) 1986-90 Embaràs sense DTN però antecedents personals Grup 2 (N = 107) 1986-90	Embaràs no afectat i sense antecedents Per grup 1 (N = 265) Per grup 2 (N = 414) Per grup 3 (N = 222)	Mediana segons grups 14-16 setmanes ^p (Sèrum)	≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de cbl (grup 1)	3,1	1,4-6,7	Si
					≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de cbl (grup 2)	2,8	1,4-5,3	Si ^k
					≤ quartil més baix vs. > quartil més alt de cbl (grup 3)	2,5	1,1-5,3	
Zhang T, 2009 ³⁹¹	Xina (en àrea amb alta prevalença de DTN)	84	110	1r, 2n i 3r trimestre ^b (Sèrum)	< 55 pmol/L vs. ≥ 55 pmol/L de cbl	5	1,9-12,7	No ^l
Ceyhan ST, 2010 ⁴⁰¹	Turquia	31	32	2n trimestre ^d (Sèrum)	< 145 pmol/L vs. ≥ 145 pmol/L de cbl	1,8	0,6-5,5	No

Cbl, cobalamina; IC 95%, interval de confiança del 95%; EM, edat materna; PG, població general; ND, no hi ha dades disponibles; IMC, índex de massa corporal; MP, multivitamínics preconcepcionals; VP, vitamines preconcepcionals; DM, diabetis mellitus. ¹Risc d'embaràs afectat per DTN. ^aFolats en sang (sèrum/plasma); ^bNo hi ha suplementació amb cbl; ^cND sobre la suplementació amb cbl; ^gProporció d'HoloTC = (HoloTC/TC); ^kGrups 2 i 3 ajustats per el folat eritrocitari. Altres variables d'ajust: ^eAny extracció, EM, edat gestacional i ocupació; ^fND; ^hEM, IMC, estudis, MP, ingesta de Cbl i folats; ⁱContraceptius orals, estudis, VP, consum de tabac i alcohol; ^jEM, paritat, pes, ètnia, estat socioeconòmic i DM pregestacional; ^lEM, edat gestacional, estudis i paritat.

10. POLIMORFISMES QUE AFECTEN LA INTERVENCIÓ DE LA COBALAMINA EN EL CICLE DE LA METIONINA

La cobalamina i els folats comparteixen una única via metabòlica catalitzada per la MS, la remetilació de la Hcy a metionina. En l'apartat "*Interaccions folat-cobalamina i polítiques de fortificació*", s'explicarà més detalladament aquesta reacció, però l'objectiu d'aquest apartat és analitzar els polimorfismes que poden afectar aquesta via metabòlica.

La MS, l'activitat de la qual està controlada per la *metionina-sintasa reductasa* (MSR), remetila la Hcy en presència de la cobalamina com a cofactor i del 5-MTHF com a substrat. La cobalamina es transporta als teixits unida a la TCII i la producció de 5-MTHF depèn de l'estat en *5,10-metilentetrahidrofolat* (5,10-MTHF) i de l'activitat de l'enzim *metilentetrahidrofolat-reductasa* (MTHFR). L'activitat de la MS es pot veure afectada per polimorfismes presents tant en el gen del propi enzim (*MTR* 2756A>G) com de la MSR (*MTRR* 66A>G, *MTRR* 524C>T). Per altra banda, els requeriments d'HoloTC i folats, podrien ser més elevats en presència dels polimorfismes en els gens de la *TCII* (776C>G) i del *MTHFR* (677C>T, 1298A>C) respectivament.

10.1.- Polimorfismes del gen *TCII* 776C>G

A raó de la importància que pot tenir per la comprensió d'aquesta secció conèixer les freqüències genotípiques en cada estudi, s'han resumit de forma esquemàtica aquestes freqüències juntament amb les característiques principals de cada estudi. La informació s'ha dividit en dues taules per diferenciar els estudis descriptius (**Taula 11**) dels cas-control (**Taula 12**).

La seqüència d'ADN del gen de la *TCII* expressat en diferents tipus cel·lulars, ha permès identificar diversos polimorfismes d'un sol nucleòtid^{411,412}, considerant-se el reemplaçament de la prolina per l'arginina en la posició 776, que porta a un canvi d'aminoàcid en el codó 259, com el major determinant genètic en el polimorfisme de la *TCII*⁴¹³. S'ha proposat un segon mecanisme que també portaria a l'heterogeneïtat de la *TCII*, conseqüència del procés de tall i unió que es dona entre la transcripció i la síntesi de proteïnes, consistent en l'eliminació de les seqüències no codificants (introns), en llocs alternatius del pèptid líder⁴¹⁴.

No es coneix com la substitució d'una arginina per una prolina afecta a la conformació de la proteïna. L'anàlisi de fluid cerebroespinal va suggerir que la presència del polimorfisme *TCII* 776C>G, no disminueix l'afinitat de la *TCII* per la cobalamina, ni un cop aquesta

unida, l'afinitat pel receptor⁴¹⁵. Aquest fet ha estat reafirmat en altres estudis que han analitzat l'estructura de la TCII^{416,417}. Contràriament, s'ha suggerit que la unió de la TCII al seu receptor dimèric⁴¹⁸, s'associa amb la dimerització de la TCII fent que la isoforma d'heterodímer *TCII 776CG*, pugui tenir menys afinitat que els homodímers *TCII 776CC* o *776GG*⁴¹⁹. Les dades d'estudis d'individus afectats per fenèdres labials i/o palatals⁴²⁰, de gent gran sana (mitjana d'edat [rang]: 67 anys [40-88])⁴²¹, i de casos de malaltia cardiovascular⁴²², recolzen la hipòtesi que la TCII té menys afinitat per la cobalamina en presència del genotip *TCII 776GG* respecte a *TCII 776CC*.

Namour i els seus col·laboradors⁴²³ van observar que les concentracions sèriques tant de la TCII lliure (ApoTC) com de la cobalamina total, eren respectivament 1,7 i 1,4 vegades majors en els *TCII 776CC* respecte als *TCII 776GG*. Estudis posteriors han corroborat la relació entre baixes concentracions sèriques d'ApoTC i/o cobalamina en el genotip *TCII 776GG*, respecte els altres dos genotips del polimorfisme^{413,419,424}.

En el cas de l'HoloTC, s'han observat concentracions majors en *TCII 776CC* respecte *TCII 776GG*, tant a nivell cel·lular⁴²⁵ com plasmàtic⁴²⁶. Si la menor concentració d'HoloTC observada en presència de *TCII 776GG*, no s'acompanya amb una reducció en la concentració de cobalamina total, suggereix que correspon amb menys cobalamina disponible a nivell dels teixits^{427,428}.

L'HoloTC s'ha considerat tant com a fracció de la cobalamina sèrica total com de la TCII. La raó HoloTC/Cbl, és menor en presència de *TCII 776GG* respecte els altres dos genotips del polimorfisme⁴²¹, suggerint que l'al·lel *776G* respecte a l'al·lel *776C* podria codificar una proteïna amb menys afinitat per la cobalamina⁴²⁹. Hi ha controvèrsia a l'hora de relacionar aquest fet amb l'augment del risc per DTN que es dona en presència de baixes concentracions d'HoloTC³⁹⁵. Pietrzyk i els seus col·laboradors⁴³⁰ en un estudi fet a Polònia, van trobar una freqüència més elevada del genotip *TCII 776GG* en mares amb nens amb espina bífida respecte els controls, que eren adults sense història familiar de DTN. Contràriament, en un estudi realitzat a Irlanda, en el qual els controls eren mares de nens no afectats per DTN, no es van trobar diferències ni genotípiques ni al·lèliques entre els casos amb DTN i els controls⁴³¹. En un estudi anterior fet a Itàlia amb nens amb espina bífida i els seus respectius controls, en què es va trobar la mateixa falta d'associació en considerar el polimorfisme *TCII 776C>G* sol, en analitzar la influència del polimorfisme conjuntament amb el *MTHFR 677C>T*, es va observar com es duplicava el risc de patir espina bífida en els individus amb la combinació *MTHFR 677CC* + *TCII 776CG/GG* respecte a les altres combinacions⁴³². Els autors d'aquest últim article proposen un possible efecte protector per DTN de l'al·lel *677T*, com a conseqüència de

les diferències en la interacció gen-nutrient. Suggereixen la freqüència més elevada de l'al·lel 677T com a conseqüència d'un consum més elevat de folats, fet que reduiria el risc de DTN.

En l'anàlisi d'avortaments espontanis, es va veure com l'al·lel 776C es relacionava amb un efecte protector durant l'embriogènesi⁴³³, a causa del seu possible efecte positiu sobre l'estat en TCII, el genotip *TCII* 776CC s'associa amb concentracions més elevades de TCII respecte a *TCII* 776GG⁴¹³. Aquest podria ser un fet important per a l'eficient alliberació de la cobalamina en un estat de ràpida proliferació cel·lular com és el desenvolupament embrionari. En els heterozigots *TCII* 776CG s'observa una disminució significativa de la viabilitat fetal, contràriament al que passa amb els *TCII* 776GG⁴³³. Com ja s'ha comentat al principi d'aquesta secció, una possible explicació podria ser que en la unió de la TCII al seu receptor dimèric, la isoforma d'heterodímer *TCII* 776CG pugui tenir menys afinitat que els homodímers *TCII* 776CC/GG^{418,419}. També s'ha observat l'associació entre baixa concentració de TCII i major concentració de tHcy en els heterozigots *TCII* 776CG respecte a la resta de genotips, tant en un estudi d'individus sans a França⁴¹³ i Portugal⁴²⁸, com amb malalts cerebrovasculars a Itàlia⁴³⁴. Per altra banda, analitzant teixit fetal d'avortaments espontanis, també s'ha comprovat com els embrions amb la combinació dels genotips *MTHFR* 677TT i *TCII* 776CG o 776GG, tenen més risc de patir un avortament espontani que els que només presenten un dels polimorfismes, fet que indica una associació perjudicial entre els dos polimorfismes durant l'embriogènesi⁴³⁵. Aquesta relació, però, no és present en estudis posteriors com el de Parle-McDermott i els seus col·laboradors⁴³⁶, en el qual analitzaven dones amb antecedents d'avortament idiopàtic en el segon trimestre. No es va trobar cap efecte en el risc de patir un avortament espontani, del genotip *TCII* 776GG vs. CC/CG ni *MTHFR* 677TT vs. CT/CC presents en la mare, ni tampoc cap associació significativa entre *MTHFR* 677TT i *TCII* 776CG/GG.

En mares amb nens amb DTN la raó HoloTC/TCII plasmàtica, era menor en els homozigots *TCII* 776GG respecte als altres dos genotips del polimorfisme. Donat que l'HoloHC i la cobalamina plasmàtica no variaven entre els tres genotips, la baixa raó HoloTC/TCII podria indicar dificultats en el transport de la cobalamina per part de la TCII⁴²⁴. En l'estudi de la prevenció del càncer colorectal, l'anàlisi de participants sans (50-64 anys), va permetre observar concentracions majors de MMA en els individus *TCII* 776GG que en la resta⁴³⁷. La relació entre els diferents genotips tant amb MMA com amb HoloTC podrien representar alteracions preclíniques en l'estat i funció de la cobalamina⁴²¹. Tots aquests fets suggereixen que el polimorfisme de la TCII pot dificultar l'alliberament cel·lular de la cobalamina.

Un altre polimorfisme és la *TCII* 67A>G del codó 23, on una isoleucina és substituïda per una valina⁴³⁸. En un estudi de mares amb fills amb DTN, es va observar que la raó HoloTC/*TCII* plasmàtica materna era major en els heterozigots en comparació amb els homozigots *TCII* 67AA⁴²⁴. Aquest polimorfisme no es troba en cap de les 6 regions hidrofòbiques que es postulen com a involucrades en el transport de cobalamina, però sí que sembla que podria estar implicat a facilitar-ne la unió⁴¹⁷.

L'estil de vida també pot influir sobre el risc de defectes al néixer; hi ha evidències que suggereixen que l'efecte de fumar i/o consumir alcohol a la periconcepció (un mes abans de l'embaràs i durant els tres primers mesos d'aquest), pot dependre o ser subjacent a factors genètics. S'ha observat que mares que fumaven i/o consumien alcohol a la periconcepció i que presentaven el genotip *TCII* 776CG o 776GG, tenien un augment del risc, respecte el genotip *TCII* 776CC, que el nou-nat tingués defectes congènits cardíacs. Aquesta associació podria ser conseqüència d'un pitjor estat en folats i cobalamina en els individus que fumen i/o consumeixen alcohol, juntament amb una menor eficiència en el transport de la cobalamina a nivell cel·lular i dels teixits, a causa de la presència del polimorfisme *TCII* 776C>G⁴³⁹.

Aléssio i els seus col·laboradors⁴²⁷ van observar, en infants sans amb una mediana d'edat de 4,8 anys, que la tHcy era més elevada en nens amb el genotip *TCII* 776GG (9,15 µmol/L) respecte al *TCII* 776CC (7,9 µmol/L). Aquesta relació no s'havia donat en estudis anteriors fets en dones d'edat fèrtil 20-30 anys⁴²⁶ ni en dones de 40-88 anys⁴²¹. S'han realitzat estudis sobre la trombosi venosa, en la qual l'hiperhomocisteïnèmia es considera un factor de risc, en els que no s'ha trobat relació entre el polimorfisme i la tHcy, o com a factor de risc per la malaltia trombòtica^{440,441}.

La idea de la interacció gen-ambient va ser reforçada per Lievers i els seus col·laboradors⁴²⁰, quan en estratificar en base a l'estat en cobalamina, el seu grup d'estudi en quartils, van trobar que els individus homozigots *TCII* 776CC del quartil alt (cobalamina plasmàtica > 299 pmol/L) tenien concentracions inferiors de tHcy (10,9 µmol/L) respecte als individus heterozigots (12,7 µmol/L) i homozigots mutants (12,6 µmol/L). Per altra banda, en el quartil baix (cobalamina plasmàtica < 174,9 pmol/L) la concentració inferior de tHcy es va observar, tot i no ser de forma significativa, en presència del genotip *TCII* 776GG. Resultats similars en relació a un baix estat en cobalamina, van ser observats posteriorment per Garrod i col·laboradors⁴²⁹, però en considerar un baix estat en HoloTC plasmàtica (< 35 pmol/L), la concentració de tHcy va ser significativament inferior en els individus homozigots *TCII* 776CC (14,0 µmol/L) respecte els altres genotips del polimorfisme (17,0 µmol/L).

En un estudi en què s'avaluava la prevalença mundial del polimorfisme *TCII* 776C>G⁴⁴², es va trobar la major freqüència de l'al·lel 776G a la Xina (60,7%), la menor a l'oest d'Àfrica (17,8%) i la intermèdia a França (44,5%), Itàlia (35,2%), el Marroc (37,0%) i Mèxic (37,4%). A Mèxic i França, dos països amb una elevada taxa de baix estat en cobalamina (< 100 pmol/L), el genotip *TCII* 776CG s'associava a concentracions més elevades de tHcy respecte als altres genotips. Diferents factors ambientals, com pot ser la ingesta dietètica de cobalamina, poden conferir un avantatge selectiu o exercir una pressió selectiva sobre la freqüència de l'al·lel 776G, fet que podria estar relacionat amb les freqüències observades a l'Àfrica i la Xina⁴⁴². En aquest cas, però, aquesta hipòtesi no se sosté per la falta d'associació entre la freqüència al·lèlica i l'estat en cobalamina dels diferents grups.

Com s'ha comentat en l'apartat "*Marcadors bioquímics de l'estat en cobalamina*", la insuficiència renal pot augmentar, entre d'altres, les concentracions plasmàtiques tant d'HoloTC com de tHcy. Estudis realitzats amb individus amb malaltia renal avançada en diàlisi, no han observat cap relació del polimorfisme *TCII* 776C>G amb cap dels dos marcadors^{443,444,445}. En un estudi fet en individus amb transplantament renal, tot i no disposar de la mesura d'HoloTC, es va observar la falta d'associació del polimorfisme tant sobre la concentració de cobalamina plasmàtica com de tHcy⁴⁴⁶.

La cobalamina també intervé en la funció del sistema nerviós central. En pacients amb Alzheimer, s'ha comprovat l'associació de l'al·lel 776G amb baixes concentracions de *TCII* i HoloTC, especialment, en el fluid cerebrospinal⁴⁴⁷. Per altra banda, també s'ha observat com la freqüència del genotip *TCII* 776GG és significativament major en nens autistes respecte als controls, els quals arriben a tenir el doble de risc d'autisme respecte als homozigots CC⁴⁴⁸.

Taula 11. Freqüències genotípiques de la TCII 776C>G dels estudis descriptius

Autor/any	Lloc	Patologia	Participants	Polimorfisme	FG (%)
Namour F 2001 ⁴¹³	França	Sans	159	TCII 776C>G	CC 34,6 CG 47,8 GG 17,6
Miller JW 2002 ⁴²¹	Estats Units	Sans	128	TCII 776C>G	CC 30,5 CG 49,2 GG 20,3
Zetterberg H 2003 ⁴³⁵	Suècia	Alzheimer	78	TCII 776C>G	CC 30,8 CG 43,6 GG 25,6
Födinger M 2003 ⁴⁴³	Àustria	Malaltia renal avançada en diàlisi	120	TCII 776C>G	CC 39,2 CG 42,5 GG 18,3
Wans S 2003 ⁴²⁵	Alemanya	Sans	159	TCII 776C>G	CC 34,6 CG 48,4 GG 17,0
Winkelmayer WC 2004 ⁴⁴⁶	Estats Units	Transplantats renals	732	TCII 776C>G	CC 27,9 CG 52,3 GG 19,8
Von Castel-Dunwoody KM 2005 ⁴²⁶	Estats Units	Sans	344	TCII 776C>G	CC 29,9 CG 46,8 GG 23,3
Aléssio AC 2007 ⁴²⁷	Brasil	Sans	207	TCII 776C>G	CC 39,5 CG 48,0 GG 12,5
Fredriksen A 2007 ⁴³⁷	Noruega	Sans	10601	TCII 776C>G	CC 33,0 CG 47,0 GG 20,0
Castro R 2010 ⁴²⁸	Portugal	Sans	122	TCII 776C>G	CC 31,1 CG 41,0 GG 27,9
Garrod MG 2010 ⁴²⁹	Estats Units	Sans	554	TCII 776C>G	CC 41,3 CG 47,1 GG 11,6

FG, freqüències genotípiques.

Taula 12. Freqüències genotípiques de la TCII 776C>G dels estudis cas-control

Autor/any	Lloc	Patologia	Participants		Polimorfisme	FG (%)	
			Casos	Controls		Casos	Controls
Afman LA 2001 ³⁹⁵	Holanda	Defectes del tub neural (DTN)	46 mares amb nens amb DTN	73 dones sanes sense història familiar de DTN	TCII 776C>G	CC 26,0 CG 60,0 GG 14,0	CC 30,0 CG 49,0 GG 21,0
Afman LA 2002 ⁴²⁴	Holanda	DTN	46 mares amb nens amb DTN	73 dones sanes sense història familiar de DTN	TCII 67A>G TCII 776C>G	AA 81,0 AG 17,0 GG 2,0 CC 26,0 CG 60,0 GG 14,0	AA 74,0 AG 24,0 GG 3,0 CC 30,0 CG 49,0 GG 21,0
Lievers KJ 2002 ⁴²⁰	Països Baixos	Malaltia cardiovascular	190	601 individus sense antecedents	TCII 67A>G TCII 776C>G	AA 77,0 AG 23,0 GG 0 CC 27,1 CG 50,3 GG 22,6	AA 75,3 AG 23,5 GG 1,2 CC 27,0 CG 52,8 GG 20,2
Zetterberg H 2002 ⁴⁴⁰	Itàlia	Malaltia trombòtica	155	180 individus sans sense antecedents	TCII 776C>G	CC 40,1 CG 41,3 GG 18,6	CC 33,9 CG 50,6 GG 15,6
Zetterberg H 2002 ⁴³³	Grècia	Avortaments espontanis	77 teixits fetals	115 mostres d'ADN de donants de sang sans	TCII 776C>G	CC 9,1 CG 66,2 GG 24,7	CC 32,2 CG 49,5 GG 18,3
Guéant-Rodriguez RM, 2003 ⁴³²	Itàlia	DTN	40 nens afectats per espina bífida (1-15 anys)	58 individus no afectats per espina bífida (7-20 anys)	TCII 776C>G	CC 45,0	CC 42,2
Zetterberg H 2003 ⁴³⁵	Grècia	Avortaments espontanis	76 teixits fetals	114 mostres d'ADN de donants de sang sans	Interacció MTHFR/TCII MTHFR 677C>T TCII 776C>G	TT/CC 2,6 CC/CG 22,0 CC/GG 7,9 TT/CG 6,1 TT/GG 0 TT/CG i TT/GG 6,1	TT/CC 1,3 CC/CG 13,0 CC/GG 14,0 TT/CG 16,0 TT/GG 3,9 TT/CG i TT/GG 20,0

(Continua a la pàgina següent)

Autor/any	Lloc	Patologia	Participants		Polimorfisme	FG (%)	
			Casos	Controls		Casos	Controls
Pietrzyk JJ 2003 ⁴³⁰	Polònia	Espina bífida	103 mares amb nens amb espina bífida	100 adults sense història familiar de DTN	<i>TCII 776C>G</i>	CC 29,1 CG 42,7 GG 28,2	CC 24,0 CG 61,0 GG 15,0
Swanson DA 2005 ⁴³¹	Irlanda	DTN	361 mares amb nens amb DTN	724 mares amb nens no afectats amb DTN	<i>TCII 776C>G</i>	CC 31,0 CG 49,0 GG 20,0	CC 32,0 CG 49,0 GG 19,0
Parle-McDermott 2005 ⁴³⁶	Irlanda	Avortament idiopàtic al 2n trimestre	125 embarassades amb antecedents	625 embarassades sense antecedents	<i>TCII 776C>G</i>	CC 27,0	CC 30,0
						CG 50,0	CG 50,0
						GG 24,0	GG 20,0
						<i>MTHFR 677C>T</i>	CC 44,0
						CT 44,0	CT 44,0
						TT 11,0	TT 12,0
Martinelli M 2006 ⁴²²	Itàlia	Fenedures labials amb/ sense palatals	218	289	<i>TCII 776C>G</i>	CC 39,0 CG 50,5 GG 10,5	CC 30,8 CG 51,9 GG 17,3
Bosco P 2006 ⁴³⁴	Itàlia	Malaltia cerebrovascular isquèmica	252	121	<i>TCII 776C>G</i>	CC 32,0 CG 50,0 GG 18,0	CC 34,0 CG 51,0 GG 15,0
James SJ 2006 ⁴⁴⁸	Estats Units	Autisme	80 nens afectats (7,3 ± 3,2 anys)*	73 nens sense desordres neurològics (10,8 ± 4,1 anys)	<i>TCII 776C>G</i>	CC 30,0 CG 44,0 GG 26,0	CC 32,0 CG 52,0 GG 16,0
Pereira AC 2007 ⁴⁴¹	Brasil	Trombosi venosa	434	434 individus sense història personal de trombosi	<i>TCII 776C>G</i>	CC 35,7 CG 47,5 GG 16,8	CC 37,3 CG 49,1 GG 13,6
Hobbs CA 2010 ⁴³⁹	Estats Units	Defectes congètics cardíacs (DCC)	572 embarassades de fetus afectats per DCC	363 no embarassades amb fills no afectats per DCC	<i>TCII 776C>G</i>	CC 34,7 CG 49,5 GG 15,8	CC 36,2 CG 46,2 GG 17,6

FG, freqüències genotípiques; *mitjana ± desviació estàndard.

10.2.- Polimorfismes del gen *MTHFR* 677C>T i 1298A>C

Un enzim clau involucrat en la remetilació de la Hcy és la *MTHFR*, que genera el 5-MTHF a partir del 5,10-MTHF⁴⁴⁹. El polimorfisme del gen *MTHFR* més freqüentment associat a hiperhomocisteïnèmia, és conseqüència de la substitució de la citosina per la timidina al nucleòtid 677 del gen, que resulta en el canvi d'una alanina per una valina (*MTHFR* 677C>T)^{450,451}. La prevalença del genotip *MTHFR* 677TT pot variar del 5-30% en diferents poblacions⁴⁵². L'activitat enzimàtica en presència del genotip *MTHFR* 677TT, que codifica per un enzim termolàbil, és fins a un 70% inferior respecte a *MTHFR* 677CC^{450,453,454,455}.

El polimorfisme *MTHFR* 677C>T s'ha associat a complicacions d'embaràs com els avortaments de repetició^{456,457,458}, la vasculopatia placentària⁴⁵⁹ i els DTN, tot i que aquest últim punt és controvertit. Hi ha estudis realitzats en diferents països que relacionen aquest polimorfisme amb un augment del risc de DTN, com són entre d'altres dos estudis realitzats a Irlanda; en el primer es van analitzar 82 individus amb DTN i 99 controls⁴⁶⁰, el nombre d'individus va augmentar en l'estudi posterior, en el qual se'n van incloure 218 amb DTN i 242 controls⁴⁶¹. Al Canadà es van analitzar tant mares de nens amb DTN com els propis afectats per DTN, observant l'associació entre el polimorfisme i el baix estat en folats⁴⁶². L'anàlisi de líquid amniòtic es va realitzar als Països Baixos, amb 82 casos de DTN i 110 controls⁴⁶³. A l'Índia es van analitzar 50 mares amb fills amb DTN i 80 mares control⁴⁶⁴. Altres estudis, a més de trobar relació entre el polimorfisme *MTHFR* 677C>T i l'augment de risc de DTN, remarquen la importància del genotip *MTHFR* 677TT en aquest augment del risc de DTN^{465,466}, fins i tot en països on la prevalença de DTN és baixa, com ara Itàlia, amb l'anàlisi de 203 individus amb DTN i 583 controls⁴⁶⁷. Contràriament, hi ha altres estudis que no hi troben cap tipus d'associació. Un estudi realitzat a França, que com Itàlia presenta una baixa prevalença de DTN respecte als Països Baixos o Irlanda, va analitzar 43 fetus, casos severos de DTN procedents d'interrupcions legals de l'embaràs, i 133 controls, i van trobar el genotip *MTHFR* 677TT en el 7% dels casos i el 10% dels controls⁴⁶⁸. En un altre estudi realitzat a Alemanya, on es van incloure 137 individus amb espina bífida i 153 controls, no es va trobar cap predisposició genètica del polimorfisme *MTHFR* 677C>T amb l'espina bífida⁴⁶⁹.

El possible risc del polimorfisme *MTHFR* 677C>T sobre els DTN sembla estar associat a l'estat en folats^{470,471}. S'ha observat, en dones amb genotip *MTHFR* 677TT, que la suplementació preconcepcional amb àcid fòlic redueix el risc tant d'avortaments de repetició⁴⁷², com de DTN⁴⁷³. En un estudi realitzat a Canadà⁴⁶², es va advertir que la combinació del genotip mutant i el baix estat en folats augmentava el risc de DTN

respecte a qualsevol de les dues variables per si soles, fet que suggereix un efecte interactiu genètica-nutrició. En països amb elevada ingesta de folats, el risc conseqüència de la mutació pot veure's disminuït. En el mateix estudi⁴⁶² es va observar una associació entre l'estat en folats i el polimorfisme *MTHFR* 677C>T sobre les concentracions de tHcy. Les mares (el 41% amb fills amb DTN) del quartil baix en folats i amb genotip *MTHFR* 677TT, presentaven concentracions de tHcy majors (mares control: 13,9 µmol/L, mares amb fills amb DTN: 22,5 µmol/L) respecte a les que tenien el genotip mutant, però no estaven en el quartil baix en folats (mares control: 12,5 µmol/L, mares amb fills amb DTN: 13,6 µmol/L). Així es va reafirmar la relació entre la mutació i les elevades concentracions de tHcy, en els casos de baix estat en folats, observada pel mateix autor en un estudi cas-control anterior en el qual la patologia estudiada eren les cardiopaties coronàries⁴⁷⁴. En un altre estudi⁴⁷⁵ realitzat en població general dels Països Baixos, amb edats entre els 20 i els 65 anys, també es va observar una associació entre el baix estat en folats i majors concentracions de tHcy en presència del genotip *MTHFR* 677TT respecte els altres genotips. En relació a aquest fet, s'ha suggerit que els individus amb els dos al·lels 677T podrien tenir majors requeriments de folats per tal de mantenir les concentracions plasmàtiques fisiològiques de tHcy⁴⁷⁰.

Elevades concentracions de tHcy s'han relacionat amb el dany vascular. Atesa la relació del polimorfisme *MTHFR* 677C>T amb la hiperhomocisteïnèmia, diferents estudis han analitzat la possible relació del polimorfisme amb aquest dany vascular^{476,477}. En un estudi realitzat a Corea amb 237 casos i 223 controls, es va observar l'associació entre el genotip *MTHFR* 677TT i l'augment del risc d'accident vascular cerebral isquèmic⁴⁷⁸. Aquesta associació també s'ha trobat amb patologies que podrien tenir el seu origen en danys en la vascularització placentària, com la preeclàmpsia i la placenta abrupta. En relació amb la preeclàmpsia, trobem dos estudis, un realitzat a Itàlia⁴⁷⁹, amb 96 casos i, com a controls, 129 dones sense antecedents, i l'altre al Japó⁴⁸⁰, amb 67 casos i 358 controls, 98 dels quals són dones sense antecedents i els altres 260, adults sans de la població general. En els dos estudis, la presència del genotip *MTHFR* 677TT duplica el risc de patir preeclàmpsia. En el cas de la placenta abrupta, en un estudi fet a Noruega en què es van analitzar, 13971 embarassos, es va observar que la presència del genotip *MTHFR* 677TT augmentava gairebé 3 vegades el risc, respecte el genotip *MTHFR* 677CC, de despreniment prematur de la placenta⁴⁸¹. Aquesta relació, però, està en controvèrsia, ja que no s'ha pogut demostrar en tots els casos. En un estudi realitzat a Espanya amb 43 pacients amb preeclàmpsia i 122 embarassos control, la presència del genotip *MTHFR* 677TT va ser en el 19% dels casos i en el 23% dels controls⁴⁸². En relació amb la placenta abrupta, hi ha un estudi fet als EUA amb 195 casos i 189 controls, en el que el genotip *MTHFR* 677TT es trobava en el 13% dels casos i el 18% dels controls⁴⁸³.

La presència de l'al·lel 677T disminueix l'activitat de l'enzim MTHFR que pot resultar en a) un augment de tHcy⁴⁸⁴ i b) una disminució en les concentracions de metionina. James i els seus col·laboradors⁴⁸⁵, en un estudi de casos de *síndrome de Down* (SD) en mares < 40 anys, van comprovar que les mares amb l'al·lel mutant 677T tenien gairebé 3 vegades més risc de tenir un fill amb SD. Els autors van proposar que la reduïda activitat del MTHFR podria promoure la hipometilació de l'ADN, com a conseqüència de la disminució de la raó *S-Adenosilmetionina/S-Adenosilhomocisteïna* (SAM/SAH) associada a un baix estat en metionina. La metilació aberrant de l'ADN augmentaria el risc de no-disjunció meiótica materna en la profase de la meiosi I. Per contra, s'ha donat la falta d'associació entre el polimorfisme i el risc de trisomia del cromosoma 21, en estudis cas-control fets a França, en què s'analitzava el risc de les mares a tenir fills amb SD⁴⁸⁶ i Itàlia, on, a més del risc present en les mares, també s'analitzava el risc en la població general, amb una mediana d'edat de 13 anys en els casos i 43 anys en els controls⁴⁸⁷. En relació amb aquest fet, s'ha suggerit que la ingesta de folats provinent de la dieta mediterrània, podria contrarestar l'impacte metabòlic del polimorfisme, fent impossible la detecció de l'associació d'aquest amb el risc de SD, a diferència dels països amb un menor consum de folats^{488,489}.

En un estudi fet a Noruega, es va observar l'associació del genotip *MTHFR* 677TT amb una disminució del risc del 27% de càncer colorectal⁴⁹⁰. Amb un estat adequat en folats l'augment de la concentració del 5,10-MTHF, típic de la presència del polimorfisme *MTHFR* 677C>T, podria proporcionar aquest efecte protector, mentre que, davant un baix estat en folats, el mateix polimorfisme podria comprometre la concentració del 5-10-MTHF, i augmentar les incorporacions errònies d'uracil, procés que porta a la inestabilitat de l'ADN i facilita els processos de carcinogènesi⁴⁹¹.

La presència de l'al·lel 677T s'ha associat amb casos de depressió o altres desordres neuropsiquiàtrics com l'esquizofrènia⁴⁹². Estudiant aquesta possible associació en dones postmenopàusiques, es va observar gairebé 5 vegades més risc de patir una depressió en presència del polimorfisme *MTHFR* 677TT, respecte els altres genotips⁴⁹³. S'han suggerit possibles efectes negatius del polimorfisme *MTHFR* 677C>T en les reaccions de metilació sobre el sistema nerviós, conseqüència de la disminució de la producció de metionina i *S-Adenosilmetionina* (AdoMet) en la seva presència.

Un segon polimorfisme del gen *MTHFR* és el 1298A>C, on el canvi d'aminoàcid és un glutamat per una alanina⁴⁹⁴. Aquesta mutació també redueix l'activitat de MTHFR, encara que de forma menys important que 677C>T, ja que l'enzim resultant no és termolàbil⁴⁵⁴. Així, l'efecte sobre la tHcy està més atenuat⁴⁷⁷ i sembla que podria arribar a ser

significatiu només en individus amb els dos polimorfismes⁴⁹⁴. S'ha comprovat que en individus heterozigots per les dues mutacions, l'activitat de MTHFR es redueix per sota dels nivells que es troben en presència només del polimorfisme *MTHFR* 677C>T⁴⁹⁵. En un estudi fet al Regne Unit tot i que el polimorfisme *MTHFR* 677C>T no s'associava amb DTN, el genotip *MTHFR* 1298AA vs. 1298AC+1298CC s'associava amb un 43% menys de risc de DTN (OR: 0,57 [IC95% 0,33-0,97]) i la combinació dels dos polimorfismes 677TT/1298AC + 677TT/1298CC amb 6 vegades més de risc de DTN (OR: 6,56 [IC95% 1,10-39,33])⁴⁹⁶.

En analitzar factors de risc per alteracions microvasculars precoces en un grup d'adolescents amb diabetis tipus 1, l'efecte protector del polimorfisme *MTHFR* 1298A>C es va associar amb el genotip *MTHFR* 1298CC. Els autors suggereixen com a explicació l'associació d'aquest genotip a concentracions menors de tHcy⁴⁹⁷. Es va comprovar com el genotip *MTHFR* 1298CC per si sol estava associat amb un retard en l'aparició de la taxa augmentada d'excreció d'albumina, fet que suggeria un possible efecte protector sobre la nefropatia precoç. Aquesta observació concorda amb que el genotip *MTHFR* 1298CC sigui menys comú en adults amb diabetis tipus 2 i microalbumina. Cal remarcar, però, que aquest efecte protector es podria atribuir al fet que els individus estudiats amb genotip *MTHFR* 1298CC són també *MTHFR* 677CC⁴⁹⁸. El genotip *MTHFR* 1298CC augmentava 4 vegades el risc de carcinoma de cèl·lules escamoses d'esòfag en un estudi en població xinesa⁴⁹⁹. L'absència de l'efecte protector podria explicar-se per la baixa ingesta de folats característica d'aquesta població⁵⁰⁰. L'adequada provisió de grups metil disminuiria el risc de danys tant en el deteriorament de la metilació de l'ADN, com en errors en la seva síntesi o reparació. Davant baixes ingestes de folats, la falta de grups metil augmentaria la possibilitat d'afectació de la síntesi de l'ADN, ja deteriorada per la disminució de l'activitat enzimàtica de MTHFR. Es dona així base genètica per a la hipòtesi que la baixa ingesta de folats i/o alteracions en el seu metabolisme, poden tenir un paper important en la carcinogènesi en l'esòfag⁴⁹⁹.

Bailey i els seus col·laboradors⁵⁰¹, en un estudi realitzat a Florida en dones d'entre 20-30 anys, van identificar una associació inversa entre l'estat en cobalamina i tHcy en dones amb el polimorfisme *MTHFR* 1298A>C. La cobalamina sèrica s'associava de forma inversa amb la tHcy en els doble heterozigots o homozigots mutants per *MTHFR* 677C>T o 1298A>C, fins i tot, en l'absència de deficiència en cobalamina (> 148 pmol/L) o folats.

10.3.- Polimorfismes del gen *MTR* 2756A>G i del gen *MTRR* 66A>G i 524C>T

L'aport limitat de cobalamina, com a conseqüència de la baixa ingesta o per alteracions metabòliques i/o en el transport d'aquesta, pot disminuir l'activitat de la MS. La MS catalitza la transferència de grups metil del 5-MTHF a la Hcy formant la metionina; una disminució de la seva activitat pot portar a un augment de Hcy. Un altre enzim clau en aquesta reacció és la MSR, important pel seu paper en el manteniment de la cobalamina en la seva forma activa^{502,503}. El gen *MTRR* de la MSR, manté l'activitat del gen *MTR* de la MS per la transmetilació de la Hcy a metionina⁴⁸⁷.

En el gen *MTR*, el polimorfisme 2756A>G es dona per la substitució de l'àcid aspàrtic per un residu de glicina^{504,505}. S'ha suggerit que aquesta mutació podria estar implicada en l'etiologia d'alguns DTN^{408,506}. S'han observat alteracions en el funcionament de la MS i un augment de la tHcy en els casos de DTN⁵⁰⁷. La prova definitiva de la implicació del polimorfisme *MTR* 2756A>G encara no s'ha obtingut⁵⁰⁸, per la qual cosa es donen resultats discrepants sobre l'associació entre aquesta mutació i el risc de DTN. Aquestes discrepàncies podrien estar relacionades amb la baixa prevalença d'aquesta mutació^{462,509,510}, així com de la tria dels controls; es troben, per exemple, grups control de població general adulta en estudis en què els casos són nens afectats per DTN⁵¹¹. Aquestes limitacions també podrien relacionar-se amb el fet de no trobar associació entre la tHcy i el polimorfisme *MTR* 2756A>G⁵¹².

Per analitzar la relació entre el polimorfisme *MTR* 2756A>G i la tHcy, es va partir de 625 homes de 30 a 49 anys, en els que ja s'havia demostrat que el polimorfisme *MTHFR* 677C>T contribuïa a un augment de la tHcy⁵¹³. Tot i que el risc de tenir elevada tHcy a causa del genotip *MTR* 2756GG, no era gaire més gran que el que presentaven els homes amb baix estat en folats o cobalamina, es va determinar que el polimorfisme *MTR* 2756A>G s'associava també a un augment moderat, però significatiu, de tHcy⁵¹⁴. En aquest estudi, no es va trobar associació entre baixes concentracions de cobalamina i aquest polimorfisme. La falta d'associació podria ser conseqüència de que aquest polimorfisme es localitza en un domini de la proteïna, que interacciona amb SAM i proteïnes auxiliars, i no amb el domini del cofactor de la cobalamina. Així l'al·lel 2756G podria perjudicar el lloc d'unió de SAM i/o proteïnes auxiliars, o l'estabilitat de la pròpia proteïna més que no pas la unió del cofactor. En el mateix estudi, no es va trobar cap influència de l'associació dels genotips *MTHFR* 677TT i *MTR* 2756GG sobre la tHcy que suggerís que actuaven independentment sobre aquest marcador bioquímic⁵¹⁴.

La relació entre el polimorfisme *MTR* 2756A>G i la tHcy no és un fet consistent. Estudis relacionats amb malalties coronàries no han trobat la relació entre el polimorfisme i la tHcy. És el cas d'un estudi realitzat a Canadà amb 109 individus que havien patit, com a mínim tres mesos abans d'entrar en l'estudi, un infart de miocardi, tot i que, cal ressaltar, que només 1 dels participants presentava el genotip *MTR* 2756GG⁵¹⁵. Tampoc es va trobar relació en un estudi fet als Països Baixos, en què, a més de casos d'infart de miocardi, també es van incloure casos d'angina de pit, i van obtenir 123 casos totals (9 individus *MTR* 2756GG) i 540 controls (12 individus *MTR* 2756GG)⁵¹⁶. Per altra banda, un estudi⁵¹⁷ en el que es van analitzar 1031 individus (39 amb genotip *MTR* 2756GG), 660 dels quals presentaven malalties coronàries, 289 eren població de risc i 82 eren individus sans, suggereix la possibilitat que el polimorfisme pugui augmentar l'activitat enzimàtica que afavoreix la conversió de la Hcy a metionina. Aquest fet també es proposa en un altre estudi que es va realitzar amb 387 casos d'infart de miocardi (8 individus *MTR* 2756GG) i 767 controls (28 individus *MTR* 2756GG)⁵¹⁸.

En la susceptibilitat al desenvolupament de tumors malignes com càncer de pit⁵¹⁹, meningiomes anaplàstics/malignes⁵²⁰, limfoma del sistema nerviós central⁵²¹ o càncer colorectal, s'ha observat un efecte protector associat a l'al·lel 2756G que, en el càncer colorectal, ha arribat a una reducció del 35% del risc en els homozigots *MTR* 2756GG⁴⁹⁰. S'ha suggerit que aquest paper protector del genotip *MTR* 2756GG podria basar-se en la disminució de la prevalença de promotors hipermetilats dels gens supressors de tumors, dificultant, així, la supervivència de les cèl·lules cancerígenes⁵²².

Oposadament al seu vessant protector, s'ha observat com individus amb el genotip *MTR* 2756GG tenien 4 vegades més de risc de patir malaltia coronària, en comparació amb els individus amb genotip *MTR* 2756AA. Els individus *MTR* 2756GG tenien un 30% menys de cobalamina que els individus amb els altres dos genotips del polimorfisme⁵¹⁶. També s'ha observat que la presència del genotip *MTR* 2756GG en dones postmenopàusiques, augmenta gairebé 6 vegades el risc de patir depressions moderades i severes⁴⁹³.

En la MSR, un dels polimorfismes més estudiats en el gen *MTRR* és el 66G>A, on es dona la substitució d'una metionina per una isoleucina³⁹⁹. El genotip *MTRR* 66AA es va associar amb la tHcy més elevada respecte al genotip *MTRR* 66GG, en un estudi fet a Irlanda amb 601 homes sans d'edats entre els 30 i 49 anys⁵²³, i en un estudi cas-control realitzat a França amb 530 casos amb malalties coronàries i 248 controls⁵²⁴. Tot i això, un estudi italià de 68 individus sotmesos a una angiografia coronària⁴⁷⁷, i un altre dels EUA amb

504 individus amb malaltia coronària⁵²⁵, no van observar cap associació entre el polimorfisme i la tHcy.

Aquest polimorfisme no s'ha relacionat amb els casos detectats d'aneuploidia⁵²⁶, però es considera com a factor de risc d'avortaments de repetició⁵²⁷ i casos de DTN^{464,528}. Wilson i els seus col·laboradors³⁹⁹, en un estudi fet a Canadà, van investigar l'efecte d'aquest polimorfisme sobre el risc de DTN, tant en les mares (39,5%) amb nens amb DTN, com en els nens (36,6%) amb espina bífida. Les mares del quartil baix de cobalamina i amb el genotip *MTRR* 66AA tenien gairebé 5 vegades més de risc de tenir fills amb DTN, respecte a les mares dels altres quartils amb el mateix genotip. Aquestes dades recolzen la hipòtesi que un baix estat en cobalamina i la MS poden estar involucrades en el risc de DTN⁴⁰⁸. En un estudi posterior realitzat al Regne Unit⁵²⁹, en el que es van analitzar 219 casos de DTN i 211 mares amb fills amb DTN, utilitzant com a controls 645 mares sense antecedents i 602 mostres de sang de cordó de nens no afectats amb DTN, la presència del genotip *MTRR* 66AA disminuïa el risc de DTN en la descendència, però no es va observar relació entre el genotip matern i la disminució del risc. Estudis posteriors no han trobat relació entre el polimorfisme *MTRR* 66A>G i el risc de DTN ni en les mares ni en els seus fills amb DTN^{530,531}.

Zhang i els seus col·laboradors⁵³² el 2005 van observar, en més de 1000 controls sans, que l'al·lel 66A era molt més comú que el 66G, la qual cosa va fer que el polimorfisme passés a anomenar-se *MTRR* 66A>G.

Tot i que les dades presents en la bibliografia, en relació a l'associació entre el polimorfisme *MTRR* 66A>G i el risc de DTN, i la designació de quin és l'al·lel que implica el risc no són concloents, una metanàlisi realitzada amb articles que estudiaven la possible relació del polimorfisme *MTRR* 66A>G i el risc de DTN, mitjançant estudis cas-control en què consideraven tant el risc de DTN en els individus com en les seves mares, va mostrar com la presència del polimorfisme augmentava en el 55% el risc de DTN quan el genotip *MTRR* 66GG era present en les mares, sense trobar, però, aquesta relació en els fills⁵³³.

En un estudi realitzat als EUA es va observar que la presència combinada dels genotips *MTHFR* 677TT/CT i *MTRR* 66GG augmentava fins a 4 vegades en el risc matern de tenir un fill amb SD. No es va poder avaluar l'estat en folats, cobalamina ni tHcy⁵³⁴. En un estudi posterior a Irlanda, es va observar que el genotip *MTRR* 66GG no s'associava amb la tHcy⁵³⁵. Els autors van suggerir que com a conseqüència del baix nombre de participants, l'associació podia no haver-se detectat per falta de potència estadística. No

obstant, sí que van confirmar que la presència conjunta dels polimorfismes *MTHFR* 677C>T i *MTRR* 66A>G, augmentava gairebé 3 vegades del risc de tenir un nen amb SD. Els autors argumenten el menor risc respecte a l'estudi fet als EUA, per la presència d'una major freqüència de l'al·lel mutant 66G en la població irlandesa⁵³⁵. En un estudi posterior fet al Brasil, analitzant per si sol el polimorfisme *MTRR* 66G>A i mares amb un fill amb SD, no es va observar associació entre el polimorfisme i el risc de trisomia del cromosoma 21⁴⁸⁴.

Els estudis de la relació entre el polimorfisme *MTRR* 66A>G i el càncer són escassos i alguns obtenen resultats contradictoris. Es va observar un augment del risc de carcinoma de cèl·lules escamoses d'esòfag en un estudi fet amb població xinesa deficient en folats i cobalamina, on els genotips *MTRR* 66AG i 66GG analitzats per separat, duplicaven cada un el risc d'aquesta patologia respecte el genotip *MTRR* 66AA⁵⁰⁰. En un altre estudi, el genotip *MTRR* 66AA disminuïa el risc de carcinoma de cèl·lules escamoses de coll i cap, respecte *MTRR* 66GG (OR: 0,68 [IC95% 0,52-0,90]), però quan es combinava amb l'al·lel 2756G augmentava el risc d'aquesta patologia (OR: 1,67 [IC95% 1,23-2,27])⁵³². Aquest estudi no va considerar ni la tHcy ni els folats plasmàtics. Per contra, l'al·lel 66G es va associar a una reducció del risc de leucèmia limfoblàstica aguda (OR: 0,8 [IC95% 0,70-0,96]) en un altre estudi, no obstant, cal remarcar la notable diferència d'edat mitjana entre els casos (6 anys) i els controls (32 anys)⁵³⁶.

Un segon polimorfisme del gen *MTRR* és el 524C>T, en el qual el canvi d'aminoàcid és una serina per una leucina⁵³⁷. La relació entre el polimorfisme i la MS sembla produir-se en combinació amb el polimorfisme *MTRR* 66A>G. L'haplotip *MTRR* 66A/*MTRR* 524T i *MTRR* 66G/*MTRR* 524C redueixen entre 3 i 4 vegades respectivament, l'activitat de la MS, respecte el que s'observa en presència de *MTRR* 66A/*MTRR* 524C⁵³⁷.

De forma individual, el polimorfisme *MTRR* 524C>T no s'ha relacionat amb risc de càncer de pit⁵³⁸. L'haplotip *MTRR* 66G/*MTRR* 524C s'ha associat, en dones postmenopàusiques, amb concentracions més elevades d'osteocalcina, indicatiu d'increment en la taxa de renovació òssia que s'ha relacionat amb un augment del risc de fractura⁵³⁹, respecte als dos polimorfismes analitzats per separat⁵⁴⁰. No es va trobar cap associació entre haplotips d'aquests dos polimorfismes del gen *MTRR* i el risc d'azoospermia i oligospermia⁵⁴¹. La presència dels al·lells mutants dels polimorfismes *MTRR* 524C>T i *MTHFR* 1298A>C per si sols no afecten al risc de càncer de bufeta. No obstant la presència de les combinacions *MTRR* 524CT/1298AC, *MTRR* 524TT/*MTHFR* 1298AC, *MTRR* 524CT/*MTHFR* 1298CC, *MTRR* 524TT/ *MTHFR* 1298CC respecte els genotips salvatges, doblen el risc (OR: 2,22 [IC95% 1,08-4,57])⁵⁴².

11. INTERACCIÓ FOLAT-COBALAMINA I POLÍTIQUES DE FORTIFICACIÓ

11.1.- Interacció folat-cobalamina

La cobalamina i els folats comparteixen una única via metabòlica catalitzada per la MS, la remetilació de la Hcy a metionina. La MS necessita la MeCbl com a cofactor i la presència de 5-MTHF, que aportarà el grup metil necessari en demetilar-se a *tetrahidrofolat* (THF)^{543,544,545}. El THF serveix de font per les formes coenzimàtiques de folat necessàries per a la síntesi, entre d'altres, de purines, pirimidines (timidilat) i aminoàcids (**Figura 11**). Tant la deficiència en cobalamina com en folats porten al mateix dèficit metabòlic, la falta de THF i, per tant, de les formes coenzimàtiques necessàries per a les reaccions de síntesi⁵⁴⁶. Problemes en la síntesi de purines i pirimidines provoquen errors en la síntesi d'ADN, causants entre d'altres, de l'aparició de l'anèmia megaloblàstica, amb defectes morfològics en medul·la òssia i sang perifèrica i una progressiva disminució en el recompte d'eritròcits, leucòcits i plaquetes (pancitopènia), perquè moren abans de la seva maduració (hemopoesi ineficaç)⁵⁴⁷.

Segons la hipòtesi de la *trampa de folats*^{548,549,550}, en absència de cobalamina el 5-MTHF, tot i estar disponible, no es pot utilitzar a nivell cel·lular, ja que la pèrdua d'activitat de la MS no en permet el pas a THF, tampoc pot tornar a formar 5,10-MTHF, el seu precursor, ja que la reacció és irreversible⁵⁵¹. A més, la reducció en l'activitat de la MS impedeix la remetilació de la Hcy. Com a resultat empitjora l'estat en metionina i, per tant, també la de la seva forma adenosilada, la SAM o AdoMet. L'AdoMet regula per inhibició al·lostèrica^{552,553} la funció de l'enzim MTHFR, que catalitza la conversió de 5,10-MTHF a 5-MTHF, única via biològica coneguda per generar 5-MTHF⁴⁴⁹ (**Figura 11**). Així, segons aquesta hipòtesi, avalada per estudis en cultius cel·lulars^{554,555,556}, models animals⁵⁵⁷ i humans^{558,559,560,561,562}, problemes en la metilació de la Hcy a metionina, resultarien en la disminució de la concentració d'AdoMet, eliminant la inhibició al·lostèrica de l'activitat de MTHFR, i permetent que més 5-MTHF quedi "atrapat"⁵⁴⁹.

La menor disponibilitat d'AdoMet també repercuteix sobre les reaccions de metilació, responsables de modificacions de l'ADN, proteïnes, lípids i neurotransmissors. Aquestes reaccions són reguladores de l'expressió gènica, la senyalització cel·lular i altres vies cel·lulars essencials, que afecten el creixement, diferenciació i reparació tissular^{549,563,564}. La SAH o AdoHcy, el coproducte d'aquestes reaccions, és un potent inhibidor competitiu dels enzims metiltransferasa i, en condicions normals, és ràpidament convertit en adenosina i Hcy mitjançant l'AdoHcy hidrolasa⁵⁶⁵; no obstant, la reacció és reversible i afavoreix, llavors, la síntesi d'AdoHcy (**Figura 11**). Qualsevol augment en la concentració de Hcy pot alterar la concentració d'AdoHcy i trencar la relació AdoMet/AdoHcy, inhibint

així l'activitat dels enzims metiltransferasa^{566,567}. S'ha comprovat que elevades concentracions d'AdoHcy poden eliminar la inhibició d'AdoMet sobre MTHFR⁵⁵², fent que el flux de grups metil per MS estigui controlat per la capacitat de remetil·lar Hcy i, també, per la quantitat de metionina disponible. Un gran nombre de manifestacions neurològiques de la deficiència en cobalamina i, potser també, de la de folats, podrien resultar d'alteracions d'AdoMet i AdoHcy en el sistema nerviós^{568,569}.

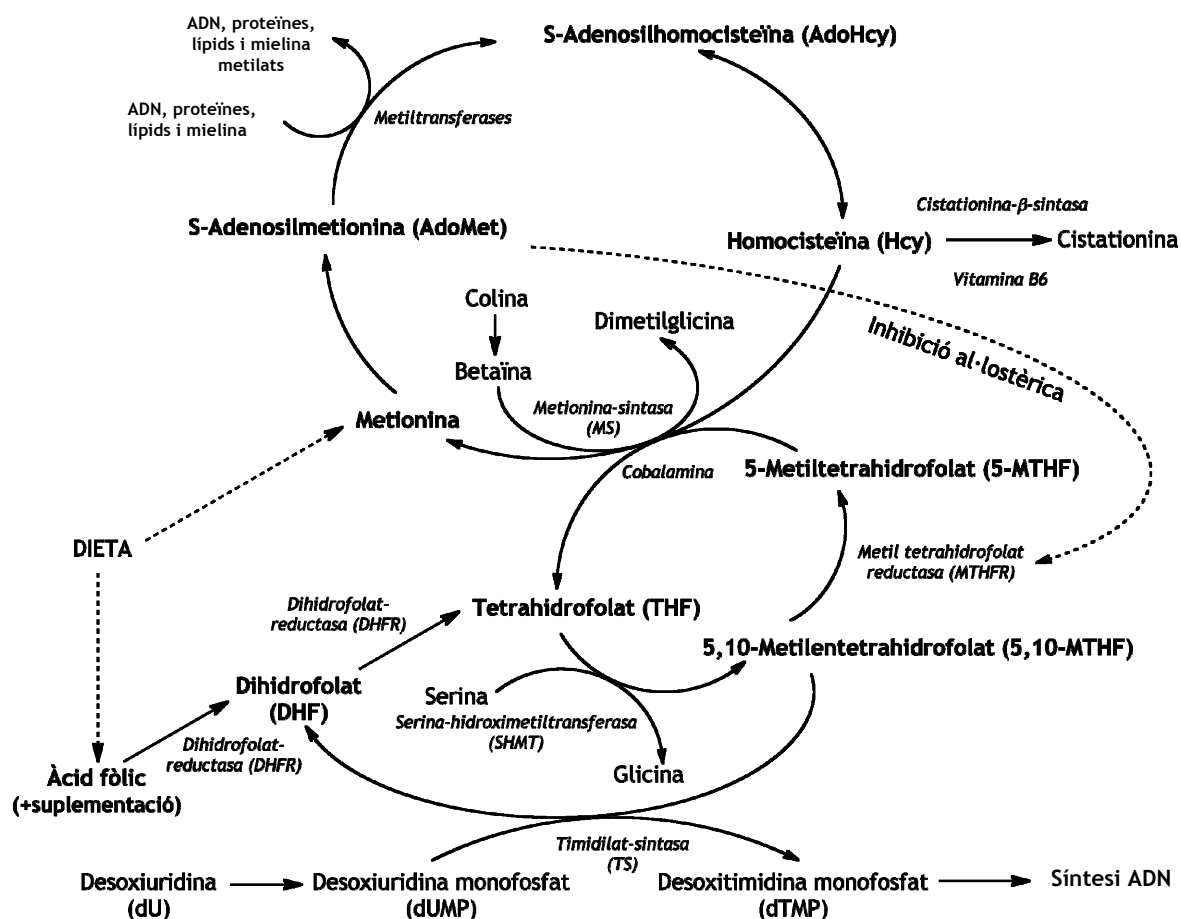


Figura 11. Cicle metabòlic dels folats amb la seva interacció amb la cobalamina, la via del timidilat i el cicle de la metionina (Modificació de Kim YI, 2003⁵⁷⁰)

11.2.- Àcid fòlic no metabolitzat

Davant de casos de deficiència en cobalamina, amb els consegüents problemes amb l'activitat de la MS, la suplementació amb àcid fòlic permet la formació de THF, que podria utilitzar-se per mantenir la síntesi de purines i pirimidines millorant l'anèmia. Però tant la concentració de metionina com la d'AdoMet es troben limitades per la incapacitat de la MS de remetil·lar la Hcy. Com a conseqüència la suplementació amb àcid fòlic no pot recuperar la capacitat de metil·lació. El resultat és l'emascament de la deficiència en

cobalamina. La recuperació de l'anèmia retarda el diagnòstic de la deficiència en cobalamina, permetent que els problemes amb les reaccions de metilació, puguin seguir fins provocar lesions neurològiques irreversibles.

L'àcid fòlic, una forma sintètica de folat, és la manera en la que s'afegeix els folats als aliments fortificats i la que s'utilitza en els suplementes. L'avantatge de l'àcid fòlic és l'elevada biodisponibilitat, cosa que li permet ser absorbit ràpidament a través de l'intestí^{571,572}.

Per poder entrar en el cicle dels folats, l'àcid fòlic ha de ser reduït primer a *dihidrofolat* (DHF) i, després, a THF. L'enzim que catalitza les dues reaccions és el mateix, la *dihidrofolat-reductasa* (DHFR). A partir de la metilació del THF, es forma el 5-MTHF, que és la forma més comuna en què els folats es troben en la sang, tot i que l'única reacció que es coneix en mamífers que utilitza el 5-MTHF és la que implica la MS⁵⁷³.

Quan la suplementació amb àcid fòlic es dona en excés, es pot arribar a saturar la capacitat normal d'absorció intestinal⁵⁷⁴, fent que una proporció de l'àcid fòlic ingerit apareixi en el plasma en la forma no metabolitzada⁵⁷⁵. Tot i la reducció necessària per entrar en el cicle dels folats, es creu que la fracció no metabolitzada pot interferir directament en el metabolisme, mitjançant la competència amb les formes reduïdes per unir-se als enzims, proteïnes transportadores i proteïnes d'unió⁵⁷⁶. Les consideracions de toxicitat en els programes de fortificació, es relacionen amb l'exposició de la forma no metabolitzada dels folats⁵⁷⁷. Als EUA, aproximadament el 40% de la gent gran presenta àcid fòlic en sèrum⁵⁷⁸. En països sense llei de fortificació obligatòria, també s'ha trobat àcid fòlic en sang, fins i tot en el cordó umbilical i infants, segurament, a causa de les fortificacions voluntàries dels aliments⁵⁷⁹, o a la ingesta de suplementes amb àcid fòlic^{577,580}.

En un estudi postfortificació realitzat en adults americans amb una mitjana d'edat de 70 anys, es va observar que el 66% utilitzava suplementes diaris (tot i que no s'hi especifica si els suplementes eren només d'àcid fòlic o multivitamínics), i que el 10% presentava una ingesta > 1 mg d'àcid fòlic/dia. Individus amb baix estat en cobalamina sèrica (< 148 pmol/L o MMA plasmàtic ≥ 210 nmol/L), combinat amb anèmia i elevades concentracions sèriques de folats, van presentar un baix rendiment en les proves cognitives²²¹. Aquests resultats confirmen els d'estudis anteriors^{291,581,582} i reforcen la idea que, en individus amb baix estat en cobalamina, ingestes elevades d'àcid fòlic poden danyar el sistema nerviós; posteriorment diferents estudis han suggerit com a via d'actuació d'aquest fet, la implicació de l'àcid fòlic no metabolitzat^{289,583}.

La presència d'àcid fòlic en sang s'ha relacionat amb una disminució de la citotoxicitat de les cèl·lules *natural killer* (NK), fet que augmenta el risc de patir càncer⁵⁸⁴. Les cèl·lules NK, que poden eliminar cèl·lules tumorals i infectades per virus, bacteris, paràsits i fongs, es consideren una primera línia dins el sistema immunològic per a la defensa contra la carcinogènesi⁵⁸⁵. Els resultats d'estudis fets amb animals, suggereixen que l'efecte dels folats en la carcinogènesi depèn del moment del procés carcinogènic i de la dosi de folat. La deficiència en folats inhibeix, mentre que la suplementació pot promoure la progressió de tumors ja establerts. Però, per altra banda, la deficiència en folats en un teixit epitelial normal, sembla que el predisposa a una transformació neoplàsica, que es podria evitar amb petites dosis de folat en forma de suplement⁵⁸⁶. Així la suplementació amb àcid fòlic podria tenir un doble paper en el càncer. Si comença abans de l'establiment del focus neoplàstic, podria prevenir el desenvolupament i la progressió del tumor, però, si comença després, en potenciaria el creixement i la progressió^{587,588}. En humans, la disminució de la citotoxicitat de les cèl·lules NK té especial importància en la gent gran, ja que l'envelliment també afecta la funcionalitat d'aquestes cèl·lules⁵⁸⁹. En un estudi amb dones postmenopàusiques⁵⁷⁵, es va trobar que la citotoxicitat de les cèl·lules NK era el 6,2% menor, en les dones amb àcid fòlic plasmàtic no metabolitzat (78%) respecte a les que no en presentaven.

11.3.- Fortificació amb àcid fòlic

La relació entre la suplementació amb àcid fòlic durant la preconcepció i la reducció dels DTN està ben establerta^{590,591,592,593}. El fet més controvertit a l'inici de les campanyes de prevenció, va ser amb quina quantitat d'àcid fòlic s'havia de suplementar^{594,595,596}, fins que el 1992 l'*US Public Health Service* va recomanar que les dones en edat fèrtil prenguessin 400 µg d'àcid fòlic al dia⁵⁹⁷, quantitat que ha mostrat una eficaç reducció dels DTN, sobretot, en les àrees d'alta incidència⁵⁹⁸. Es va considerar que la suplementació amb 400 µg d'àcid fòlic, seria suficient per obtenir una reducció aproximada del 50% de casos, sobretot referents a anancefàlia i espina bífida, com a màxims responsables de la càrrega socio-sanitària causada per el conjunt dels DTN. També es va considerar una quantitat segura si la ingesta diària no era > 1 mg/dia, límit superior d'ingesta a partir del qual es considera la possibilitat que es pugui donar un emmascarament de la deficiència en cobalamina^{55,599}.

A Espanya la incidència d'espines bífides i anencefàlies per cada 10000 naixements és de 0,88 i 0,10, respectivament, tenint en compte els avortaments voluntaris⁶⁰⁰. La raó per aquesta baixa incidència no es coneix, però s'ha suggerit que un dels motius podria ser la dieta mediterrània, rica en vegetals, llegums i fruits secs, aliments amb important

contingut en folat^{601,602}. A Espanya les polítiques oficials de suplementació amb àcid fòlic i les campanyes informatives als professionals, van començar el 2001⁶⁰³. En un estudi, en el qual es va implicar el grup de treball de l'*Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas* (ECEMC)⁶⁰⁴, es va mostrar que la proporció de mares que no prenen àcid fòlic disminuïa significativament des de valors propers al 90%, entre els anys 1991-1993, a l'11,5% el 2004, mentre que la proporció de les mares que en prenen quan ja estaven embarassades, augmentava significativament d'un promig inicial del 10% fins al 71,1% el 2004. En referència a les mares que prenen àcid fòlic abans de l'embaràs, les primeres dades són del 1996 i la seva proporció augmenta significativament, però el 2004 només arriba al 17,4%. Així, tot i que la majoria de les dones prenen àcid fòlic quan saben que estan embarassades, el percentatge de dones que el prenen abans de l'embaràs és encara molt baix. Pel que fa a les dosis ingerides, en el mateix estudi es va observar que, més del 50% de les dones que prenen àcid fòlic abans de la concepció o després, en el període 2003-2004, van utilitzar > 1 mg d'àcid fòlic/dia (amb un promig de 4,9 mg/dia) i més del 7% utilitzaren un promig de 8 mg d'àcid fòlic/dia⁶⁰⁴.

El primer país que va adoptar la fortificació obligatòria d'un aliment amb àcid fòlic, com a eina útil per tal de reduir la taxa de DTN, va ser els EUA. La *U.S Food and Drug Administration* (FDA) va recomanar la fortificació de productes de gra, amb 140 µg d'àcid fòlic per cada 100 g de farina de blat, el març de 1996, i aquesta fortificació va passar a ser obligatòria el gener del 1998⁶⁰⁵. Del 2004 al 2007, el nombre de països que havien adoptat regulacions nacionals en referència a la fortificació amb àcid fòlic, va passar de 33 a 52. Estudis posteriors a la implantació de l'obligatorietat de la fortificació, han mostrat una disminució del nombre de casos afectats per DTN. En el cas dels EUA, Canadà i Xile, la disminució ha estat del 26%, 42% i 40%, respectivament⁶⁰⁶.

La fortificació obligatòria ha aportat millores en l'estat nutricional en folats i es considera un dels mètodes més eficaços, per aconseguir fer arribar la quantitat recomanada d'ingesta d'àcid fòlic a la població diana^{607,608,609}. Però aquest fet també repercuteix en l'estat en folats de la població. En comparar l'estat en folats d'un estudi nacional sobre la salut fet als EUA en el període 1988-1994, amb un posterior estudi de les mateixes característiques fet en el període 1999-2000, es va veure que la prevalença d'elevades concentracions en folat sèric (> 45,3 nmol/L) havia augmentat en la gent gran (≥ 60 anys) del 7% al 38%, increment, però, encara més marcat, del 7% al 43%, en el cas de nens de 3 a 5 anys⁶¹⁰. Així, doncs, tot i aportar millores, la fortificació obligatòria necessita un pla detallat per a l'avaluació no només de l'efecte que pot tenir sobre la població, sinó també dels protocols de seguretat necessaris en un procés d'aquest tipus,

que haurien de permetre la detecció de conseqüències no desitjades ja des de les etapes inicials⁶¹¹. El problema de l'excés d'ingesta d'àcid fòlic sembla influenciat per la quantitat d'àcid fòlic afegit als aliments. S'ha comprovat que una considerable proporció de productes contenen més folats totals dels que tenen establerts per regulació⁶¹². Als EUA, tot i que l'objectiu era fortificar amb 140 µg/100 g de producte, la FDA va acceptar un rang de 95-309 µg/100 g per permetre als fabricants una certa flexibilitat, a fi d'assegurar que les quantitats requerides pels reglaments i declarades en les etiquetes, estiguessin presents durant la vida útil del producte⁶¹³. Sembla, però, que no hi ha dades que confirmen el fet de la necessitat d'un excés d'àcid fòlic, a causa de la seva "inestabilitat" quan s'afegeix a productes de gra⁶¹². El resultat final sembla ser una ingesta d'àcid fòlic dues vegades més gran del que s'havia previst^{614,615}. Tot i això, la ingesta excessiva d'àcid fòlic i els problemes posteriors que això pot comportar, semblen conseqüència, no tant a la fortificació en si, sinó al fet d'ajuntar-hi l'ús de suplementes⁶¹⁶. Prendre suplementes pot augmentar la prevalença d'ingestes per sobre el límit segur⁶¹⁷. Als EUA, aproximadament el 40% de la població pren suplementes i el 46% d'aquests no en prenen un de sol, sinó que consumeixen productes amb combinacions de vitamines i minerals. Aquest fet pren més transcendència en considerar que els majors consumidors de suplementes són els nens d'entre 1-5 anys⁶¹⁸, ja que el límit d'ingesta segura no és com en els adults (1 mg/dia), sinó que, per a nens d'1 a 3 anys i de 4 a 8 anys, és de 150 µg i 200 µg, respectivament⁵⁹⁹. En la ingesta de suplementes en nens, s'ha arribat a trobar com la ingesta total de folats superava el límit d'ingesta segura en > 50%⁶¹⁹.

11.4.- Cofortificació àcid fòlic-cobalamina

Una opció plantejada per prevenir el possible "emascarament" de la deficiència en cobalamina, tema controvertit⁶²⁰, és la cofortificació àcid fòlic-cobalamina^{621,622,623,624}, proposta també recomanada en estudis fets postfortificació, en què s'observen millores substancials en l'estat en folats, encara que les millores en l'estat en cobalamina són menys pronunciades^{625,626}. L'augment de l'efectivitat dels beneficis dels folats quan es complementen amb la cobalamina ja s'observa en la dieta. Estudiant la població que no utilitza suplementes, s'ha observat que el consum elevat de folats dona una disminució del risc de càncer de mama, relació especialment evident entre les dones amb consum de grans quantitats de cobalamina en la dieta^{627,628}.

Els objectius a complir en la fortificació amb cobalamina serien dos: evitar l'evolució d'anomalies neurològiques, causades per deficiència en cobalamina no detectada a causa de l'exposició de la fortificació amb àcid fòlic, i contribuir a reduir l'elevada freqüència de deficiències lleus o subclíniques en cobalamina, presents, generalment, entre la gent gran³⁹⁸, en diferents graus de gravetat i implicacions en la salut. Un exemple d'aquestes

implicacions és la influència que exerceix la deficiència en cobalamina sobre una malaltia comuna en les persones grans, l'osteoporosi. S'ha vist que la població gran femenina amb estat marginal en cobalamina sèrica (210-320 pmol/L) i deficient (< 210 pmol/L), té més risc de patir osteoporosi que les dones amb estat normal en cobalamina (> 320 pmol/L)^{629,630}. Aquests resultats es van confirmar, posteriorment, també en població gran masculina⁶³¹.

Petites dosis de suplementació amb cobalamina podrien ser suficients per reduir la proporció de casos preclínic de deficiència²⁶⁷. A curt termini, s'ha vist que la suplementació amb cobalamina és efectiva. Dades de l'estudi Framingham indiquen que dels participants amb cobalamina sèrica < 258 pmol/L, només el 16% prenen suplement diaris amb 6 µg de cobalamina. En canvi, dels individus amb cobalamina sèrica ≥ 258 pmol/L, el 40% en prenen. Un altre dels beneficis de la cofortificació folats-cobalamina és que podria reduir més els casos de DTN respecte a la fortificació només amb folats^{35,383,385,386,388,390,395,396,632}. També s'ha vist que, en la prevenció de malalties coronàries, la disminució del risc amb suplementació amb àcid fòlic és més efectiva si s'hi afegeix la suplementació amb cobalamina⁶³³. Però la suplementació en petites dosis no és suficient quan hi ha problemes de malabsorció, ja que, en aquests casos, les quantitats necessàries haurien d'augmentar a 500-1000 µg per tal de mantenir un estat normal de cobalamina sèrica²⁴¹. De la mateixa manera, els casos diagnosticats com anèmies megaloblàstiques i/o disfuncions neurològiques, necessiten una intervenció personalitzada que pot implicar des de dosis intramusculars a grans quantitats orals. Aquestes patologies no poden curar-se amb fortificació dels aliments de la dieta³⁹⁸.

La forma de deficiència en cobalamina que permet justificar la fortificació i que podria respondre a petites dosis orals, és la deficiència lleu i asimptomàtica, que, generalment, només implica canvis bioquímics i obvia els morfològics, i que es va començar a considerar punt important d'estudi a partir del 1980^{634,635}. La deficiència subclínica rarament sorgeix a partir de la manca d'absorció per factors relacionats amb el factor intrínsec, sinó que, en el 30-50% dels casos, es caracteritza per una malabsorció de la cobalamina dels aliments. És una malabsorció parcial, resultat de defectes en l'alliberament de la cobalamina dels aliments, fent que no pugui assimilar-se pel factor intrínsec per tal de ser absorbida, i que acaba portant de manera molt lenta, però progressiva i potser, fins i tot, fluctuant, a la deficiència en cobalamina^{636,637} (**Figura 12**).

Si la deficiència subclínica, que, actualment, es defineix només pels canvis bioquímics, és l'objectiu adequat per a la fortificació amb cobalamina, l'adequació de la fortificació

depèn de demostrar les conseqüències sanitàries de la deficiència subclínica, i la seva capacitat de resposta a petites dosis orals de cobalamina. Un dels arguments més importants és que, si la deficiència subclínica no es tracta, podria progressar cap a la deficiència clínica amb possibles conseqüències greus, com l'anèmia megaloblàstica i la disfunció neurològica. Però la progressió de la deficiència subclínica a clínica no es dona en la majoria de casos²⁶⁴. Fins i tot, els canvis bioquímics com ara l'augment en la concentració de MMA, que defineixen la deficiència subclínica, es mantenen estables durant anys i, espontàniament, es normalitzen més (44%) que no pas empitjoren (16%)¹⁷⁵.

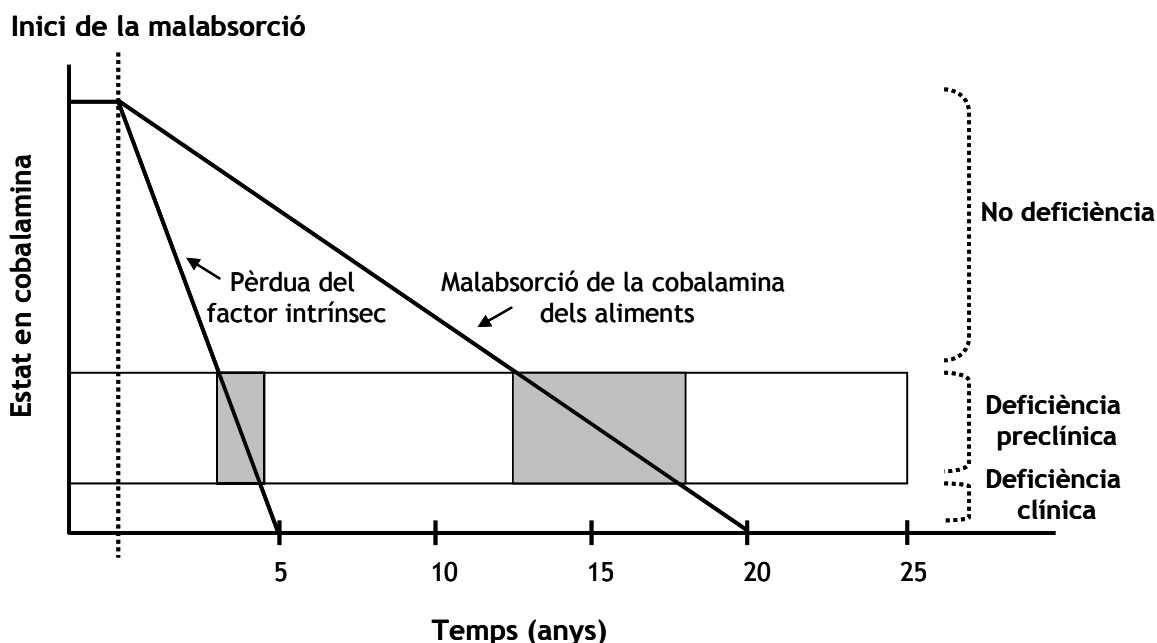


Figura 12. Comparació teòrica de la progressió de l'esgotament de la cobalamina, en situacions de pèrdua de factor intrínsec o de malabsorció de la cobalamina dels aliments (Modificació de Carmel R, 1997⁶³⁸)

L'efectivitat de la fortificació amb cobalamina podria estar limitada per la seva biodisponibilitat. El factor intrínsec maximitza l'eficiència d'absorció (> 50% de cobalamina biodisponible de la ingesta d'1-2 µg). No obstant això, aquest mecanisme té una capacitat limitada i se satura, amb una caiguda en picat de la biodisponibilitat quan la quantitat ingerida excedeix dels 1-2 µg. Si el factor intrínsec desapareix o fallen els seus receptors ileals, la biodisponibilitat disminueix a l'1,2%. Com a resultat, les pèrdues diàries d'1 µg, generalment substituïdes pel 50% de biodisponibilitat de les ingestes diàries recomanades de, 2,4 µg, només poden ser substituïdes, en les persones amb malabsorció, quan el consum s'eleva a 500-1000 µg al dia²⁴¹.

Considerant que el percentatge absorbit de CNCbl, ingerida via oral i en absència de factor intrínsec, és d'1%, s'ha calculat que la quantitat mínima que s'hauria d'afegir al

gra o als suplementes seria de 10 µg, per tal d'assegurar l'absorció de 0,1 µg. Però, a això, cal afegir que, als EUA, la majoria dels grans estan fortificats amb ferro i que més del 40% d'americans prenen suplementes diaris de vitamina C^{639,640,641}. Quan 200 mg de vitamina C, juntament amb les quantitats recomanades de ferro, arriben a l'estómac amb la cobalamina, en 30 minuts es destrueix, aproximadament, el 40% de la cobalamina. En aquests casos, la quantitat calculada de CNCbl hauria de ser de 25 µg, per aconseguir una absorció d'aproximadament 13 µg⁶⁴².

Independentment de la biodisponibilitat de la cobalamina ingerida per individus amb problemes d'absorció o sense, aquesta decau cap al 40% quan és ingerida amb menjar²⁴¹, fet que complica més l'estratègia de fortificar determinats aliments. A més hi ha debat sobre les conseqüències de l'addició de cobalamina al pa i als cereals. Mentre per una banda, l'avaluació de la producció i qualitat del pa fortificat amb cobalamina, afegint fins a 1000 µg/100 g de farina, no sembla afectar la massa del pa fortificat⁶⁴³, per l'altra s'ha suggerit que l'addició de la cobalamina pot canviar les propietats colorimètriques dels pigments presents en els aliments i/o, les condicions químiques que poden influir en el color final del producte, que resultaria en una coloració rosàcia i el faria menys atractiu per al consumidor⁶⁴².

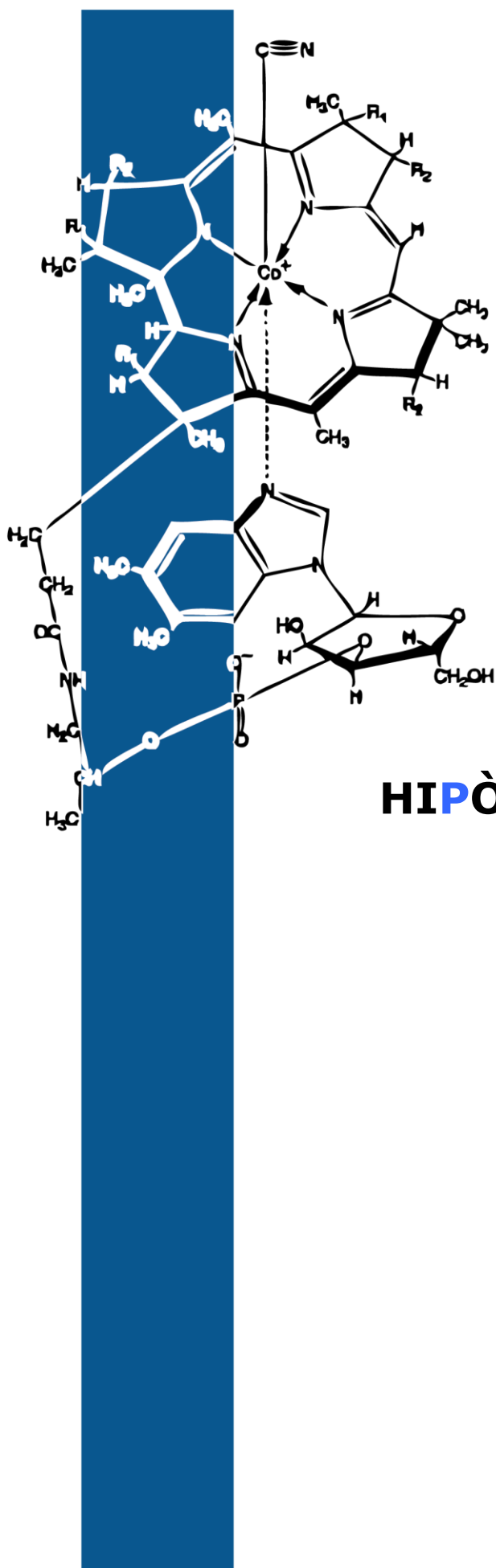
A Espanya es comercialitzen aliments fortificats voluntàriament amb àcid fòlic, amb una addició conjunta de CNCbl i vitamina B₆ (piridoxina). El grup d'aliments majoritari és el dels cereals i derivats (52%), seguit de productes làctics (17%). La majoria de productes no tenen població diana (37%), o van dirigits a població que fa dieta per reduir pes (28%) o infantil (23%), i són minoritaris els dirigits a dones en edat fèrtil (2%). Tot i aquests registres, no es tenen dades específiques i no és possible avaluar-ne l'impacte en la ingesta de la població⁶⁴⁴.

Taula 13. Resum de qüestions per resoldre amb les aportacions de la tesi

Coneixements previs	Qüestions per resoldre
La deficiència en cobalamina es considera poc comuna a la població general no vegetariana, els requeriments són petits i ingerits normalment en una dieta omnívora ²⁵⁹ a més la vitamina es conserva en la circulació enterohepàtica ⁸⁴ .	Algun sector d'una població adulta amb un baix seguiment de dieta vegetariana té risc de deficiència en cobalamina?
L'HoloTC podria ser un marcador més sensible al canvi en la ingesta de cobalamina en forma de suplement ¹⁵¹ .	La determinació de l'HoloTC plasmàtica a més de la cobalamina aportaria més informació respecte l'estat en cobalamina?
L'HoloTC plasmàtica disminueix en aproximadament un 24% durant la primera meitat de l'embaràs i després s'estabilitza ³⁰⁸ . Contràriament s'ha afirmat ³⁴⁶ que les concentracions d'HoloTC no varien en tot l'embaràs.	Quins factors determinen si l'HoloTC varia durant l'embaràs?
La concentració de MMA plasmàtic en el cordó, és major a la concentració de la gestant en el moment del part, tot i que l'estat en cobalamina del cordó és més elevat ^{166,308,363} . No es pot descartar que pugui ser un fet comú en el període neonatal ³⁶⁹ . Podria ser la necessitat de satisfer l'alta taxa metabòlica durant la vida postnatal ³⁵⁶ .	Les concentracions més elevades de MMA en el cordó es relacionen amb deficiència en cobalamina?
Diferents estudis d'intervenció han mostrat que la cobalamina plasmàtica segueix la tendència a disminuir durant l'embaràs, tot i l'ús de suplement amb cobalamina ^{310,348} .	L'ús regular de suplement amb 2 µg de CNCbl afecta l'estat en cobalamina de la gestant? I del cordó?
1 de cada 20 dones podria començar l'embaràs amb concentracions deficientes de cobalamina sèrica (< 125 pmol/L) ³⁷⁷ . Diferents estudis han considerat els efectes de la deficiència nutricional en cobalamina en la salut tant de les mares com dels seus nounats, considerant, entre altres aspectes, casos preterme ³³² , baix pes al néixer ³⁵⁷ o DTN ^{378,379} .	L'estat en cobalamina al principi de l'embaràs és un factor determinant de l'estat de la gestant durant tot l'embaràs? I del cordó?
La cobalamina i els folats comparteixen una única via metabòlica catalitzada per la MS, la remetilació de la Hcy a metionina. L'activitat de la MS es pot veure afectada per polimorfismes presents tant en el gen <i>MTR</i> , com <i>MTRR</i> . Per altra banda, els requeriments d'HoloTC i folats, podrien ser més elevats en presència dels polimorfismes en els gens de la <i>TCII</i> i del <i>MTHFR</i> respectivament.	Els polimorfismes dels gens que regulen enzims implicats en el metabolisme de la cobalamina, s'associen amb l'estat en cobalamina a la població adulta?

(Continua a la pàgina següent)

Coneixements previs	Qüestions per resoldre
<p>En l'embaràs l'estat baix amb cobalamina s'ha relacionat amb l'augment del risc de CIR³³³ i, amb una predisposició tant de les gestants com els seus nounats a l'adipositat excessiva i a la resistència a la insulina^{222,336,712}. La hipertensió gestacional s'ha relacionat amb l'hiperhomocisteïnèmia⁷¹³.</p>	<p>L'estat en cobalamina i els polimorfismes que afecten el seu metabolisme s'associen amb complicacions de l'embaràs?</p>
<p>En presència de la fortificació obligatòria de la farina amb àcid fòlic, la combinació de baix estat en cobalamina amb elevat estat en folats, s'associa amb un empitjorament de les conseqüències metabòliques, com tHcy i MMA elevats. S'ha plantejat que un estat elevat en folats pot contribuir a l'exacerbació de les manifestacions clíniques pròpies de la deficiència en cobalamina^{220,221,222}. S'ha comprovat com un estat baix en cobalamina, s'associa de manera més evident amb la deficiència en cobalamina quan l'estat en folats és elevat^{288,289}.</p>	<p>La combinació d'estat elevat en folats i baix en cobalamina, s'associa amb un pitjor estat funcional en cobalamina respecte un estat baix en cobalamina combinat amb un estat baix/normal en folats, en una població no exposada a la fortificació obligatòria?</p>



HIPÒTESIS I OBJECTIUS

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

HIPÒTESI GENERAL

De forma secundària a l'aportació dietètica, l'estat en cobalamina en una població majoritàriament no vegetariana, serà determinat per polimorfismes en gens que intervenen en el seu metabolisme o transport, l'ús de suplementes vitamínics i situacions de major demanda de cobalamina com l'embaràs.

HIPÒTESI ESPECÍFICA

En situacions de deficiència marginal, les reserves de cobalamina en els teixits contribueixen al manteniment de la cobalamina plasmàtica, atenuant la seva disminució. L'anàlisi de biomarcadors funcionals implicats en el metabolisme i transport de la cobalamina, pot complementar la determinació exclusiva de la concentració de cobalamina plasmàtica, i permetre la detecció precoç d'estats deficients.

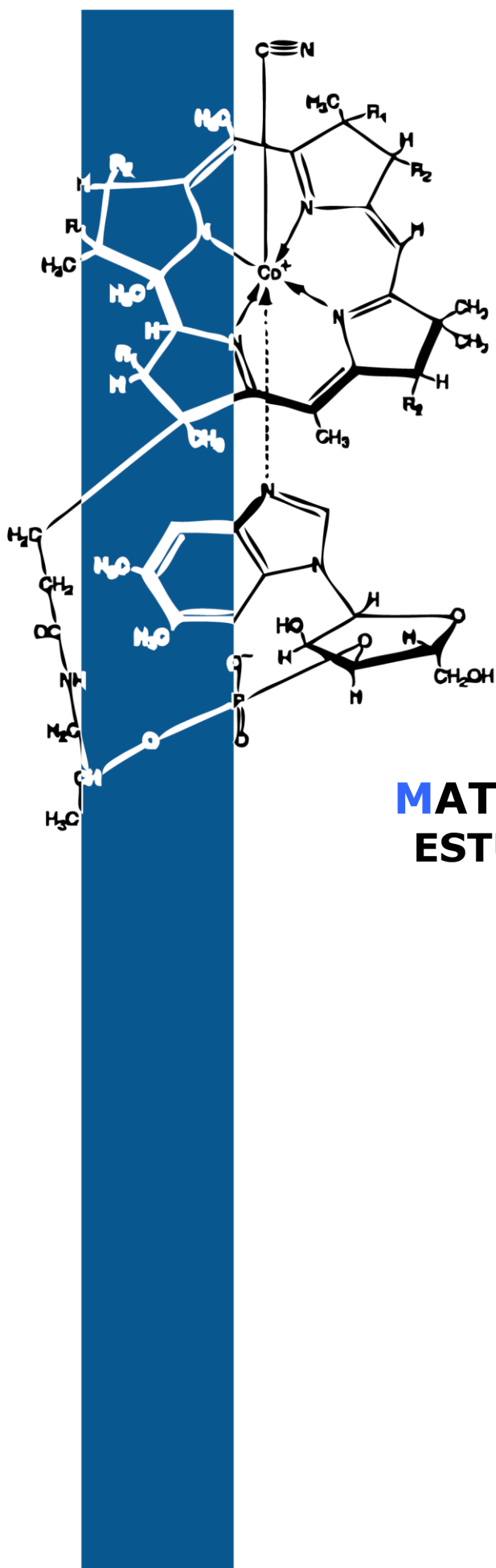
OBJECTIUS

Investigar en un estudi transversal d'una població adulta local que no pren suplementes amb cobalamina

- 1) L'estat en cobalamina.
- 2) Les freqüències genotípiques dels polimorfismes implicats en el metabolisme de la cobalamina, i la seva associació amb l'estat en cobalamina.
- 3) Els factors predictius de les concentracions sèriques dels indicadors bioquímics de l'estat en cobalamina, en la població general, en les dones d'edat fèrtil i en la gent gran.
- 4) La influència de l'estat en folats en presència de baix estat en cobalamina, sobre indicadors funcionals de l'estat en cobalamina.

Investigar en un estudi longitudinal de l'embaràs en gestants no vegetarianes

- 5) L'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs i en el cordó.
- 6) Si el consum regular declarat de suplementes multivitamínics amb baixes dosis de cobalamina, s'associa amb una evolució diferent d'estat en cobalamina al llarg l'embaràs i en el cordó, respecte al no consum/consum esporàdic.
- 7) Si l'estat en cobalamina a principis de l'embaràs, influeix en l'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs i en el cordó.
- 8) L'associació entre els polimorfismes implicats en el metabolisme de la cobalamina, i el seu estat, al llarg de l'embaràs i en el cordó.
- 9) La relació de l'estat en cobalamina amb la diabetis gestacional, el part preterme espontani i el creixement intrauterí retardat.
- 10) Els factors de risc per baix estat en cobalamina durant l'embaràs.
- 11) La influència de l'estat en folats en presència de baix estat en cobalamina, sobre indicadors funcionals de l'estat en cobalamina durant l'embaràs.



MATERIALS I MÈTODES ESTUDI POBLACIONAL I ESTUDI NUTCIR

MATERIALS I MÈTODES

La investigació de la regulació metabòlica de l'estat en cobalamina, tant en la població adulta com durant l'embaràs, ha implicat l'anàlisi de mostres de dos estudis diferents i independents en el temps.

1. ESTUDI POBLACIONAL

1.1. Disseny de l'estudi i reclutament dels participants

Estudi transversal portat a terme entre els anys 1998 i 2002 a la Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública, de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* (FMCS), de la *Universitat Rovira i Virgili* (URV) en col·laboració amb els centres d'assistència primària de tres municipis de la província de Tarragona. Es van reclutar els voluntaris per tal de conformar una mostra representativa de la població adulta local (entre 18 i 75 anys), estratificada per edat i sexe. Els criteris d'exclusió van ser: ús de suplementes vitamínics del grup B, tractament amb injeccions de cobalamina, funció renal alterada ($> 97 \mu\text{mol/L}$ de creatinina sèrica per les dones i $> 124 \mu\text{mol/L}$ per els homes)⁶⁴⁵, ús de medicaments que afectessin el metabolisme dels folats, com els que tenen com a principi actiu l'àcid valproic o el metotrexat, embaràs, part en els últims 6 mesos i lactància materna. L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la Fundació Jordi Gol i Gurina.

Els candidats es van seleccionar mitjançant un mostreig aleatori simple, a partir dels registres dels padrons de 1996 de l'ajuntament dels tres municipis. L'equip investigador va seleccionar a l'atzar 1563 individus, als quals es va enviar una carta informativa sobre l'estudi. Posteriorment, es va procedir a posar-s'hi en contacte telefònicament per a convidar-los a participar. No es va poder contactar amb 238 individus per diferents causes: errors en les dades del registre (adreça, número de telèfon, etc.), canvis de residència, defunció, etc. Dels 1325 individus restants, 126 van quedar fora de l'estudi en aplicar els criteris d'exclusió (explicats al paràgraf anterior), 391 van declinar participar-hi i 32, encara que inicialment van acceptar, després no es van presentar a la revisió mèdica concertada. Com a resultat 776 participants van entrar a l'estudi (65% de la població elegible) (**Figura 1M**). Tots els participants van ser informats de la naturalesa de l'estudi i van firmar el consentiment informat d'acord amb la Declaració d'Hèlsinki⁶⁴⁶.

Als individus inclosos en l'estudi se'ls va realitzar un reconeixement mèdic i una citació per a una analítica de sang. Entre altres mesures antropomètriques, se'n va registrar el pes i l'alçada. També se'ls va fer una entrevista personal sobre hàbits i estil de vida.

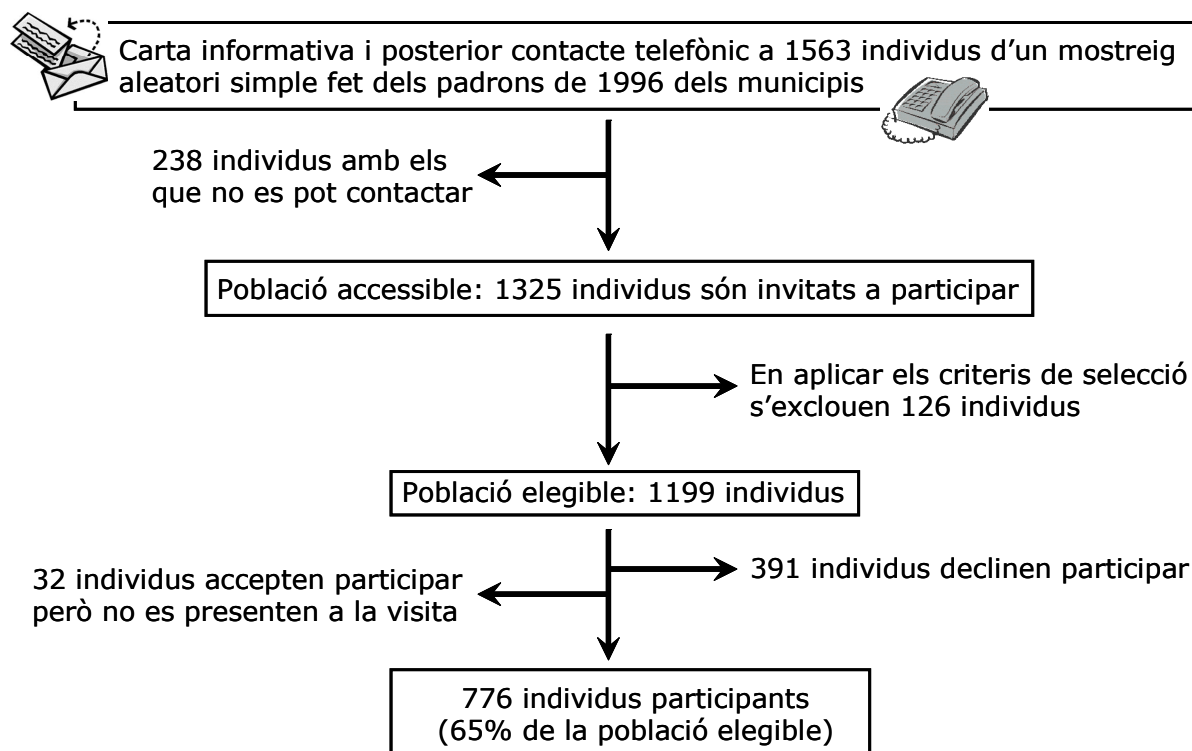


Figura 1M. Reclutament de voluntaris per l'Estudi Poblacional

1.2.- Recollida de les mostres sanguínies

En les extraccions de sang, realitzades en dejú, a primera hora del matí al *Centre d'Atenció Primària (CAP)* del municipi corresponent, s'extreien per punció antecubital 20 mL de sang amb EDTA-K₃, 20 mL de sang amb heparina-liti i 20 mL de sang amb un tub sense anticoagulant (tub sec). Es va registrar l'hora d'extracció i les mostres es van mantenir a 4°C fins a iniciar el processament a la FMCS. Les mostres es van transportar del CAP a la FMCS amb nevera. L'hora d'iniciar el processament també es va registrar, per assegurar que fos dins un temps inferior a 2 hores des del moment de l'extracció. A temperatura ambient, la Hcy és alliberada dels eritròcits, fet que contribueix a un augment de la concentració plasmàtica. Aquest artefacte es prevé mantenint les mostres en fred i processant-les abans de les 2 hores⁶⁴⁷.

1.3.- Processament de mostres i obtenció de les fraccions sanguínies

El protocol va ser el mateix tant per a l'Estudi Poblacional com per l'estudi NutCIR. Del tub d'extracció sense anticoagulant (tub sec), es va obtenir sèrum, centrifugant 15 minuts a temperatura ambient a 1100 x g. Les alíquotes, de 250-1000 µL, es van guardar a -80°C. Del tub d'EDTA-K₃ es va obtenir el plasma, centrifugant 15 minuts a 4°C i 1100 x g, i es van congelar les alíquotes obtingudes, de 250-1000 µL a -80°C.

Amb la resta de contingut del tub d'EDTA-K₃, es van obtenir els eritròcits rentats i els leucòcits.

1.3.1.- Obtenció dels eritròcits rentats

Del tub d'EDTA-K₃, un cop separat el plasma, es van dispensar 500 µL d'eritròcits en un tub d'assaig de fons cònic de 10 mL posat en gel, on s'havien afegit 5mL de sèrum fisiològic*. Seguidament, es va barrejar per inversió i es va centrifugar durant 5 minuts a 480 x g a 4°C, per després descartar el sobrenedant amb una pipeta de transferència. Es van tornar a afegir 5 mL de sèrum fisiològic i es va repetir el procés fins haver fet tres rentats. Fet l'últim rentat es van diluir els eritròcits rentats 1/5 amb aigua Mili-Q en fred, i es van congelar les alíquotes obtingudes, de 350 µL, a -80°C.

1.3.2.- Obtenció dels leucòcits

Un cop obtingudes les alíquotes dels eritròcits rentats, es va procedir, de la resta del contingut del tub d'EDTA-K₃, a obtenir els leucòcits, afegint PBS* (*Phosphate Buffered Saline*) fins acabar d'omplir el tub. Seguidament, es va barrejar per inversió i es va decantar tot el volum de sang amb PBS en un tub Falcon de 50 mL, on prèviament s'havien afegit 30 mL d'una solució d'hemòlisi* a base de sals d'amoni, per tal d'hemolitzar els eritròcits. Es va tornar a barrejar per inversió i es va deixar reposar a temperatura ambient 20 minuts. Passat aquest temps, es va centrifugar durant 5 minuts a 1100 x g per després descartar el sobrenedant per decantació. Les vores del botó de leucòcits resultant, es van rentar amb solució d'hemòlisi i, un cop el botó estava net, es va resuspendre amb la mateixa solució. Es va repetir el procés de rentat una vegada més i, al final, es va deixar assecar el tub Falcon amb el botó de leucòcits, girat i inclinat sobre un paper absorbent. Una vegada sec, el botó de leucòcits es va resuspendre amb 900 µL de PBS i es va transferir a un criotub, prèviament autoclavat, que es va guardar a -80°C, fins que es va procedir a extreure'n l'ADN.

[*Quant als protocols per a la preparació de reactius, vegeu Annex 3].

1.3.3.- Extracció de l'ADN genòmic

Aquest procés es va realitzar amb el kit d'extracció Puregene (*Genra Systems, Minneapolis, MN, USA*). Constava de quatre fases en les quals el material amb què es treballava era estèril o havia estat prèviament autoclavat.

Lisi cel·lular: un cop descongelada l'alíquota de leucòcits, es va traspasar a un tub amb 10 mL de *Cell Lysis Solution* (ref. D-5F2, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA), que es va deixar reposar a temperatura ambient i en fosc fins que les cèl·lules van estar lisades, fent que, en trencar-se la membrana plasmàtica, s'obtinguessin les fraccions de les cèl·lules leucocitàries en solució. El temps de permanència en *Cell Lysis Solution* era, com a mínim, d'un mes. El temps depenia de la quantitat de material leucocitari. Es va passar al següent pas de precipitació quan ja no es va observar material en suspensió.

Precipitació proteica: les cèl·lules lisades es disposaven en un tub cònic de 30 mL on prèviament s'havien afegit 3,33 mL de *Protein Precipitation Solution* (ref. D-5F3, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA). Per tal d'obtenir una mescla homogènia, es va vortejar i incubar en gel 2 hores. Passat aquest temps es va centrifugar a 1289 x g durant 15 minuts a 4°C, obtenint l'ADN en suspensió al sobrenedant sense impureses i, un botó blanc compacte que contenia les restes cel·lulars.

Precipitació de l'ADN: un cop recuperat el sobrenedant es va dispensar en un tub Falcon de 50 mL amb 10 mL d'isopropanol fred, per tal de produir la condensació de l'ADN. Es va barrejar fent 50 inversions consecutives, fins que es va visualitzar la *medusa d'ADN* (precipitat d'ADN en forma de filaments). Seguidament, es van fer dues centrifugacions a 1289 x g durant 5 minuts a 4°C. Un cop acabada la primera centrifugació, es va descartar el sobrenedant i es van afegir 10 mL d'etanol al 70% fred, invertint diverses vegades per tal de netejar el botó. Un cop acabada la segona centrifugació, es va tornar a eliminar el sobrenedant i es van deixar evaporar les restes d'etanol a temperatura ambient durant 30-40 minuts.

Hidratació de l'ADN: al tub que contenia el botó d'ADN, s'hi van afegir 1200 µL de *DNA Hydration Solution* (ref. D-5F4, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA), i es va deixar hidratar uns 3-4 dies a temperatura ambient i en agitació. Per a conservar la mostra, es va fer un pols de centrifuga i es va traspasar a un criotub, on es va afegir una gota de cloroform per tal d'evitar-ne la contaminació per fongs. El criotub es va emmagatzemar a 4°C.

1.4.- Determinacions bioquímiques i genètiques

Les determinacions bioquímiques analitzades es van realitzar a partir de mostres plasmàtiques preparades amb EDTA-K₃. L'HoloTC es va determinar de les mostres plasmàtiques preparades amb heparina-liti.

En el cas de realitzar determinacions bioquímiques a l'estranger, les mostres es van transportar en neveres amb gel sec per missatger.

Cobalamina: per a la seva determinació, feta al Departament de Bioquímica de *Trinity College, Dublín* (TCD), es va realitzar un assaig microbiològic utilitzant *Lactobacillus leichmannii*⁶⁴⁸, amb un coeficient de variació intraassaig del 7,1% i interassaig del 10,7%.

Homocisteïna total: es va determinar per immunoassaig quantificat mitjançant polarització de la fluorescència, utilitzant el kit IMx Homocysteine (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA), amb límit de detecció inferior a 0,5 µmol/L, i amb un coeficient de variació total inferior al 3%. A cada tanda de determinacions es va incloure 1 control de concentració elevada (25 µmol/L) i 1 control de concentració baixa (7 µmol/L).

Holotranscobalamina: es va analitzar per immunoassaig utilitzant el kit AxSYM Active-B12 (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA), amb un límit de detecció inferior o igual a 1 pmol/l, i amb un coeficient de variació total inferior al 10%. A cada tanda de determinacions es va incloure 1 control de concentració elevada (48 nmol/L) i 1 control de concentració baixa (21 nmol/L).

Tant per la determinació de la tHcy com per l'HoloTC, es va calibrar la màquina abans d'iniciar les determinacions. Es tornava a calibrar en utilitzar reactius amb un nou número de lot o quan els controls no es trobaven dins l'interval especificat.

Folat: es va analitzar al Departament de Bioquímica de TCD, mitjançant l'assaig microbiològic amb *Lactobacillus casei*⁶⁴⁹. Els coeficients de variació intraassaig i interassaig van ser, respectivament, el 3,8% i el 9,5%.

Creatinina: estudiada per a analitzar l'estat de la funció renal⁶⁵⁰. Es va determinar amb l'analitzador Cobas Mira (Roche, Basel, Switzerland), utilitzant el mètode de Jaffé modificat, amb el kit (ref. 998891) de Química Clínica Aplicada S.A. (Amposta, Espanya). Els coeficients de variació intraassaig i interassaig van ser, respectivament, l'1,72% i el 2,11%.

Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Coefficient (EGRAC) i Erythrocyte Glutamic-Oxaloacetic Transaminase Activation Coefficient (EGOTAC): proves funcionals de l'estat en riboflavina (EGRAC) i piridoxina (EGOTAC) seguint la tècnica de

Mount JN et al⁶⁵¹ amb l'analitzador Cobas Mira (Roche, Basel, Switzerland). Les dues tècniques es basen en el càlcul de la raó entre l'activitat estimulada (amb la forma activa de la vitamina afegida de forma exògena) i la basal de l'enzim, del qual la vitamina actua com a cofactor. Els coeficients de variació intraassaig i interassaig van ser, respectivament, el 0,7% i el 2,9%.

Totes les **determinacions genètiques** es van fer als laboratoris de Bevitall⁶⁵² excepte la del gen metilentetrahidrofolat-reductasa (*MTHFR*) 677C>T, que es va fer a la FMCS, seguint la tècnica descrita per Frosst⁴⁵⁰. Es van determinar els polimorfismes que poden afectar tant el metabolisme de la cobalamina com el seu transport. Del gen *MTHFR* 677C>T⁴⁵⁰ i 1298A>C⁴⁹⁴, del gen metionina-sintasa (*MTR*) el 2756A>G^{504,505}, del gen metionina-sintasa reductasa (*MTRR*) el 66A>G^{399,532} i 524C>T⁵³⁷ i del gen transcobalamina II (*TCII*) els 776C>G^{413,653} i 67 A>G⁴³⁸.

2. ESTUDI D'EMBARÀS: ESTUDI NUTCIR

2.1. Disseny de l'estudi i reclutament de les participants

NutCIR (*Nutrició i Creixement Intrauterí Retardat*) és un estudi longitudinal que implica tot el període de desenvolupament de l'embaràs, des del primer trimestre fins al moment del part. Aquest projecte va ser dissenyat per tal d'avaluar la contribució de l'estat nutricional matern, al desenvolupament del *creixement intrauterí retardat* (CIR) i altres complicacions de l'embaràs.

L'estudi es porta a terme des del 2005 en la Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública de la URV, en col·laboració amb l'*Hospital Universitari Sant Joan de Reus* (HUSJR) i, en el període 2006-2008, també amb l'*Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona* (HUJXXIII). L'estudi va ser aprovat pels comitès d'ètica dels dos hospitals. Totes les voluntàries van ser informades sobre la naturalesa de l'estudi i van signar el consentiment informat d'acord amb la Declaració d'Hèlsinki⁶⁴⁶.

El reclutament de les participants es va donar en la primera visita ordinària de control de l'embaràs, en la Unitat d'Obstetrícia i Ginecologia dels dos hospitals. Totes eren embarassades caucàsiques, amb confirmació ecogràfica d'un embaràs amb fetus viable de menys de dotze setmanes de gestació. Els criteris d'exclusió aplicats van ser: estar de més d'onze setmanes de gestació en la primera visita prenatal, embaràs múltiple, patir alguna malaltia crònica que afecta l'estat nutricional, com la diabetis, la malaltia de

Crohn o la celiaquia, i l'ús de medicaments que interfereixen en el metabolisme dels folats, com els que tenen com a principi actiu l'àcid valproic o el metotrexat.

La població a la que es va poder accedir van ser 1422 gestants. En aplicar els criteris d'exclusió (explicats al paràgraf anterior), van quedar fora de l'estudi 839 gestants, 29 van declinar participar i 9 tot i acceptar participar no es van presentar a l'extracció concertada, resultant una mostra de 545 gestants (93% de la població elegible) (**Figura 2M**).

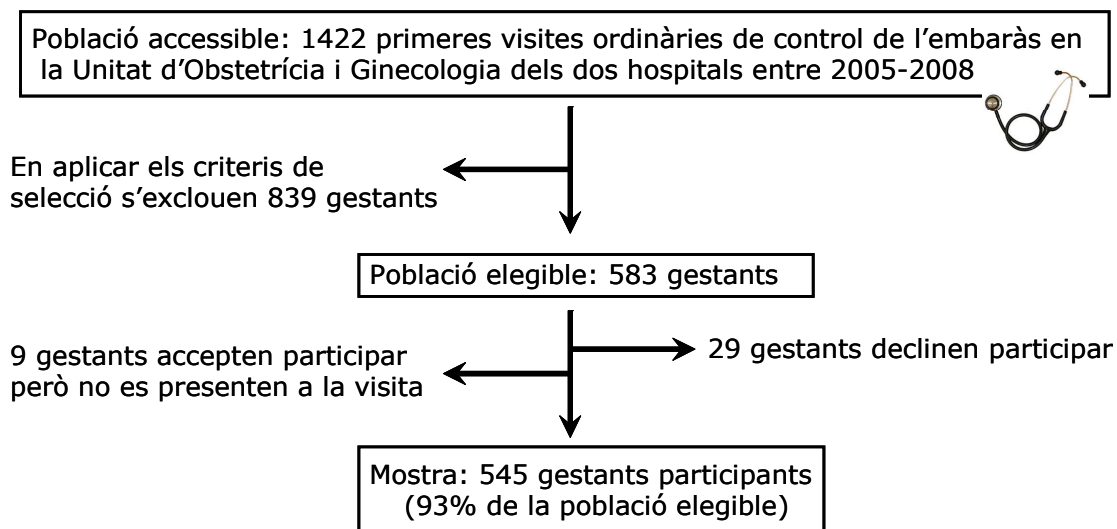


Figura 2M. Reclutament de voluntàries per l'Estudi NutCIR

El disseny de l'estudi consistia en l'obtenció de 5 mostres de sang materna i una del cordó umbilical. La distribució de les extraccions maternes era a les 8-12 (*mostra 1*), 15 (*mostra 2*), 24-27 (*mostra 3*) i 34 (*mostra 4*) setmanes d'embaràs, fetes en dejú, coincidint amb les extraccions realitzades rutinàriament, segons el protocol de seguiment de l'embaràs del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, vigent en els dos hospitals⁶⁵⁴. També es va obtenir mostra durant el treball de part (*mostra 5*) i després del naixement del nadó, de la vena del cordó umbilical (*mostra 6*). A més, es van realitzar dues enquestes de freqüència d'aliments, la primera a les 15 setmanes, cobrint els hàbits dietètics durant el primer trimestre de l'embaràs i la segona el dia després del part, per cobrir la segona meitat de l'embaràs (*vegeu Annex 1*). A cada participant, a més, se li van realitzar dues enquestes (*vegeu Annex 2*), mitjançant entrevistes a les 20 i 32 setmanes de gestació, per tal d'obtenir informació sobre els hàbits i estil de vida, incloent-hi la utilització de medicaments i/o suplementos (**Figura 3M**). Aquests s'identificaven a partir de cartolines amb imatges tant de l'envàs com, quan es tractava de pastilles, del seu contingut. De cada preparat, es va registrar el nombre de preses

setmanals durant cada mes de l'embaràs. En el cas d'enquestes no realitzades o incompletes, la informació es complementava mitjançant les dades registrades a la història clínica. En les entrevistes també es registrava la informació referent als hàbits tòxics de consum de tabac, alcohol i drogues tant durant els 12 mesos previs a l'embaràs, com durant l'embaràs, la ingesta de cereals inflats per esmorzar i el consum de cafè durant l'embaràs. També es va recollir informació sobre la planificació de l'embaràs i les dades sociodemogràfiques familiars, que permeten classificar l'estat socioeconòmic familiar basant-se en la combinació de les professions de la mare i el pare⁶⁵⁵. El motiu de realitzar dues entrevistes va ser per controlar els canvis en els hàbits tòxics i l'ús de suplementos tant durant el primer trimestre com en la resta de l'embaràs.

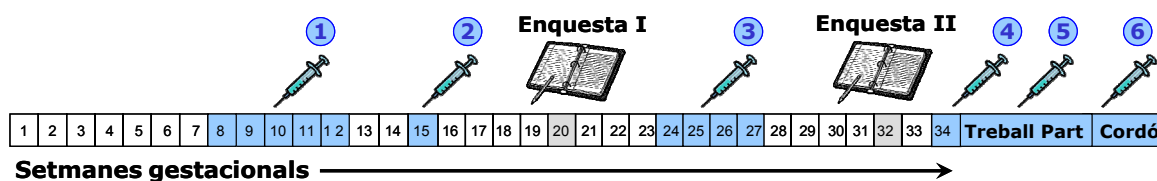


Figura 3M. Disseny de l'estudi NutCIR. 1-6: mostres de sang

En cada visita prenatal de control rutinari de l'embaràs, es mesurava la pressió sanguínia i s'analitzava la primera orina del matí amb tires reactives. Es va classificar la hipertensió gestacional com l'aparició d'una tensió sistòlica (≥ 140 mm Hg), i/o una tensió diastòlica (≥ 90 mm Hg) en dues ocasions separades per 4-6 hores, com a mínim, després de les 20 setmanes gestacionals. La presència de proteïnúria es va definir com l'excreció de proteïna $\geq 0,3$ g/dia en orina de 24 h, o tira reactiva d'orina amb $\geq 2+$ ⁶⁵⁶. Es va diagnosticar la preeclàmpsia com la presència de proteïnúria i hipertensió gestacional.

Seguint les recomanacions de la *Societat Espanyola de Ginecologia i Obstetrícia* (SEGO) i del Sistema Nacional de Salut⁶⁵⁷, els obstetres recepten a les gestants 400 μ g diaris d'àcid fòlic, ingerit en pastilles, des de la primera visita prenatal fins al final del primer trimestre. Per a l'estudi NutCIR, es va receptar a cada gestant un suplement de 400 μ g d'àcid fòlic i 2 μ g de CNCbl.

A Espanya no hi ha obligatorietat de fortificació de la farina amb àcid fòlic, però hi ha productes al mercat fortificats, com els cereals d'esmorzar. Tot i que, entre la població espanyola, el consum de productes fortificats és relativament baix⁶⁵⁸. En les entrevistes d'hàbits i estil de vida, es preguntava sobre el consum de cereals fortificats per esmorzar, fet que es corroborava amb les enquestes de freqüència d'aliments.

Per tal de prevenir l'anèmia en l'embaràs⁶⁵⁹, es recomana la suplementació preventiva amb ferro⁶⁵⁴. En l'estudi NutCIR, es va estandarditzar la suplementació preventiva amb ferro prescrivint a partir de les 12 setmanes, 40 mg diaris de ferro en vials bevibles o pastilles, excepte en els casos d'anèmia en què les gestants eren tractades segons els protocols de l'hospital. L'estat en ferro es controla durant l'embaràs per tal de tractar l'anèmia ferropènica o l'elevat risc d'anèmia, especialment freqüent durant la segona meitat de l'embaràs. També interessa la prevenció de l'anèmia que podria resultar d'una hemorràgia postpart. Cal que les gestants s'adhereixin a la pauta prescrita per l'obstetre per tal de curar o prevenir l'anèmia. No obstant això, moltes gestants no compleixen les recomanacions a causa de molèsties produïdes per les preparacions de 80 i 120 mg de ferro. En l'estudi NutCIR, l'objectiu del règim de suplementació va ser reforçar les reserves de ferro, a través de la suplementació amb dosis inferiors durant més temps, per a minimitzar les molèsties.

La concentració d'hemoglobina sèrica es va obtenir de l'hemograma realitzat en les analítiques rutinàries de control de l'embaràs, mitjançant un analitzador Coulter en els laboratoris centrals dels dos hospitals.

A totes les gestants se'ls va realitzar el Test d'O'Sullivan per tal de detectar la diabetis gestacional. En el cas d'un resultat positiu (≥ 140 mg/dL), la pacient es va sotmetre a un test de tolerància oral a la glucosa, que confirma la diabetis gestacional amb 2 o més punts iguals o superiors als valors normals (valors normals: 0 minuts < 105 mg/ dL, 60 minuts < 190 mg/ dL, 120 minuts < 165 mg/ dL, 180 minuts < 145 mg/ dL)⁶⁵⁴. Durant el seguiment de l'embaràs, també es van registrar els casos de síndrome de Down, malformacions congènites i els avortaments.

Després del part, es va registrar l'edat gestacional i el pes i el sexe del nounat. Es va considerar part prematur espontani aquell que es va donar abans de complir les 37 setmanes gestacionals⁶⁶⁰ i, creixement intrauterí retardat aquell nounat amb pes de naixement inferior al percentil 10 de les taules de pes de naixement, segons el sexe i l'edat gestacional, de la SEGO⁶⁶¹.

2.2.- Recollida de les mostres sanguínies

Les extraccions sanguínies maternes, a excepció de la mostra del treball de part, es realitzaven en dejú per punció antecubital. De cada extracció, es van obtenir 10 mL de sang amb EDTA-K₃ i 10 mL de sang sense anticoagulant (tub sec). Les mostres de cordó s'obtenien per extracció de la vena abans de l'expulsió de la placenta, fet que permetia

optimitzar el volum de sang que es podia obtenir. Les mostres sanguínies es van processar als laboratoris de la FMCS, del Biobanc *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili* (IISPV) i de l'Àrea de Recerca del HUIXIII, depenent del lloc on s'havien visitat les gestants. Les mostres es van mantenir a 4°C i el període entre l'extracció i l'inici del processament no va sobrepassar les 2 hores⁶⁴⁷.

2.3.- Determinacions bioquímiques i genètiques

Les determinacions bioquímiques es van realitzar a partir de mostres plasmàtiques. Totes les mostres del mateix embaràs es van analitzar juntes, en la mateixa tanda, per tal de minimitzar la variabilitat deguda a la tècnica, entre mostres longitudinals.

En el cas de realitzar determinacions bioquímiques a l'estranger, les mostres es van transportar en neveres amb gel sec per missatger.

Cobalamina: es va determinar als laboratoris de Bevitall AS (Bergen, Noruega), utilitzant una adaptació en forma de microplaca, per tal de robotitzar la tècnica, de l'assaig microbiològic que utilitza el *Lactobacillus leichmannii*⁶⁴⁸. La sensibilitat de la tècnica és de 30 pmol/l, amb un coeficient de variació intraassaig del 4% i interassaig del 5%.

Homocisteïna total: es va analitzar amb el kit AxSYM Homocysteine (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA). El límit de detecció va ser inferior o igual a 0,8 µmol/L i el coeficient de variació total, inferior al 5%. A cada tanda de determinacions es va incloure 1 control de concentració elevada (25 µmol/L) i 1 control de concentració baixa (7 µmol/L).

Per la determinació de la tHcy es va calibrar la màquina abans d'iniciar les determinacions. Es tornava a calibrar en utilitzar reactius amb un nou número de lot o quan els controls no es trobaven dins l'interval especificat.

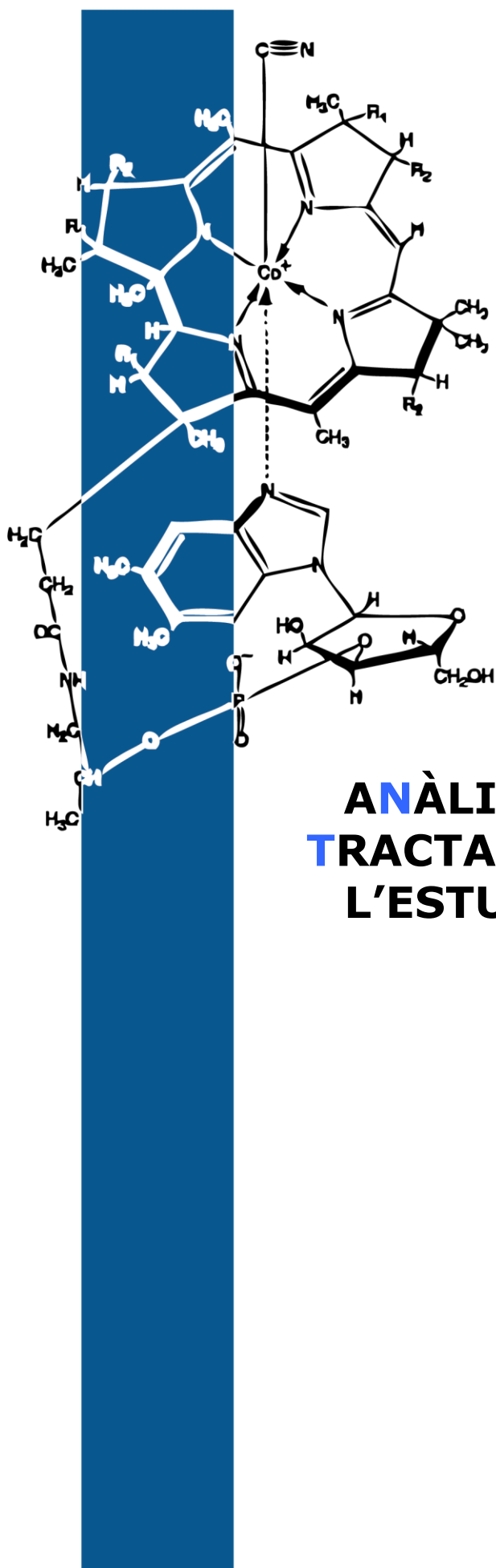
Folat: es va determinar als laboratoris de Bevitall AS (Bergen, Noruega), utilitzant una adaptació en forma de microplaca, per tal de robotitzar la tècnica, de l'assaig microbiològic que utilitza *Lactobacillus casei*⁴⁷¹. La sensibilitat de la tècnica va ser de 2 nmol/L, amb coeficients de variació intraassaig i interassaig del 4% i el 5%, respectivament.

Àcid metilmalònic: es va analitzar als laboratoris de Bevital AS (Bergen, Noruega). La tècnica utilitzada va ser la cromatografia de gasos amb espectrometria de masses (GC-MS)²⁰⁰, amb una sensibilitat de 0,03 µmol/L i coeficients de variació intraassaig i interassaig del 2% i el 2,6%, respectivament.

Cotina (metabòlit de la nicotina): considerada com a marcador de l'exposició recent al tabac⁶⁶², es va analitzar als laboratoris de Bevital AS (Bergen, Noruega). Es va utilitzar el mètode de cromatografia líquida amb espectrometria de masses (LC-MS/MS)⁶⁶³, amb una sensibilitat de 0,18 ng/mL i coeficients de variació del 2-3% intraassaig i 6% interassaig.

L'Holotranscobalamina i la **creatinina** es van determinar amb la mateixa tècnica que en l'estudi poblacional.

Totes les **determinacions genètiques** es van fer als laboratoris de Bevital⁶⁵². Es van analitzar els polimorfismes que poden afectar tant el metabolisme de la cobalamina com el seu transport. Del gen metilentetrahidrofolat-reductasa (*MTHFR*) 677C>T⁴⁵⁰ i 1298A>C⁴⁹⁴, del gen metionina-sintasa (*MTR*) el 2756A>G^{504,505}, del gen metionina-sintasa reductasa (*MTRR*) el 66A>G^{399,532} i 524C>T⁵³⁷ i del gen transcobalamina II (*TCII*) els 776C>G^{413,653} i 67 A>G⁴³⁸.



ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI POBLACIONAL

ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI POBLACIONAL

Consum d'alcohol

En relació a l'alcohol, el consum de risc es considera de ≥ 40 g/dia en els homes i ≥ 24 g/dia en les dones^{664,665}. En l'estudi de la població s'ha marcat el valor de 30 g/dia com a terme mig, tant per homes com per dones, pel fet de ser el valor que correspon al percentil 75 en consumidors habituals d'alcohol de la nostra població.

Punts de tall

Per la deficiència en folats es va considerar una concentració < 7 nmol/L²⁶⁵, en cobalamina ≤ 148 pmol/L¹³² i en HoloTC ≤ 35 pmol/L¹⁵⁴. Com a deficiència marginal es van utilitzar, en folats una concentració entre 7-10 nmol/L, equivalent al tercil baix de la nostra població, en cobalamina 148,1 - 220 pmol/L²²⁶ i finalment en HoloTC 35,1- 45 pmol/L, sent l'últim valor el percentil 10 de la nostra població.

Els resultats de les variables quantitatives s'expressen com a mitjana i desviació estàndard i les qualitatives com a freqüències absolutes i relatives (percentatges).

En l'anàlisi dels paràmetres bioquímics, les variables que no seguien una distribució normal (tHcy i folats), van ser transformades logarítmicament per normalitzar la distribució dels seus valors i poder aplicar les proves estadístiques paramètriques. Les concentracions dels paràmetres bioquímics s'expressen com a mitjana aritmètica (cobalamina i HoloTC), o geomètrica (tHcy i folats) i l'interval de confiança 95%. En les anàlisis on s'examina la tHcy, s'han exclòs els 63 individus amb mostres que no es van processar dins les dues hores posteriors a l'extracció, amb l'objectiu d'evitar valors falsament elevats de tHcy⁶⁴⁷.

Es van comparar proporcions entre grups mitjançant la prova de la Ji-quadrat. Les comparacions entre mitjanes de variables quantitatives amb distribució normal, es van realitzar mitjançant la prova *t* de Student per a dades independents.

Per investigar quins factors poden repercutir en l'estat en cobalamina de la població, es van dissenyar diferents models de regressió lineal múltiple. El model amb la cobalamina, l'HoloTC o la raó HoloTC/Cbl plasmàtica com a variable dependent, es va ajustar per el

consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTRR* 66GG, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'edat (anys), el sexe, l'IMC i la creatinina.

En el model dissenyat per investigar quins factors expliquen la variabilitat en tHcy, es va observar una interacció entre creatinina i sexe, i entre IMC i sexe, per tant es van dissenyar models individuals per homes i dones. Els models amb la tHcy com a variable dependent es van ajustar, tant en el model dels homes com en el de les dones, per consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG, *MTRR* 66GG i *MTHFR* 677TT, folat plasmàtic, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'edat (anys), l'IMC, l'EGOTAC, l'EGRAC i la creatinina. A causa de la correlació entre cobalamina plasmàtica, HoloTC i la raó HoloTC/Cbl, es va investigar la relació entre aquestes variables i la tHcy en models separats. Es va investigar l'associació entre canvis de 50 pmol/L, de 10 pmol/L d'HoloTC i d'1 unitat d'HoloTC/Cbl.

Diferents models d'anàlisi de regressió múltiple, es van utilitzar per investigar els factors associats amb l'estat en cobalamina en les dones d'edat fèrtil (18-44 anys). Els models amb la cobalamina, l'HoloTC i l'HoloTC/Cbl com a variables dependents es van ajustar per consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTRR* 66GG, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'IMC i la creatinina. Els models amb la tHcy com a variable dependent es van ajustar per consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *MTRR* 66GG, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTHFR* 677TT, canvis de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica, folat plasmàtic, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'IMC, l'EGOTAC, l'EGRAC i la creatinina. Es va repetir el mateix model amb la tHcy com a variable dependent però substituint els canvis de cobalamina, per canvis de 10 pmol/L d'HoloTC i d'1 unitat d'HoloTC/Cbl.

Per investigar quins factors poden repercutir en l'estat en cobalamina en la gent gran (60-75 anys) es van dissenyar diferents models de regressió lineal múltiple. El model amb la cobalamina plasmàtica, l'HoloTC o la raó HoloTC/Cbl com a variable dependent, es va ajustar per consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTRR* 66GG, el centre on es va realitzar el treball de camp, el sexe, l'IMC i la creatinina.

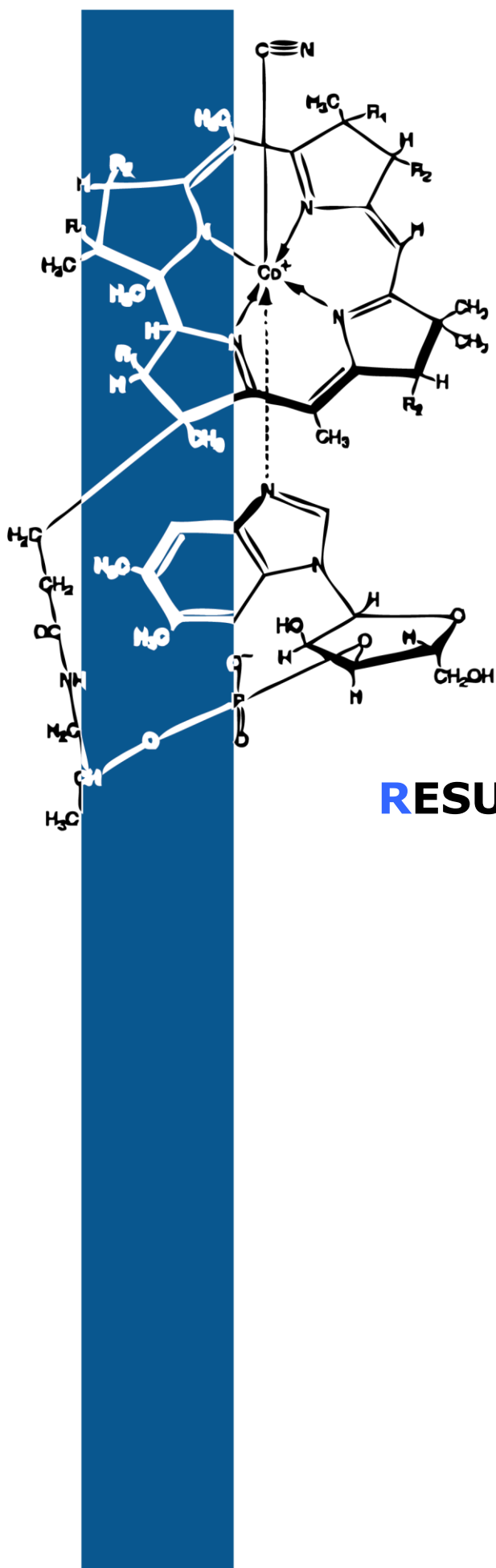
En la gent gran, en el model amb la tHcy com a variable dependent, es va observar interacció entre creatinina i sexe, i entre IMC i sexe, per tant es van dissenyar models

individuals per homes i dones. En els models on només es consideren les dones, no s'inclouen les variables dependents relacionades amb l'hàbit de fumar ni amb l'elevat consum d'alcohol, ja que poques dones grans tenien aquestes característiques. El model limitat a les dones amb la tHcy com a variable dependent, es va ajustar per la presència del genotip *MTRR* 524TT, *MTRR* 66GG, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTHFR* 677TT, canvis de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica, folat plasmàtic, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'IMC, l'EGOTAC, l'EGRAC i la creatinina. El model es va repetir substituint els canvis de cobalamina per canvis de 10 pmol/L d'HoloTC i per l'HoloTC/Cbl. El model limitat als homes, amb la tHcy com a variable dependent, es va ajustar per el consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *MTRR* 66GG, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTHFR* 677TT, canvis de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica, folat plasmàtic, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'IMC, l'EGOTAC, l'EGRAC i la creatinina. El model es va repetir substituint els canvis de cobalamina per canvis de 10 pmol/L d'HoloTC i per l'HoloTC/Cbl.

Per analitzar si el baix estat en cobalamina és més perjudicial a nivell metabòlic en presència d'un elevat estat en folats, es van dissenyar diferents models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors d'estat en cobalamina, a la variabilitat en tHcy segons la combinació d'estat en cobalamina i estat en folats. Aquests models no es van fer per separat entre homes i dones per falta de suficient nombre d'individus per detectar els factors que s'associen de forma significativa amb la tHcy.

En l'estudi dels factors que poden influir en les concentracions de tHcy en la gent amb la combinació de baix estat en cobalamina (tercil baix: cobalamina ≤ 299 pmol/L) i baix-normal ($< 17,9$ nmol/L) en folats en la població, el model amb la tHcy com a variable dependent es va ajustar per el consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG, *TCII* 776CG i *MTHFR* 677TT, els canvis de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica, folat plasmàtic, el centre on es va realitzar el treball de camp, l'edat (anys), el sexe, l'IMC, l'EGOTAC, l'EGRAC i la creatinina. El model es va repetir substituint els canvis de cobalamina per canvis de 10 pmol/L d'HoloTC i per l'HoloTC/Cbl. Per l'estudi dels factors que poden influir en les concentracions de tHcy en la gent amb un baix estat en cobalamina (tercil baix: cobalamina ≤ 299 pmol/L) i elevat en folats (quintil alt: folats $\geq 17,9$ nmol/L) en la població, es van fer els mateixos models però sense incloure la variable independent fumar 1-5 cigs/dia, ja que no hi havia individus amb aquesta característica.

En aquests models no es va ajustar per la presència del genotip *MTRR* 66GG. En considerar aquest genotip el model dels individus amb baix estat en cobalamina i elevat en folats no era significatiu, conseqüència del petit nombre d'individus inclosos. En excloure el genotip, tant el model que considera l'HoloTC, com la raó HoloTC/Cbl, explicaven de forma significativa la variabilitat en tHcy d'aquest grup de participants. L'exclusió d'aquest genotip no varia els resultats ni les conclusions, en els models que inclouen individus amb baix estat en cobalamina i baix-normal en folats.



RESULTATS DE L'ESTUDI POBLACIONAL

RESULTATS DE L'ESTUDI POBLACIONAL

La població s'estratifica en tres grups d'edat: 18-44 anys, en el que s'inclouen les dones d'edat fèrtil, amb una mitjana d'edat de 32 anys, 45-59 anys, amb una mitjana d'edat de 52 anys, i finalment el grup de 60-75 anys, en el que es delimita la gent gran, amb una mitjana d'edat de 68 anys. Entre els tres grups d'edat no hi ha diferències ni en el percentatge d'homes i dones ni en el consum d'alcohol, però sí en l'IMC, que és major a partir dels 45 anys respecte els 18-44 anys, i el consum de tabac, que té una major freqüència en els individus de 18-44 anys, respecte els altres dos grups d'edat, i on dels individus que fumen (46%), el 27% ho fan amb un consum de més de 10 cigarretes/dia (**Taula P1**).

Taula P1. Característiques de la població segons els grups d'edat

Característiques de la població	Mitjana (DE) ¹ [N] o Número (%) [IC 95%]		
	Grup d'edat		
	18-44 anys	45-59 anys	60-75 anys
Edat (anys)	32 (7) [449]	52 (4) [199]	68 (4) [128]
IMC ² (Kg/m ²)	25,2 (4,5) [442]	29,2 (4,6) [195] ^a	29,9 (5,1) [124] ^a
Sexe (homes)	217/499 (48,3) [39,1-48,0]	99/199 (49,7) [42,6-56,9]	60/128 (46,9) [38,0-55,9]
Consum alcohol			
< 30g/dia	133/449 (29,6) [25,4-34,1]	51/199 (25,6) [19,7-32,2]	36/128 (28,1) [20,5-36,8]
≥ 30g/dia	48/449 (10,7) [8,0-13,9]	32/199 (16,1) [11,3-21,9]	15/128 (11,7) [6,7-18,6]
Consum tabac			
1-5 cigarretes/dia	29/449 (6,5) ^b [4,4-9,1]	6/198 (3,0) [1,1-6,5]	8/127 (6,3) [2,8-12,0]
6-10 cigarretes/dia	57/449 (12,7) ^b [9,8-16,1]	4/198 (2,0) [0,6-5,1]	3/127 (2,4) [0,5-6,7]
>10 cigarretes/dia	121/449 (26,9) ^b [22,9-31,3]	28/198 (14,1) [9,6-19,8]	3/127 (2,4) [0,5-6,7]
EGRAC ³	1,4 (0,2)	1,3 (0,2) ^a	1,3 (0,2) ^c
EGOTAC ⁴	1,7 (0,2)	1,7 (0,2)	1,6 (0,2) ^d

¹Desviació estàndard; ²índex de massa corporal; ³indicador funcional d'estat en riboflavina; ⁴indicador funcional d'estat en piridoxina. Prova *t* de Student per a dades independents: ^a*p*<0,001, ^c*p*<0,01, ^d*p*<0,05 respecte a la població de 18-44 anys. Prova de la ji-quadrat entre els tres grup d'edat: ^b*p*<0,001.

Les mitjanes de cobalamina i HoloTC plasmàtiques més baixes, són les presents en el grup de 18-44 anys, però respecte els de 60-75 anys, les diferències no arriben a ser significatives. La raó HoloTC/Cbl no varia entre els diferents grups d'edat. En la gent gran és on s'observa el millor estat en folats però també la major concentració de tHcy (**Taula P2**).

Taula P2. Indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats segons grup d'edat

	Grups d'edat		
	18-44 anys	45-59 anys	60-75 anys
Cbl ¹ (pmol/L)	355(344-367) ² [449]	398(378-419) ^a [197]	366(342-389) ^b [128]
HoloTC ³ (pmol/L)	88,5(82,7-94,2) ² [439]	109,9(97,9-122,0) ^c [197]	100,9(88,7-113,1) [128]
HoloTC/Cbl	0,25(0,24-0,26) ² [439]	0,27(0,25-0,30) [196]	0,28(0,25-0,30) [128]
Folats (nmol/L)	9,7(9,3-10,1) ⁴ [449]	13,7(12,7-14,7) ^a [198]	15,6(14,1-17,2) ^{ab} [128]
tHcy ⁵ (µmol/L)	9,2(8,9-9,5) ⁴ [417]	9,3(8,9-9,6) [184]	10,7(10,2-11,3) ^{ad} [118]

¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica(IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴mitjana geomètrica (IC 95%)[N]; ⁵homocisteïna total. Prova *t* de Student per a dades independents: ^a*p*<0,001, ^c*p*<0,01 respecte a la població de 18-44 anys. Prova *t* de Student per a dades independents: ^b*p*<0,05, ^d*p*<0,001 respecte a la població de 45-59 anys.

En la **Taula P3** es presenta l'estat en folats i cobalamina. En aquesta població que no ha rebut cap tipus de suplementació, s'observa la major prevalença de deficiència en folats, en el grup de 18-44 anys, amb un 27% d'individus amb deficiència en folats i un 28% amb deficiència marginal. La major prevalença de deficiència en cobalamina i HoloTC es troba en el grup de 60-75 anys, amb un 3% i 6% respectivament. La deficiència marginal tant en cobalamina com en HoloTC és més freqüent en el grup de 18-44 anys, amb una freqüència del 10% i 9% respectivament. En considerar la classificació de deficiència marginal en cobalamina i/o HoloTC, la freqüència en els individus entre 18-44 anys és semblant a la del grup de 60-75 anys, amb un 13% i 12% respectivament. Són els individus de 45-59 anys els que presenten una freqüència menor del 6%.

Taula P3. Estat en cobalamina i folats segons grup d'edat

Estat en cobalamina i folats	Número (%) [IC 95%]		
	18-44 anys	45-59 anys	60-75 anys
Deficiència en folats ¹ (< 7 nmol/L)	119/449 (26,5) ^a [22,5-30,8]	18/198 (9,1) [5,5-14,0]	9/128 (7,0) [3,3-12,9]
Deficiència marginal en folats ¹ (7-10 nmol/L)	125/449 (27,8) ^a [23,7-32,2]	36/198 (18,2) [13,1-24,3]	20/128 (15,6) [9,8-23,1]
Deficiència en cobalamina ² (≤ 148 pmol/L)	8/499 (1,8) ^b [0,8-3,5]	-	4/128 (3,1) [0,9-7,8]
Deficiència marginal en cobalamina ² (>148-220 pmol/L)	44/449 (9,8) ^b [7,2-12,9]	8/197 (4,1) [1,8-7,8]	9/128 (7,0) [3,3-12,9]
Deficiència en HoloTC ³ (≤35 pmol/L)	17/439 (3,9) ^b [2,3-6,1]	6/197 (3,0) [1,1-6,5]	7/128 (5,5) [2,2-10,9]
Deficiència marginal en HoloTC ³ (>35-45 pmol/L)	38/439 (8,7) ^b [6,2-11,7]	8/197 (4,1) [1,8-7,8]	2/128 (1,6) [0,2-5,5]
Deficiència marginal en Cobalamina ² (≤220 pmol/L) o HoloTC ³ (≤35 pmol/L)	56/442 (12,7) ^b [9,7-16,1]	12/196 (6,1) [3,2-10,5]	15/128 (11,7) [6,7-18,6]

¹Folat plasmàtic; ²cobalamina plasmàtica; ³holotranscobalamina plasmàtica. Prova de la ji-quadrat entre els tres grup d'edat: ^ap<0,001, ^bp<0,05.

Les freqüències dels polimorfismes *TCII* 776C>G, *TCII* 67A>G, *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *MTRR* 66A>G, *MTRR* 524C>T i *MTR* 2756A>G en la població estan resumides a la **Taula P4**. El polimorfisme amb la freqüència més elevada d'homozigots mutants és el *MTRR* 66A>G amb un 23,8%. Degut a les baixes freqüències (< 13%) d'homozigots mutants dels polimorfismes *TCII* 67A>G, *MTHFR* 1298A>C i *MTR* 2756A>G, no s'han considerat per anàlisis posteriors per falta de potència estadística.

Es van investigar les associacions de factors ambientals i genètics amb l'estat en cobalamina, HoloTC i HoloTC/Cbl, amb anàlisis de regressió lineal múltiple. El model dissenyat per investigar la variabilitat en cobalamina plasmàtica no va ser significatiu. Els altres models tot i explicar tant sols el 3% de la variabilitat tant d'HoloTC com d'HoloTC/Cbl, eren significatius i estan resumits a la **Taula P5**. Fumar ≥ 6 cigarretes/dia s'associa amb una reducció mitjana de 13 pmol/L d'HoloTC, respecte a no fumar o fumar 1-5 cigarretes/dia. El genotip *MTRR* 524TT s'associa amb una reducció mitjana de 14 pmol/L respecte els altres genotips del polimorfisme, tot i ser al límit de la significació (p = 0,05). Els genotips *MTRR* 524TT, *TCII* 776CG i *TCII* 776GG, s'associen inversament amb la raó HoloTC/Cbl respecte els altres genotips dels polimorfismes corresponents.

Taula P4. Freqüències de polimorfismes en gens implicats en la biodisponibilitat i transport de cobalamina i folats en la població

Transcobalamina II				Metilentetrahidrofolat-reductasa				5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa reductasa				5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa	
776C>G N (%)		67A>G N (%)		677C>T N (%)		1298A>C N (%)		66A>G N (%)		524C>T N (%)		2756A>G N (%)	
CC	262 (34,2)	AA	609 (79,5)	CC	275 (35,9)	AA	394 (51,4)	AA	199 (26,0)	CC	303 (39,6)	AA	544 (71,0)
CG	351 (45,8)	AG	147 (19,2)	CT	354 (46,2)	AC	321 (41,9)	AG	385 (50,3)	CT	361 (47,1)	AG	201 (26,2)
GG	153 (20,0)	GG	10 (1,3)	TT	137 (17,9)	CC	51 (6,7)	GG	182 (23,8)	TT	102 (13,3)	GG	21 (2,7)

Taula P5. Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució de factors ambientals i genètics a la variabilitat d'HoloTC i HoloTC/Cbl plasmàtiques

	MODEL¹	
	HoloTC²	HoloTC/Cbl³
R² (F)[N]	0,03 (2,9)[740] ^a	0,03 (3,1)[739] ^b
Coefficient B (error estàndard)		
Fumar ≥ 6 cigs/dia	-13,29 (6,2) ^c	NS ⁴
<i>MTRR</i> 524TT	-14,49 (17,5) ^d	-0,03 (0,0) ^{5c}
<i>TCII</i> 776GG	NS	-0,04 (0,0) ^{6c}
<i>TCII</i> 776CG	NS	-0,03 (0,0) ^{6c}

¹Els models es van ajustar per: consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, genotip *MTRR* 66GG, centre on es va realitzar el treball de camp, edat (anys), sexe, IMC i creatinina; ²variable dependent: holotranscobalamina; ³variable dependent: holotranscobalamina/cobalamina; ⁴no significatiu; ⁵en la raó HoloTC/Cbl en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ⁶canvi en la raó HoloTC/Cbl respecte al genotip homozigot salvatge del polimorfisme. ^ap<0,01; ^bp<0,001; ^cp<0,05; ^dp=0,05.

En un primer anàlisi dels factors associats amb la variabilitat en tHcy, els models limitats a homes, expliquen d'un 25% a un 26% ($p < 0,001$) de la variabilitat en tHcy. Les variables que s'associen amb tHcy són les mateixes en tots els models. Cada nmol/L d'augment en folat plasmàtic, s'associa amb una reducció mitjana en tHcy d'entre un 0,6-0,7%. La presència del genotip *MTHFR* 677TT s'associa amb un augment mitjà en la concentració de tHcy, d'entre un 22-23% respecte els altres genotips del polimorfisme. Cada unitat d'augment d'EGOTAC i EGRAC s'associa amb augments mitjans de 13% i 16-18% en tHcy respectivament. En considerar la cobalamina plasmàtica dins el model, s'observa una reducció mitjana del 2% en tHcy per cada augment de 50 pmol/L en cobalamina. En canvi per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC, la reducció mitjana és del 0,4% (**Taula P6**).

Els resultats en analitzar la relació en les dones són semblants, amb els models explicant d'un 25% a un 30% ($p < 0,001$) de la variabilitat en tHcy. Les variables que s'associen amb tHcy també són les mateixes en tots els models. S'observen reduccions mitjanes del 0,4-0,5% en les concentracions de tHcy per cada unitat d'augment de folat, i augments mitjans d'entre el 17-18% en presència del genotip *MTHFR* 677TT respecte els altres genotips del polimorfisme. La presència del genotip *MTRR* 524TT s'associa amb una reducció del 8-9% en tHcy, respecte els altres genotips del polimorfisme. En considerar la cobalamina dins el model, s'observa una reducció mitjana del 3% en la concentració de tHcy per cada augment de 50 pmol/L en cobalamina. En canvi per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC la reducció mitjana és només del 0,6% (**Taula P6**).

Els models dissenyats per investigar l'associació entre la raó HoloTC/Cbl i la tHcy no expliquen de forma significativa la variabilitat en tHcy ni en homes ni en dones i per tant no estan resumits a la **Taula P6**.

Taula P6. Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors de l'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy

	Models Homes ^{1,2}			Models Dones ^{1,2}		
R ² (F) [N]	0,26 (8,3) [334] ^a	0,26 (8,0) [328] ^a	0,25 (7,7) ³ [328] ^a	0,30 (10,0) [344] ^a	0,27 (8,7) [341] ^a	0,25 (7,9) ³ [341] ^a
	Coeficient B (error estàndard)					
EGOTAC	13,09 (6,0) ^{4b}	13,31 (5,8) ^b	12,75 (5,8) ^b	NS ⁵	NS	NS
EGRAC	17,82 (7,0) ^{4b}	15,72 (6,8) ^b	16,18 (6,8) ^b	NS	NS	NS
<i>MTRR</i> 524TT	NS	NS	NS	-7,78 (4,1) ^{6b}	-8,79 (4,2) ^b	-8,33 (4,2) ^b
<i>MTHFR</i> 677TT	22,75 (3,5) ^a	22,26 (3,4) ^a	22,88 (3,4) ^a	16,88 (3,5) ^{6a}	18,18 (3,6) ^a	18,06 (3,6) ^a
Folat (nmol/L)	-0,70 (0,0) ^{4c}	-0,60 (0,0) ^c	-0,70 (0,0) ^c	-0,50 (0,0) ^c	-0,40 (0,0) ^b	-0,50 (0,0) ^c
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-1,69 (0,0) ^{4c}	-	-	-2,66 (0,0) ^a	-	-
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-	-0,40 (0,0) ^b	-	-	-0,60 (0,0) ^c	-

¹Variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, genotip *TCII* 776GG, genotip *TCII* 776CG, genotip *MTRR* 66GG, folat plasmàtic, centre on es va realitzar el treball de camp, edat (anys), IMC i creatinina; ³ajustat per la raó HoloTC/Cbl; ⁴% de canvi mitjà en tHcy per cada unitat d'augment en la variable independent; ⁵no significatiu; ⁶% de canvi mitjà en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ^ap<0,001; ^bp<0,05; ^cp<0,01.

Els models dissenyats per investigar els factors associats amb la variabilitat en cobalamina plasmàtica i HoloTC, no l'expliquen de forma significativa en les dones d'edat fèrtil (48-44 anys). El model dissenyat per investigar els factors associats amb la raó HoloTC/Cbl, explica el 6% ($p < 0,05$) de la seva variabilitat. La variable dependent del model és la raó HoloTC/Cbl i es va ajustar per el consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, la presència del genotip *MTRR* 524TT i *MTRR* 66GG el centre on es va realitzar el treball de camp, l'IMC i la creatinina. S'observa que els genotips 776GG i 776CG del gen *TCII*, s'associen amb reduccions mitjanes de 0,06 i 0,04 unitats en al raó HoloTC/Cbl, respecte al genotip salvatge respectivament.

En analitzar la relació entre els diferents indicadors plasmàtics d'estat en cobalamina amb tHcy en les dones d'edat fèrtil, s'observa que els models amb cobalamina, HoloTC i la raó HoloTC/Cbl expliquen respectivament un 27%, 26% i 24% ($p < 0,001$) de la variabilitat en tHcy (**Taula P7**).

Taula P7. Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors d'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy en les dones d'edat fèrtil

MODELS 1-3^{1,2}			
R² (F) [N]	0,27 (6,1) [204] ^a	0,26 (5,7) [201] ^a	0,24 (5,2) ³ [201] ^a
Coeficient B (error estàndard)			
Consum alcohol ≥ 30 g/dia	41,48 (13,2) ^b	37,03 (13,4) ^c	37,30 (13,7) ^c
<i>MTRR</i> 524TT	-10,95 (5,2) ^{4c}	-12,37 (5,3) ^c	-11,93 (5,4) ^c
<i>MTHFR</i> 677TT	21,29 (4,5) ^{4a}	23,24 (4,7) ^a	22,63 (4,8) ^a
Folat (nmol/L)	-0,80 (0,0) ^b	-0,80 (0,0) ^b	-0,80 (0,0) ^b
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-2,08 (0,0) ^b	-	-
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-	-0,60 (0,0) ^c	-

¹Variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: fumar 1-5 cigs/dia, fumar ≥ 6 cigs/dia, genotip *TCII* 776GG, genotip *TCII* 776CG, genotip *MTRR* 66GG, centre on es va realitzar el treball de camp, IMC, EGOTAC, EGRAC i creatinina; ³model ajustat per la raó HoloTC/Cbl; ⁴canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme. ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,05$.

Globalment els mateixos factors s'associen amb la tHcy en tots els models. El consum de ≥ 30 g/dia d'alcohol, s'associa amb un augment mitjà en tHcy d'entre el 37-41%, i la presència del genotip *MTHFR* 677TT entre un 21-23%, respecte els altres genotips del polimorfisme. El genotip *MTRR* 524TT, s'associa amb reduccions mitjanes del 11-12% en

tHcy respecte els altres genotips del polimorfisme, i cada augment d'1 nmol/L en folat plasmàtic, amb una disminució mitjana del 0,8% en tHcy. En considerar la cobalamina plasmàtica dins el model, s'observa una reducció mitjana en tHcy del 2% per cada augment de 50 pmol/L en cobalamina. En canvi per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC plasmàtica, la reducció mitjana en tHcy és del 0,6% (**Taula P7**).

Els models dissenyats per investigar els factors associats amb la variabilitat en la cobalamina, l'HoloTC plasmàtica i la raó HoloTC/Cbl, no l'expliquen de forma significativa en la gent gran (60-75 anys). En canvi, els models dissenyats per investigar la relació entre els diferents indicadors plasmàtics d'estat en cobalamina amb la variabilitat en tHcy, expliquen el 30% per cobalamina, 28% per HoloTC i 30% ($p < 0,05$) per la raó HoloTC/Cbl en homes, i el 42% ($p < 0,001$) per cobalamina, 29% ($p < 0,01$) per HoloTC i 27% ($p < 0,01$) per la raó HoloTC/Cbl en dones. Fumar ≥ 6 cigarretes/dia, s'associa amb un augment mitjà en tHcy d'entre el 34-36% en homes, entre tots els models. Tan sols en dones, el genotip *MTHFR* 677TT s'associa amb un augment mitjà en tHcy del 30-38%, respecte els altres genotips, entre tots els models i s'observa una reducció mitjana del 5% en tHcy, per cada augment de 50 pmol/L en cobalamina plasmàtica (**Taula P8**).

Per tal d'investigar si el baix estat en cobalamina és més perjudicial a nivell metabòlic en presència d'un elevat estat en folats, es van investigar les relacions entre els indicadors d'estat en cobalamina i en folats amb tHcy, segons diferents combinacions d'estat en cobalamina i folats. Els models de regressió lineal múltiple dissenyats estan resumits a la **Taula P9**. Es van dissenyar 3 models per la combinació de baix estat en cobalamina (cobalamina plasmàtica ≤ 299 pmol/L) i baix-normal estat en folats (folat plasmàtic $< 17,9$ nmol/L), per tal d'investigar les relacions entre cobalamina, HoloTC i la raó HoloTC/Cbl plasmàtica amb tHcy. També es van dissenyar els mateixos 3 models per la combinació de baix estat en cobalamina (cobalamina plasmàtica ≤ 299 pmol/L) i elevat estat en folats (folat plasmàtic $\geq 17,9$ nmol/L). Els models investigats en el primer grup expliquen el 44%, 41% i 39% ($p < 0,001$) de la variabilitat en tHcy per els models que inclouen la cobalamina, l'HoloTC i la raó HoloTC/Cbl plasmàtica, com a variables independents, respectivament. El model dissenyat per investigar la relació entre cobalamina plasmàtica i tHcy, en els participants amb la combinació de baix estat en cobalamina i elevat estat en folats, no explica significativament la variabilitat en tHcy per aquest grup, i per tant no està resumit a la **Taula P9**. Els models que inclouen a l'HoloTC i a la raó HoloTC/Cbl plasmàtica com a variables independents, expliquen el 40% i 47% ($p < 0,05$) de la variabilitat en tHcy respectivament.

El genotip *MTHFR* 677TT s'associa amb augments mitjans d'entre el 25-26% de tHcy, respecte els altres genotips del polimorfisme, en tots els models del grup amb la combinació de baix estat en cobalamina i estat baix-normal en folats; en la presència d'elevat estat en folats, s'associa amb augments mitjans d'aproximadament el 55% i 50%, en els models que investiguen la relació entre l'HoloTC i la raó HoloTC/Cbl plasmàtica i tHcy, respectivament. Augmentar 1 nmol/L de folat plasmàtic, s'associa amb una reducció mitjana del 2% en tHcy, en tots els models del grup amb la combinació de baix estat en cobalamina i baix-normal estat en folats; en canvi, el mateix augment en els models amb la combinació de baix estat en cobalamina i elevat estat en folats, s'associa amb un augment mitjà de tHcy del 2%.

En considerar la cobalamina plasmàtica dins el model de baix estat en cobalamina i baix-normal estat en folats, s'observa una reducció mitjana del 8% per cada augment de 50 pmol/L en cobalamina plasmàtica. En analitzar la relació entre HoloTC i tHcy segons les combinacions de baix estat en cobalamina, amb baix-normal estat en folats i elevat estat en folats, s'observen reduccions mitjanes per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC, del 2% i 5% en tHcy respectivament. En considerar l'HoloTC dins el model de baix estat en cobalamina i baix-normal estat en folats, cada unitat d'augment d'EGRAC s'associa amb un augment mitjà del 19% en tHcy i, del 20% en considerar la raó HoloTC/Cbl dins el model. L'associació entre la raó HoloTC/Cbl i la tHcy però, no és significativa en el model de baix estat en cobalamina i baix-normal estat en folats. No obstant, en el model amb baix estat en cobalamina i elevat estat en folats, l'augment d'1 unitat en la raó HoloTC/Cbl s'associa amb una reducció mitjana del 79% en tHcy.

Taula P8. Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors de l'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy en la gent gran

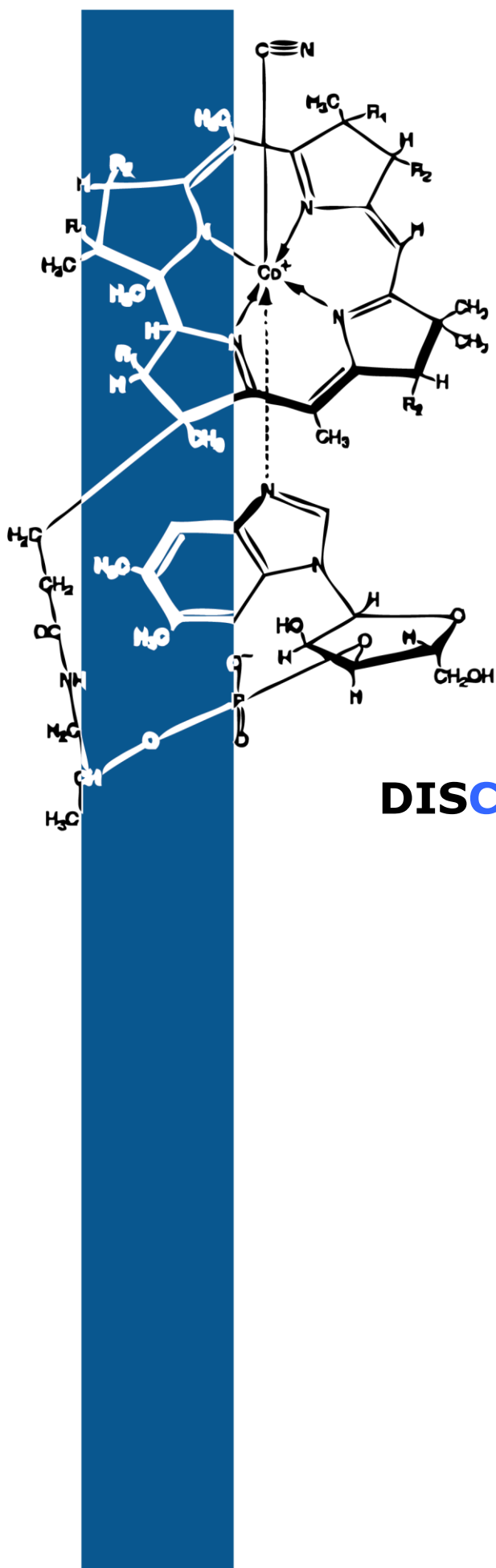
	Models Homes ^{1,2,3}			Models Dones ^{1,2}		
R² (F) [N]	0,30 (2,9) [51] ^a	0,28 (2,3) [51] ^a	0,30 (2,4) [51] ^a	0,42 (5,9) [55] ^b	0,29 (2,8) [55] ^c	0,27 (2,7) [55] ^c
Coeficient B (error estàndard)						
Fumar ≥ 6 cigs/dia	34,18 (12,9) ^a	33,91 (13,1) ^a	36,21 (13,0) ^a	-	-	-
<i>MTHFR</i> 677TT	NS ⁴	NS	NS	29,82 (10,3) ^{5a}	35,26 (11,6) ^c	38,40 (11,7) ^c
Folat (nmol/L)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Increment de 50 pmol/L en Cbl	NS	-	-	-4,78 (0,0) ^c	-	-
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-	NS	-	-	NS	-
HoloTC/Cbl	-	-	NS	-	-	NS

¹Variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: genotip *MTRR* 524TT, genotip *TCII* 776GG, genotip *TCII* 776CG, genotip *MTRR* 66GG, centre on es va realitzar el treball de camp, IMC, EGOTAC, EGRAC i creatinina; ³ajustat per: consum d'alcohol ≥ 30 g/dia, fumar 1-5 cigs/dia; ⁴no significatiu; ⁵canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme. ^ap<0,05; ^bp<0,001; ^cp<0,01.

Taula P9. Models de regressió lineal múltiple per investigar la contribució dels diferents indicadors d'estat en cobalamina a la variabilitat de tHcy segons la combinació d'estat en cobalamina i estat en folats indicada

	Models baix estat en cobalamina i baix-normal estat en folats ^{1,2,3}			Models baix estat en cobalamina i elevat estat en folats ^{1,2,4}	
R² (F) [N]	0,44 (9,9) [185] ^a	0,41 (8,9) [182] ^a	0,39 (8,3) [182] ^a	0,40 (2,5) [34] ^b	0,47 (3,0) [34] ^b
Coeficient B (error estàndard)					
EGRAC	NS ⁵	18,53 (7,9) ^b	20,32 (8,0) ^b	NS	NS
<i>MTHFR</i> 677TT	25,86 (4,7) ^{6a}	24,61 (4,6) ^a	24,48 (4,7) ^a	54,65 (18,8) ^b	49,93 (17,2) ^b
Folats (nmol/L)	-1,98 (0,0) ^a	-1,49 (0,0) ^c	-1,69 (0,0) ^c	1,61 (0,0) ^b	1,71 (0,0) ^b
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-7,87 (2,1) ^a	-	-	-	-
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-	-1,88 (0,0) ^c	-	-4,78 (0,0) ^b	-
HoloTC/Cbl	-	-	NS	-	-79,42 (71,6) ^c

¹Variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: consum d'alcohol \geq 30 g/dia, fumar \geq 6 cigs/dia, genotip *MTRR* 524TT, genotip *TCII* 776GG, genotip *TCII* 776CG, centre on es va realitzar el treball de camp, edat (anys), sexe, IMC, EGOTAC i creatinina; ³combinació de cobalamina plasmàtica \leq 299 pmol/L i de folat plasmàtic $<$ 17,9 nmol/L ajustada per: fumar 1-5 cigs/dia; ⁴combinació de cobalamina plasmàtica \leq 299 pmol/L i de folat plasmàtic \geq 17,9 nmol/L; ⁵no significatiu; ⁶canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme. ^ap<0,001; ^bp<0,05; ^cp<0,01.



DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI POBLACIONAL

DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI POBLACIONAL

El consum de tabac observat a la nostra població reflexa el comportament a Catalunya⁶⁶⁶. Tot i que les dades dels registres catalans no tenen la mateixa estratificació per edats que en l'estudi de la nostra població, el percentatge més elevat de fumadors, 45%, es dona entre els individus de 15-44 anys. En la nostra població, el percentatge més elevat de fumadors, 46%, es dona en els individus entre 18-44 anys. Per altra banda, seguint amb els hàbits tòxics, el nombre d'individus amb consum d'alcohol ≥ 30 g/dia trobat en la nostra població, 12%, s'aproxima al 15% de les dades espanyoles⁶⁶⁷.

Com a grup, la gent gran té el millor estat en folats i els adults joves el pitjor. El grup de 18-44 anys inclou les dones d'edat fèrtil. Aquest fet és important pel risc d'embarassos afectats per l'aportació insuficient de folats, per cobrir les necessitats de les gestants i pel desenvolupament correcte dels fetus. En la nostra població s'observa que l'estat en cobalamina plasmàtica és menor respecte el grup de 45-59 anys, en els adults joves i la gent gran. En la gent gran és on s'observa un major percentatge de deficients tant en cobalamina com en HoloTC, però en considerar les concentracions plasmàtiques globals, no s'observen diferències respecte el grup de 18-44 anys. L'estat nutricional de la gent gran podria estar esbiaixat si la gent més sana, d'aquest sector de la població, és la que ha participat en l'estudi. Tot i tenir un estat plasmàtic global semblant a la gent jove, la major prevalença de deficiència, podria ser conseqüència de la disminució en l'absorció de la cobalamina, fet comú en la gent gran⁶³⁶. Tot i tenir el millor estat en folats, el grup de la gent gran és el que té la mitjana més elevada de tHcy, fet relacionat amb l'envelliment. En l'estudi SÉNECA⁶⁶⁸ de 1072 individus, de 80-85 anys, fet en diferents països europeus on es van comparar les concentracions de tHcy, cobalamina i folats plasmàtics, amb els obtinguts 10 anys abans en els mateixos individus, l'únic biomarcador que va mostrar diferències significatives a causa del procés d'envelliment, va ser la tHcy, que va augmentar en $1,39 \mu\text{mol/L}$. No obstant, en el nostre estudi, tot i la falta de diferència entre l'estat en cobalamina global entre la gent gran i els adults joves, s'observa que la cobalamina plasmàtica és un factor determinant en la regulació de tHcy en les dones grans .

El pitjor estat en folats present en el grup que inclou les dones d'edat fèrtil, i la prevalença de més deficiència en cobalamina en la gent gran, observat en el nostre estudi, corrobora els resultats d'un altre estudi fet també a Catalunya⁶⁶⁹. Per poder comparar les determinacions de folat plasmàtic, fet amb RIA, d'aquest estudi amb els de la nostra població, fet amb assaig microbiològic, es va aplicar el factor de correcció determinat per Fazili Z⁶⁷⁰ i els seus col·laboradors, en un estudi on es comparaven

aquestes dues tècniques. Les concentracions sèriques de folat < 11 nmol/L, en l'estudi fet en el global de Catalunya, es van trobar en un 3,2% dels individus de 18-34 anys, respecte un 1,9% dels individus de 65-75 anys. Les concentracions sèriques de cobalamina < 148 pmol/L es van presentar en un 0,8% dels individus de 18-34 anys, i en el 3,8% dels de 65-75 anys. Els menors percentatges de gent deficient respecte el nostre estudi, podrien ser conseqüència de que en l'estudi fet a Catalunya, no es van excloure els individus que prenen suplementes vitamínics, i pel possible biaix conseqüència de que l'extracció sanguínia no era un requisit per participar. Aquest fet també explicaria les majors concentracions plasmàtiques trobades respecte l'estudi de la nostra població tant en folats, amb mitjanes de 27,3 nmol/L en els individus de 18-49 anys, 31,2 nmol/L en els de 50-64 anys, i 31,7 nmol/L en els de 65-75 anys, com en cobalamina, amb mitjanes de 452 pmol/L en els individus de 18-49 anys, 462 pmol/L en els de 50-64 anys i 535 pmol/L en els de 65-75 anys.

La prevalença de més deficiència en cobalamina en la gent gran i pitjor estat en folats en grups on s'inclouen les dones d'edat fèrtil, també s'ha trobat a nivell europeu. En el *Hordaland Homocysteine Study*⁶⁷¹ realitzat a Noruega amb una submostra de 4800 individus de 46 a 49 anys, i 4300 individus de 70-74 anys, es va observar que les concentracions de cobalamina plasmàtica < 230 pmol/L eren majors en els individus de 70-74 anys, 58%, respecte els individus de 46-49 anys, 42%. El major percentatge d'individus amb folat plasmàtic $< 8,5$ nmol/L es va donar en el grup de dones de 46-49 anys, 28%, respecte el 24% present en les dones de 70-74 anys i, del 25% i 23%, corresponent als homes de 46-49 anys i els de 70-74 anys respectivament. El 30% dels individus van prendre multivitamínics.

En l'estudi Framingham²⁶⁷ realitzat als EUA i on es van estudiar 348 dones i 200 homes d'edats entre els 67-96 anys, el 5,3% dels individus van presentar concentracions sèriques de cobalamina < 148 pmol/L, davant el 3,1% en la gent gran del nostre estudi, i un 2,9%, concentracions sèriques de folat $< 5,9$ nmol/L, respecte el 7% del nostre estudi. El fet que en la nostra població la gent gran tingui ≤ 75 anys respecte els ≤ 96 anys de l'estudi americà, podria explicar la menor prevalença de deficiència en cobalamina en la nostra població.

Diferents estudis^{154,301} proposen l'HoloTC com a millor marcador de deficiència respecte a la cobalamina. En la nostra població, el fet que en la gent gran la deficiència en cobalamina plasmàtica, representi un 3% respecte el 6% en la deficiència en HoloTC, podria recolzar l'HoloTC com a millor indicador, però en analitzar les deficiències marginals s'observa que el major nombre d'individus s'aconsegueix amb la combinació

dels dos biomarcadors. Així l'HoloTC podria tenir una funció de complement amb la cobalamina, per tal de detectar casos de deficiència o que estan en risc d'acabar sent deficients. És un tema però en controvèrsia. En un estudi fet al Regne Unit¹⁴⁸ realitzat amb individus d'entre 65-74 anys, no es va observar diferència en la detecció de deficients entre cobalamina i HoloTC, amb un 15% d'individus amb concentració sèrica de cobalamina < 150 pmol/L i, un 15 % d'individus amb concentració sèrica d'HoloTC < 30 pmol/L.

En un estudi realitzat a Califòrnia¹⁶³ amb 1789 individus amb una mediana d'edat de 70 anys, les medianes de les concentracions plasmàtiques de cobalamina, HoloTC i tHcy, 307 pmol/L, 79,8 pmol/L i 9,8 µmol/L respectivament, són gairebé iguals en l'HoloTC, 80 pmol/L i tHcy 10,8 µmol/L, dels individus de 60-65 anys de la nostra població. En un altre estudi realitzat Espanya, la població de 80-85 anys, presentava concentracions de tHcy de 10-12 µmol/L⁶⁶⁸.

Dins d'Europa s'han trobat diferències tant en estat en folats com en cobalamina, amb un gradient nord-sud, amb majors concentracions al sud respecte al nord i est d'Europa⁶⁶⁸. Però els estudis fets en diferents regions d'Espanya també mostren variabilitat. En la primera fase de l'estudi SÉNECA⁶⁷², amb una població de 70-75 anys, la mitjana de folat sèric va oscil·lar en els diferents països europeus entre 12,7-22,4 nmol/L, corresponent a Espanya la mitjana de 16,1 nmol/L. En la cobalamina sèrica, la mitjana va oscil·lar entre 212-378 pmol/L, sent la concentració més elevada l'observada a Espanya. Dels 177 individus espanyols analitzats, només 2 van declarar prendre suplement, un individu suplement amb ferro i l'altre amb calci. En un estudi fet a Andalusia⁶⁷³ amb 384 individus aparentment sans, on es van excloure les gestants i les mares en lactància, i on el 3,2% prenen suplement multivitamínic, es van observar mitjanes de cobalamina plasmàtica molt semblants a l'estudi de la nostra població, amb 355 pmol/L entre els individus de 25-49 anys i de 364 pmol/L en el grup de 50-60 anys. Les mitjanes de folat plasmàtic però, són majors en l'estudi andalús. La mitjana tant en els individus de 25-49 anys, com en els de 50-60 anys, és del voltant de 15 nmol/L, corresponent al grup de la gent gran de la nostra població. En un altre estudi realitzat a les illes Canàries⁶⁷⁴, on no es van excloure els individus que es suplementaven i on les extraccions sanguínies eren opcionals, les mitjanes de folat sèric són fins i tot més elevades, amb concentracions de 17,9 nmol/L en els individus de 18-49 anys, i a partir d'aquesta edat mitjanes de 20 nmol/L. En les dades canàries, les mitjanes de cobalamina sèrica són semblants a les de la nostra població, amb 371 pmol/L en els individus de 18-49 anys, i 385 pmol/L en els de 50-64 anys. No obstant, en el grup de gent gran, la mitjana de la nostra població és major a la de 313 pmol/L de cobalamina de l'estudi

canari. En aquest grup d'edat és on l'estudi canari troba un major percentatge de deficients en cobalamina (< 148 pmol/L), que en els homes arriba a ser de fins l'11%.

La raó HoloTC/Cbl, no varia entre els diferents grups d'edat i manté de forma global la diferència interindividual entre el 23-35%, trobada en un estudi fet a Noruega¹⁶⁵ amb 500 individus sans, de 18-69 anys, donants de sang. La raó HoloTC/Cbl mostra quina part de la cobalamina total està disponible als teixits. Una reducció en el seu percentatge indicaria que una part de la cobalamina que s'havia d'unir a la TCII, passa a unir-se a l'HC i deixa d'estar disponible a nivell cel·lular. En considerar la concentració plasmàtica global de la cobalamina, aquest fet podria no detectar-se a causa de que la quantitat total plasmàtica de cobalamina present, és la mateixa.

L'associació negativa entre la presència del polimorfisme *TCII* 776C>G tant en el genotip homozigot mutant, com heterozigot i la raó HoloTC/Cbl, observada en la nostra població, indicaria que menys cobalamina pot unir-se a la TCII. Estudis previs han proposat que el polimorfisme s'associa, a una menor afinitat de la TCII per la cobalamina⁴²¹, o bé, amb una menor afinitat de la TCII pel seu receptor^{420,422}. La presència del genotip *MTRR* 524TT també s'associa negativament a la raó HoloTC/Cbl, indicant una reducció de l'HoloTC respecte a la cobalamina total en la presència del genotip. Aquesta mutació relacionada amb una disminució de l'activitat de la MS⁵³⁷, s'associa a un augment en tHcy. Aquest podria ser conseqüència a la disminució de la cobalamina disponible als teixits.

Diferents estudis tant Europeus com realitzats a Espanya, observen unes freqüències genotípiques semblants a les presents en la nostra població. En un estudi⁶⁷⁵ fet a 716 individus d'entre 18-66 anys, es va observar una freqüència espanyola del genotip *MTHFR* 677TT del 16%, respecte el 18% trobat en la nostra població. En relació al gradient decreixent sud-nord trobat a Europa en les freqüències del genotip *MTHFR* 677TT⁶⁷⁶, s'observa que la freqüència en la nostra població és intermitja a la trobada en l'anàlisi d'aquest polimorfisme a França, amb un 15% d'individus amb genotip *MTHFR* 677TT i a Itàlia amb un 20%. Estudis fets a Noruega⁴³⁷, amb 10601 individus d'entre 50-64 anys, a Holanda⁴²⁰ amb 601 individus amb una mitjana d'edat de 51 anys, i a Irlanda⁴³⁶ amb 625 dones amb una mitjana d'edat de 26 anys, han trobat igual que en la nostra població, un 20% d'individus amb el genotip *TCII* 776GG. En relació al genotip *MTRR* 524TT, en un estudi fet a Irlanda⁵³¹ amb 325 dones, es va trobar una freqüència del 15%, davant un 14% present en un estudi francès⁵⁴¹ amb 16 homes analitzats. En la nostra població la freqüència és d'un 13% d'individus amb genotip *MTRR* 524TT. La freqüència del genotip *MTRR* 66GG és del 27% en un estudi⁵³⁰ fet a

Polònia amb 262 individus, i del 29% en un estudi⁵³³ amb 264 dones amb una mitjana d'edat de 51 anys, fet als Països Baixos. Aquestes freqüències són properes al 24% d'individus amb genotip *MTRR* 66GG, present en la nostra població.

S'ha observat que l'estat en cobalamina és inferior en els individus que fumen de forma habitual respecte els que no han fumat mai⁶⁷⁷. Relacionat amb aquest fet, en la nostra població el consum de ≥ 6 cigarretes/dia s'associa a una disminució de les concentracions d'HoloTC. També cal considerar que s'ha associat l'hàbit de fumar amb un estil de vida menys saludable i amb una dieta menys equilibrada, així el fet de fumar podria estar relacionat amb un menor consum de cobalamina, que explicaria les concentracions menys elevades.

A part d'analitzar els diferents factors que poden influir en els indicadors directes de l'estat en cobalamina en la població global, també es va investigar si aquests factors es relacionen amb un indicador funcional com és la tHcy. L'estat en cobalamina, HoloTC i folats, s'associa negativament a la tHcy, tant en considerar la població de forma global, com en considerar només les dones d'edat fèrtil. En la gent gran només s'observa la relació inversa entre cobalamina plasmàtica i tHcy en les dones. La falta d'associacions observades en altres estrats de la mateixa població, pot ser conseqüència de la falta de potència estadística per el nombre reduït de participants en aquests grups d'edat.

La presència de l'al·lel 677T disminueix l'activitat de l'enzim MTHFR que pot resultar en un augment de tHcy⁴⁷⁴, a més, fins i tot amb un bon estat en folats la disminució de l'activitat enzimàtica produïda per el genotip *MTHFR* 677TT, podria fer necessària una major concentració de folats per compensar el defecte enzimàtic⁴⁷⁰. En la nostra població la presència del genotip *MTHFR* 677TT s'associa amb un augment de les concentracions de tHcy del 17-18% en els dones i, del 22-23% en els homes. En analitzar per separat les dones d'edat fèrtil, s'observa com aquest augment arriba als percentatges presents en els homes de la població. La relació entre el genotip i la tHcy es manté en les dones grans. No obstant, en els homes de 60-75 anys es perd. Aquesta inconsistència es podria explicar per falta de potència estadística, però també pel fet que l'associació inversa entre la concentració de tHcy i la presència del genotip *MTHFR* 677TT, s'accentua en presència d'un baix estat en folats^{462,475}. En la nostra població la gent gran és la que presenta un millor estat en folats; el percentatge més gran d'individus deficientes en folats és el de 18-44 anys, dins dels quals hi ha les dones d'edat fèrtil. Una diferència important en els homes respecte a les dones en el grup de gent gran del nostre estudi, és la relació entre tabac i tHcy. El percentatge d'augment mitjà en tHcy associat amb el fet de fumar ≥ 6 cigarretes al dia en homes, és comparable amb el que s'observa pel genotip

MTHFR 677TT en dones. La forta relació entre tabac i tHcy a l'anàlisi multivariant, podria emmascarar la relació *MTHFR* 677TT i tHcy en els homes.

Un altre factor que s'ha de considerar en l'anàlisi de la relació *MTHFR* 677TT i tHcy, és l'efecte de l'estat en riboflavina. S'ha demostrat que és el factor determinant en la pèrdua d'activitat enzimàtica a causa del polimorfisme *MTHFR* 677C>T⁶⁷⁸. Suplementar amb àcid fòlic, pal·lia els efectes del polimorfisme, però suplementar amb riboflavina corregeix la dissociació del cofactor FAD degut al polimorfisme⁶⁷⁹. Tot i la relació comprovada entre estat en riboflavina i tHcy en homes homozigots pel polimorfisme^{680,681,682}, no se sol tenir en compte com a factor que contribueix a la regulació de tHcy en la majoria d'estudis publicats fins a la data. En la nostra població, es van ajustar tots els models tant per l'EGRAC com per l'EGOTAC, determinacions funcionals de l'estat en riboflavina i piridoxina respectivament.

El polimorfisme *MTRR* 66A>G⁵³² pot disminuir l'activitat de la MS, que utilitza la cobalamina com a cofactor en la remetilació de la Hcy. Hi ha però discrepàncies en la seva relació amb les concentracions de tHcy. En la nostra població no s'ha trobat cap associació entre aquest polimorfisme i la tHcy. Un possible motiu podria ser que la relació no es detecti, en la presència d'un bon estat global en cobalamina i en una població amb un nombre reduït de participants amb deficiència en cobalamina⁴⁰⁸. Del mateix gen *MTRR*, en analitzar el polimorfisme 524C>T, en la nostra població s'observa que la presència del genotip *MTRR* 524TT, s'associa amb una disminució de la tHcy de fins a un 9%, però només en les dones. En considerar de forma aïllada les dones d'edat fèrtil, aquesta disminució arriba fins a un 12%. Aquesta associació no s'observa en les dones de 60-75 anys. Aquestes observacions suggereixen que la reducció en l'activitat de la MS en presència del polimorfisme, no és suficient per impedir la conversió de Hcy a metionina, en presència d'un bon estat global en cobalamina.

Els hàbits tòxics de fumar i el consum d'alcohol en la nostra població, no mostren associació amb la tHcy en la població global, però en considerar les dones d'edat fèrtil el fet de consumir ≥ 30 g/dia d'alcohol, s'associa amb un augment mitjà en tHcy de fins a un 41%. L'associació entre el consum elevat d'alcohol i l'augment en les concentracions de tHcy, s'ha observat tant en homes com en dones⁶⁸³. Es podria atribuir l'associació observada en les dones de la nostra població, a diferència dels homes, a la major heterogeneïtat en les hàbits de consum d'alcohol en el primer grup. Per altra banda, en els homes grans de la nostra població fumar ≥ 6 cigarretes/dia s'associa amb un augment mitjà en tHcy de fins a un 36%. El fet que en el grup amb més consum de tabac, 18-44 anys, en analitzar les dones d'edat fèrtil no s'observi associació entre l'hàbit

tabàquic i la tHcy, podria ser conseqüència a l'estat inferior en folats en la gent jove respecte a la gent gran de la nostra població.

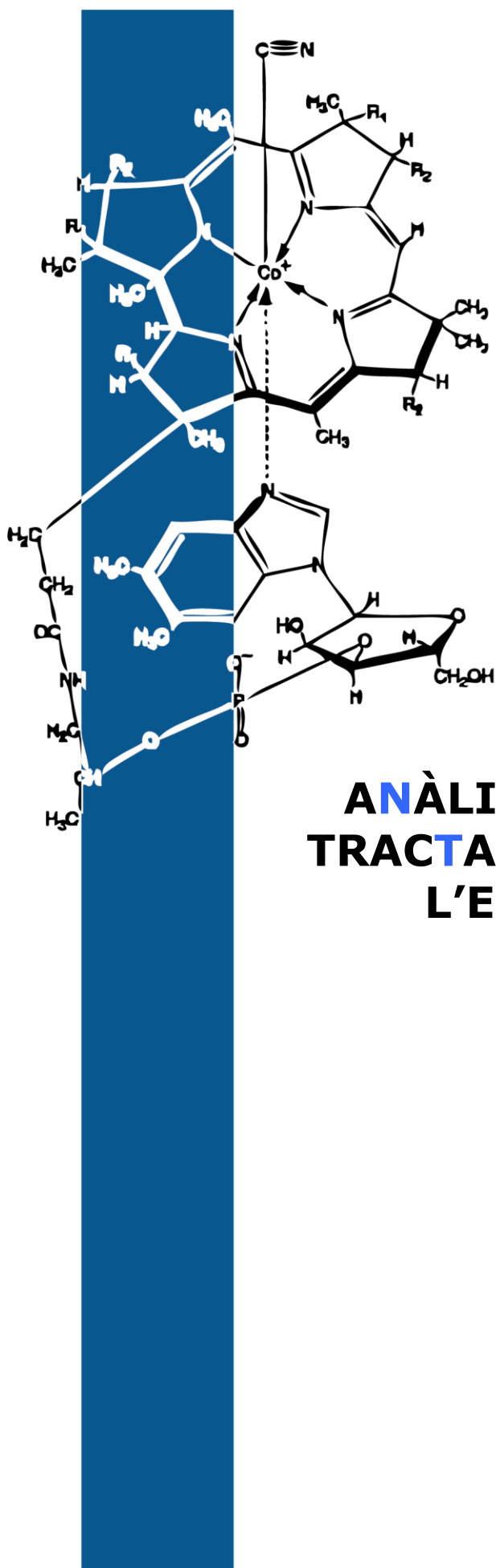
Diferents estudis han comprovat que un estat baix en cobalamina s'associa de manera més evident amb la deficiència en cobalamina, quan l'estat en folats és elevat^{288,289}. En la nostra població es va investigar la relació entre la combinació d'estat baix en cobalamina (cobalamina plasmàtica al tercil baix, ≤ 299 pmol/L) i, elevat en folats (folat plasmàtic al quintil alt, $\geq 17,9$ nmol/L) amb tHcy, indicador funcional tant de l'estat en folats com en cobalamina. Es va comparar aquest grup amb la resta de les participants amb cobalamina plasmàtica al tercil baix, però combinat amb folat plasmàtic per sota del quintil alt. Diferents factors s'associen de forma més forta amb la variabilitat de tHcy, en el grup amb la combinació de baix estat en cobalamina i elevat estat en folats, respecte a la resta dels individus amb baix estat en cobalamina. L'augment mitjà en tHcy amb el genotip *MTHFR* 677TT, és aproximadament el doble. La relació inversa entre la raó HoloTC/Cbl i tHcy, en la presència d'elevat estat en folats, no s'observa en estats inferiors en folats.

En la nostra població s'observa una associació atípica entre folats i tHcy en els participants amb la combinació de baix estat en cobalamina i elevat estat en folats. Augmentar 1 nmol/L de folat plasmàtic s'associa amb un augment mitjà del 2% en tHcy. En canvi davant un mateix estat baix en cobalamina, en els individus amb estat baix-normal en folats, l'associació entre estat en folats i tHcy és inversa, relació característica entre aquests dos indicadors. Tant en l'estudi SALSA²⁸⁸ com NHANES²⁸⁹, els dos realitzats amb individus ≥ 60 anys, exposats a la fortificació amb àcid fòlic, es va observar que davant un mateix estat deficient en cobalamina plasmàtica (< 148 pmol/L), els individus amb elevada concentració de folats plasmàtics (> 45 nmol/L), presentaven respecte els individus sense concentracions elevades de folats (≤ 45 nmol/L), majors concentracions de tHcy. En l'estudi SALSA també es van observar menors concentracions tant d'HoloTC com de la raó HoloTC/Cbl. En aquests dos estudis es suggereix que en les poblacions fortificades i a més amb ingesta de suplementes (en l'estudi SALSA dels individus amb baix estat en cobalamina i elevat en folats el 29% van prendre suplementes amb àcid fòlic), l'excés d'àcid fòlic pot exacerbar la deficiència en cobalamina, reduint l'activitat de la MS amb la consegüent acumulació de tHcy. L'augment de 10 pmol/L d'HoloTC, disminueix de forma més important les concentracions de tHcy en els individus amb baix estat en cobalamina i elevat en folats, fet que pot indicar que l'estat en cobalamina en aquests individus, és de forma global, pitjor al dels individus amb estat baix-normal en folats. La relació amb un pitjor estat en cobalamina, en els individus amb baix estat en cobalamina i elevat en folats, estaria recolzat per l'observació en la nostra

població, de l'efecte de l'augment d'una unitat en la raó HoloTC/Cbl sobre la tHcy; en els individus amb baix estat en cobalamina i baix-normal en folats, no s'associa amb la tHcy, però en els individus amb elevat estat en folats, s'associa amb una disminució de la concentració de tHcy del 79%. L'augment de la fracció de la cobalamina disponible als teixits, millora l'estat en cobalamina en els individus amb pitjor estat, que en la nostra població, són els que a més de baixes concentracions de cobalamina presenten elevades concentracions de folats.

La fortificació obligatòria, es considera un dels mètodes més eficaços per aconseguir fer arribar la quantitat recomanada d'ingesta d'àcid fòlic a la població diana^{607,608,609}, però aquest fet, juntament amb la ingesta de suplementes també repercuteix en l'estat en folats de la població. En la nostra població, en el grup de la gent gran, respecte els estudis SALSA i NHANES, les concentracions de cobalamina es troben per sobre els valors de deficiència en cobalamina, i els de folats per sota de l'elevat estat en folats, però coincidim amb un pitjor estat en cobalamina associat a la combinació d'un baix estat en cobalamina i elevat estat en folats, respecte la presència només d'un baix estat en cobalamina. Les conclusions coincidents accentuen la seva rellevància en considerar, que la nostra població, no està sotmesa a la fortificació amb àcid fòlic ni pren suplementes.

Davant la possibilitat d'una fortificació obligatòria amb àcid fòlic, cal considerar com podria interaccionar amb l'estat en cobalamina i quines serien les repercussions metabòliques i per la salut. L'augment de la concentració de folats en sectors de la població amb baix estat en cobalamina i amb estat suficient o bo en folats, pot emmascarar l'empitjorament de l'estat cobalamina, en corregir l'anèmia característica de la deficiència en cobalamina. El perill seria no detectar l'anèmia i el progrés dels danys neurològics. En l'avaluació dels problemes de la fortificació, diferents estudis suggereixen una cofortificació àcid fòlic-cobalamina^{621,622,623,624}, però les millores en l'estat en cobalamina no semblen equivalents a les obtingudes amb l'estat en folat^{625,626}.



ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI NUTCIR

ANÀLISI ESTADÍSTICA I TRACTAMENT DE DADES DE L'ESTUDI NUTCIR

Els resultats de les variables quantitatives s'expressen com a mitjana i desviació estàndard. Les qualitatives es donen com a freqüències absolutes i relatives (percentatges). Les variables que no seguien una distribució normal (tHcy i folats) van ser transformades logarítmicament per normalitzar la seva distribució. Les concentracions plasmàtiques dels paràmetres bioquímics s'expressen com a mitjana aritmètica (cobalamina, HoloTC i MMA) o geomètrica (tHcy i folats) i l'interval de confiança 95%.

Per analitzar les diferències entre mitjanes de mesures fetes durant l'embaràs, respecte al primer trimestre, es va realitzar l'anàlisi de la varianza (ANOVA) per a mesures repetides amb correcció post-hoc Bonferroni per comparacions múltiples, amb el factor inter-subjecte, ús regular de suplementos prenatals i factor intra-subjecte, temps d'embaràs. Les comparacions de mitjanes de variables entre grups (p.ex. gestants suplementades vs. no suplementades) es van realitzar mitjançant la prova *t* de Student per a dades independents. Les comparacions de les determinacions plasmàtiques del cordó vs. les de les gestants en el treball de part, es van realitzar mitjançant la prova *t* de Student per a dades aparellades. Per comparar les mitjanes de variables que no seguien una distribució normal es va utilitzar la prova no paramètrica U de Mann-Whitney.

Suplementació

En l'estudi NutCIR preveient un comportament no homogeni de les participants en l'ús de suplementos multivitamínics, s'ha considerat analitzar l'exposició de l'ús de suplementos, en l'estudi sobre el comportament dels indicadors bioquímics al llarg de l'embaràs. Per l'anàlisi del folat plasmàtic i la tHcy s'ha considerat l'exposició a suplementos amb àcid fòlic. Per l'anàlisi de la resta dels biomarcadors plasmàtics d'estat en cobalamina, s'ha considerat l'exposició a suplementos amb cobalamina.

Per tal de classificar l'exposició de l'ús de suplementos prenatals al llarg de l'embaràs, es van analitzar les dades de les enquestes d'hàbits (vegeu Annex 2). A través de les enquestes realitzades en el segon i tercer trimestre d'embaràs, es preguntaven els preparats consumits d'àcid fòlic, ferro i els multivitamínics. Seguidament es registrava la freqüència i la durada del consum (vegeu Materials i Mètodes apartat "Estudi d'embaràs: Estudi NutCIR"). La freqüència tenia tres opcions de resposta: cada dia, la majoria de

dies (4-6 vegades) i alguns dies (1-3 vegades), mentre que la durada es contestava durant els 5 primers mesos, en l'enquesta del segon trimestre i, del 6è i 7è mes en el tercer trimestre.

Es va calcular el consum total aproximat en μg d'àcid fòlic i CNCbl, durant els mesos 1-3 i durant els mesos 4-7, a partir de la composició del preparat multiplicat per la freqüència d'ingesta i duració de consum. En cada període, si la suma de dies de consum no arribava a 14, es considerava a la participant com a no consumidora durant el període pertinent. Es van classificar les participants com a consumidores regulars i no regulars, utilitzant la mediana del consum total d'àcid fòlic ([mediana ingesta] període 1-3 mesos [33600 μg], 4-7 mesos [44800 μg]) i CNCbl (període 1-3 mesos [168 μg], 4-7 mesos [112 μg]) derivat dels suplementos.

A causa de les diferències entre l'ús de suplementos durant els mesos 1-3 respecte a l'ús dels mesos 4-7, l'anàlisi en base al possible efecte de la suplementació, es va realitzar considerant els dos períodes per separat.

Per tal de controlar l'ús regular de suplementos amb àcid fòlic en els models de regressió que investiguen la variabilitat en tHcy, es va classificar l'estat en folat de les gestants en base al folat plasmàtic. Es va considerar com estat elevat o no-elevat de folat plasmàtic, les concentracions per sobre o per sota de les medianes que corresponien amb les setmanes 8-15 (8-12 setmanes: 33,6 nmol/L o 15 setmanes: 30,0 nmol/L) i les setmanes 24-34 (24-27 setmanes: 25,6 nmol/L o 34 setmanes: 25,3 nmol/L) respectivament.

Hàbit tabàquic

La informació sobre l'exposició al fum del tabac es va obtenir a través de les enquestes sobre hàbits i estil de vida realitzades en el segon i tercer trimestre (*vegeu Annex 2*). Es van recollir dades sobre l'exposició al tabac en els últims 5 anys. Es va preguntar la freqüència de consum de cigarretes en el moment actual, amb quatre opcions de resposta: 0, de 1 a 5, de 6 a 10, o més de 10 cigarretes/dia. Amb les mateixes opcions de resposta es preguntava si les gestants havien fumat durant els dotze mesos abans de l'embaràs. Finalment hi havia una qüestió sobre si s'havia deixat l'hàbit de fumar durant l'embaràs, on les respostes a escollir eren: durat el primer, segon o tercer trimestre. La informació es va corroborar amb les determinacions de cotinina plasmàtica (≥ 10 ng/mL indica consum recent). La classificació entre fumadores i no fumadores es va considerar en dos períodes per separat. Fumadores durant el primer trimestre: gestants que havien

respòs afirmativament sobre el consum de tabac, a l'enquesta d'hàbits i estil de vida del segon trimestre, o bé, que presentaven a les 8-12 setmanes de gestació una concentració plasmàtica de cotinina > 10 ng/mL. Fumadores al llarg de l'embaràs: gestants que havien respòs afirmativament sobre el consum de tabac, a l'enquesta d'hàbits i estil de vida del tercer trimestre, o bé que presentaven a les 24-27 setmanes o en el cordó una concentració plasmàtica de cotinina > 10 ng/mL.

Es van dissenyar models d'anàlisi de regressió lineal múltiple, per investigar els factors predictius dels canvis en els diferents indicadors bioquímics d'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs. En el treball de part el nombre de gestants no era suficientment gran per poder veure possibles efectes dels diferents factors sobre les concentracions dels marcadors bioquímics, així a causa de la falta de potència estadística, es va realitzar el mateix anàlisi però considerant com a últim punt de l'embaràs les 34 setmanes de gestació. Es va dissenyar un model per cada indicador amb el percentatge de canvi entre el primer trimestre i les 34 setmanes de gestació com a variable dependent. Els models amb variable dependent cobalamina, HoloTC plasmàtica i la raó HoloTC/Cbl, es van ajustar per la presència del genotip *MTRR* 66GG en les gestants, la suplementació regular amb cobalamina durant els mesos 4-7, l'inici de la gestació al tercil baix de cobalamina, fumar durant tot l'embaràs, l'edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent a les 34 setmanes, el percentil de pes del nounat i la creatinina plasmàtica a les 34 setmanes. Es van dissenyar dos models on la variable dependent era el MMA plasmàtic, els dos es van ajustar per la presència del genotip *MTRR* 66GG en les gestants, l'inici de la gestació al tercil baix de cobalamina i un model per la cobalamina plasmàtica (50 pmol/L) a les 34 setmanes i l'altre per l'HoloTC (10 pmol/L). També es van dissenyar dos models on la variable dependent era la tHcy plasmàtica i es van ajustar per les mateixes variables que els models amb el MMA plasmàtic, però afegint la presència del genotip *MTHFR* 677TT en les gestants.

Per investigar els factors predictius de la variació de la tHcy al llarg de l'embaràs i al cordó, es van dissenyar dos models d'anàlisi de regressió lineal múltiple amb la tHcy com a variable dependent i, com a variables independents, la presència del genotip *MTRR* 66GG i *MTHFR* 677TT en les gestants, la suplementació regular amb àcid fòlic (durant el primer trimestre per les extraccions 1 i 2, durant els mesos 4-7 per la resta d'extraccions), l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primer visita prenatal, consum de cafè^(*) no descafeïnat durant tot l'embaràs, fumar (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes, tot l'embaràs per les 24-27, 34 setmanes i al part), edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent i creatinina a l'extracció corresponent. La diferència entre els

dos models és que un es va ajustar per la cobalamina plasmàtica (50 pmol/L) a l'extracció corresponent i l'altre per l'HoloTC (10 pmol/L). Per analitzar l'efecte dels polimorfismes *MTRR* 524C>T i *TCII* 776C>G sobre les concentracions de tHcy, en un baix estat en cobalamina, limitant l'anàlisi a les gestants que van començar l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica, es van realitzar els mateixos models amb la variable dependent tHcy, però afegint a les variables independents els genotips *MTRR* 524TT i *TCII* 776GG.

(*)El consum de cafè es va considerar com a variable independent ja que s'ha associat amb un augment de les concentracions de tHcy⁶⁸⁴.

Per investigar els factors que poden influir en la variació de MMA plasmàtic al llarg de l'embaràs i al cordó, es van dissenyar dos models d'anàlisi de regressió lineal múltiple, on la variable dependent era el MMA i les variables independents, la presència del genotip *MTRR* 66GG en les gestants, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primer visita prenatal, fumar (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes, tot l'embaràs per les 24-27, 34 setmanes i al part), l'edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent, la creatinina a l'extracció corresponent i la cobalamina plasmàtica (50 pmol/L) o l'HoloTC (10 pmol/L) a l'extracció corresponent. Per analitzar l'associació entre els polimorfismes *MTRR* 524C>T i *TCII* 776C>G i el MMA plasmàtic en gestants amb un baix estat en cobalamina, es va limitar l'anàlisi a les gestants que van començar l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica. Es van realitzar els mateixos models amb la variable dependent MMA, però afegint a les variables independents els genotips *MTRR* 524TT i *TCII* 776GG.

Diferents models de regressió lineal múltiple es van utilitzar per investigar els factors que contribuïen a la variació dels indicadors bioquímics de cobalamina, al plasma del cordó. Es va dissenyar un model per cada indicador bioquímic. Per decidir per quins genotips s'havia d'ajustar en els diferents models, es va comparar primer com variaven els diferents indicadors bioquímics entre els diferents genotips del cordó (mitjançant proves *t* de Student). Es van trobar diferències entre els homozigots mutants i la resta de variants en el polimorfisme *MTHFR* 677C>T per la tHcy i en el *MTR* 2756 C>G per l'HoloTC. Es van crear models diferents amb les variables dependents cobalamina plasmàtica, HoloTC i MMA i amb les variables independents, presència del genotip *MTR* 2756GG en el cordó, inici de l'embaràs al tercil baix de cobalamina, suplementació regular amb cobalamina als mesos 4-7, fumar durant tot l'embaràs, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent al part, pes al naixement i creatinina al cordó. En el model amb variable dependent tHcy, es va ajustar també per el genotip *MTHFR* 677TT del cordó.

Complicacions de l'embaràs

Es van investigar mitjançant regressions logístiques múltiples, quines variables podien ser factors de risc [odds ratio (OR)] per creixement intrauterí retardat, hipertensió gestacional i diabetis gestacional. En tenir només 8 casos de preeclàmpsia i 15 parts prematurs espontanis, aquestes dues complicacions no es van poder analitzar per falta de potència estadística. En els avortaments, l'anàlisi no es va poder realitzar perquè en la majoria de casos només es disposa dels paràmetres bioquímics, ja que les gestacions no arribaven a les 20 setmanes, moment en el que es realitzava la primera enquesta per tal d'obtenir informació sobre els hàbits i estil de vida.

Els models de regressió logística múltiple per calcular el risc d'aquestes complicacions de l'embaràs, es van ajustar per la presència dels genotips *TCII* 776GG, *MTHFR* 677TT, *MTRR* 524TT i *MTRR* 66GG en les gestants, l'inici de l'embaràs al tercil baix de cobalamina, l'estat socioeconòmic (**), i la suplementació regular al primer trimestre amb àcid fòlic i dels 4-7 mesos amb cobalamina, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primera visita prenatal, l'anèmia (hemoglobina sèrica < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes gestacionals, fumar durant tot l'embaràs i la creatinina a les 34 setmanes.

(**)L'estat socioeconòmic es va analitzar com a possible predictor de les diferents complicacions ja que tant els nivells alts d'educació, com elevats ingressos familiars s'han associat a la disminució del risc de malformacions congènites⁶⁸⁵.

El model d'anàlisi del risc de diabetis gestacional no va resultar significatiu ($p > 0,05$) i, en el risc de la hipertensió gestacional tot i ser significatiu ($p < 0,05$), cap factor relacional amb la cobalamina explicava el model.

Gestants amb baix estat en cobalamina

Es van dissenyar models de regressió logística múltiple per tal d'investigar els factors de risc [odds ratio (OR)] per iniciar i/o acabar l'embaràs al tercil baix de cobalamina, al tercil baix d'HoloTC, al tercil alt de MMA i amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC. Es va considerar com a deficiència marginal, a principis d'embaràs, la cobalamina plasmàtica ≤ 220 pmol/L²²⁶ o l'HoloTC ≤ 35 pmol/L¹⁵⁴. A partir del percentatge mitjà de disminució de la cobalamina i l'HoloTC plasmàtica, des de la preconcepció al treball de part, en un estudi previ longitudinal en la mateixa població³⁰⁸, es va considerar com a deficiència marginal, a finals d'embaràs, concentracions plasmàtiques de cobalamina ≤ 169 pmol/L o d'HoloTC ≤ 22 pmol/L.

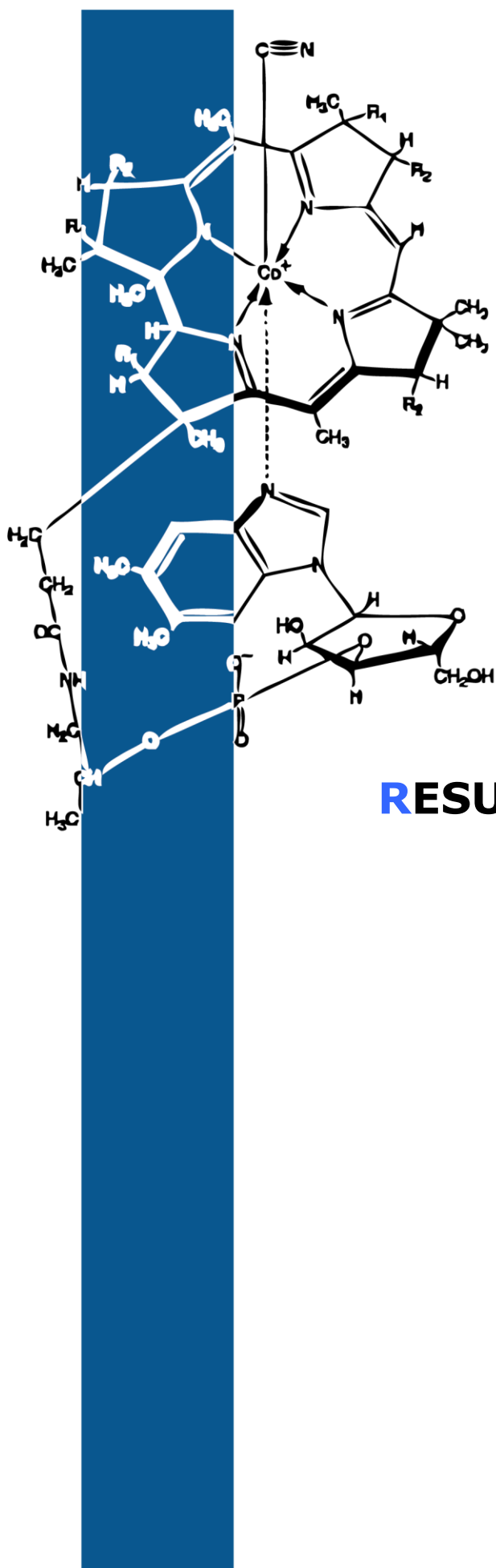
Els models dissenyats per investigar el risc de començar l'embaràs al tercil baix de cobalamina, al tercil baix d'HoloTC i amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, van incloure els genotips *TCII 776GG*, *MTRR 524TT*, *MTRR 66GG* en les gestants, la suplementació regular al primer trimestre amb àcid fòlic, l'estat socioeconòmic, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primera visita prenatal, l'anèmia (hemoglobina < 11 g/dL) al primer trimestre, fumar durant el primer trimestre, esmorzar cereals durant tot l'embaràs i la planificació de l'embaràs.

Els models dissenyats per investigar el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix de cobalamina, al tercil baix d'HoloTC i amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, es van incloure els genotips *TCII 776GG*, *MTRR 524TT*, *MTRR 66GG* en les gestants, la suplementació regular al primer trimestre amb àcid fòlic i dels 4-7 mesos amb cobalamina, l'estat socioeconòmic, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primera visita prenatal, l'anèmia (hemoglobina < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes, fumar durant tot l'embaràs i la creatinina al part. El model de risc d'acabar l'embaràs al tercil baix de cobalamina també inclou l'inici de l'embaràs al tercil baix de cobalamina, el de risc d'acabar al tercil baix d'HoloTC, l'inici de l'embaràs al tercil baix d'HoloTC i el model d'acabar amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, l'inici de l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC.

Es van dissenyar dos models per l'anàlisi del risc de començar l'embaràs al tercil alt de MMA. Els dos van incloure els genotips *TCII 776GG*, *MTRR 524TT* i *MTRR 66GG* en les gestants, la suplementació regular al primer trimestre amb àcid fòlic, l'estat socioeconòmic, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primera visita prenatal, l'anèmia (hemoglobina < 11 g/dL) al primer trimestre, fumar durant el primer trimestre, esmorzar cereals durant tot l'embaràs, la planificació de l'embaràs i un model la cobalamina plasmàtica (50 pmol/L) al primer trimestre i l'altre l'HoloTC (10 pmol/L).

Es van dissenyar dos models per l'anàlisi del risc d'acabar l'embaràs al tercil alt de MMA. Els dos van incloure els genotip *TCII 776GG*, *MTRR 524TT* i *MTRR 66GG* en les gestants, la suplementació regular al primer trimestre amb àcid fòlic, l'estat socioeconòmic, l'inici de l'embaràs al tercil alt de MMA, l'edat de la gestant al part, l'IMC a la primera visita prenatal, l'anèmia (hemoglobina < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes, fumar durant tot l'embaràs, la creatinina al part i un model la cobalamina plasmàtica (50 pmol/L) al part i l'altre l'HoloTC (10 pmol/L).

Per l'anàlisi de les dades es va utilitzar la versió 17 del paquet de programes estadístics SPSS per a Windows. El nivell de significació utilitzat va ser de $p < 0,05$.



RESULTATS DE L'ESTUDI NUTCIR

RESULTATS DE L'ESTUDI NUTCIR

La mitjana (SD) d'edat de les dones embarassades estudiades és de 32 (5) anys. L'edat gestacional mitjana al part és de 38,9 (1,6) setmanes gestacionals. Dels embarassos estudiats el 81,4% eren planificats. En la periconcepció el 31,4% de les embarassades fumaven, passant a ser un 19,0% durant tot l'embaràs. El consum d'alcohol i drogues a la periconcepció era d'un 5,9% i 3,5% respectivament, sent d'un 0,2% i un 0,6% respectivament durant l'embaràs. En el consum de drogues, 5 gestants a la periconcepció i 2 durant l'embaràs van consumir cocaïna. L'exclusió de les gestants amb consum de drogues no va afectar els resultats ni les conclusions, conseqüentment es van mantenir en l'anàlisi de les dades (**Taula E1**).

A les 15 setmanes hi ha una disminució respecte al primer trimestre de les concentracions de tots els indicadors bioquímics plasmàtics analitzats, excepte en els folats, el MMA i la raó HoloTC/Cbl. Les concentracions es mantenen inferiors respecte al primer trimestre fins al final de l'embaràs en el cas de la cobalamina, l'HoloTC i els folats (a partir de les 24-27 setmanes). Tot i que es manté inferior a la concentració inicial, a partir de les 24-27 setmanes, la concentració d'HoloTC tendeix a augmentar i a establir-se fins al final de la gestació. Des de les 24-27 fins a les 34 setmanes, la raó HoloTC/Cbl, i fins al final de l'embaràs, la concentració de MMA, es mantenen més elevades que a principis d'embaràs. La concentració de tHcy és menor respecte al primer trimestre fins a les 24-27 setmanes i està més elevada al treball de part que a principis d'embaràs. Les concentracions plasmàtiques del cordó respecte a les de la mare al treball de part, són més elevades en tots els indicadors, excepte en el cas de la tHcy on la concentració al cordó és inferior (**Taula E2**).

A la **Taula E2** s'observa que les diferències en estat dels diferents biomarcadors al llarg de l'embaràs depèn tant de la fase d'avenç (temps) de la gestació, com de l'ús de suplementos prenals. Les interaccions entre ús de suplementos i temps de gestació s'observen de forma consistent al llarg de l'embaràs, en la cobalamina, tHcy i folats plasmàtics. En el cas de l'HoloTC tan sols la diferència entre les 15 setmanes respecte les 8-12 setmanes està afectada per la suplementació, i l'ús de suplementos no influeix els canvis durant l'embaràs en la raó HoloTC/Cbl i el MMA plasmàtic.

Taula E1. Característiques de la població NutCIR

Característiques de les embarassades	Mitjana (DE)¹ [N] o Número (%) [IC 95%]
Edat al part (anys)	32 (5) [533]
	Baix: 27/462 (5,8)[3,9-8,4]
Estat socioeconòmic familiar ²	Mig :223/462 (48,3)[43,6-52,9]
	Alt: 212/462 (45,9)[41,3-50,6]
Planificació de l'embaràs	390/479 (81,4)[77,6-84,8]
IMC ³ a la primera visita prenatal (kg/m ²)	23,7 (4,1) [471]
Fumadores ⁴ a la periconcepció	169/539 (31,4)[27,5-37,5]
Fumadores ⁴ durant l'embaràs	95/500 (19,0)[15,7-22,7]
Consum regular d'alcohol ⁵ a la periconcepció	29/495 (5,9)[4,0-8,3]
Consum regular d'alcohol ⁵ durant l'embaràs	1/477 (0,2)[0,0-1,2]
Consum de drogues ⁶ a la periconcepció	17/486 (3,5)[2,1-5,5]
Consum de drogues ⁶ durant l'embaràs	3/486 (0,6)[0,1-1,8]
Consum de cafè no descafeïnat durant l'embaràs	164/479 (34,2)[30,0-38,7]
Consum de cereals fortificats per esmorzar durant l'embaràs	206/504 (40,9)[36,6-45,3]
Ús de suplementes amb àcid fòlic durant el 1r trimestre (el 68,1% dels quals portaven cobalamina)	497/541 (91,9)[89,2-94,0]
Ús de suplementes amb àcid fòlic o multivitamínics durant el 2n i 3r trimestre (el 42,5% dels quals portaven cobalamina)	276/492 (56,1)[51,6-60,5]
Ús de suplementes amb ferro durant el 2n i 3r trimestre	150/475 (31,6)[27,4-36,0]
Hemoglobina < 11 g/dl 1r trimestre	13/485 (2,7)[1,4-4,5]
Hemoglobina < 11 g/dl a ≥ 34 setmanes gestacionals	143/479 (29,9)[25,8-34,2]
Edat gestacional al part, setmanes gestacionals completes	38,9 (1,6) [499]
Pes al néixer (g)	3198 (456) [499]
Sexe nounat (nens)	239/499 (47,9)[43,4-52,4]
Avortaments espontanis	32/545 (5,9)[4,1-8,2]
Diabetis gestacional [mort fetal]	33/483 (6,8) [N=1]
Hipertensió gestacional ⁷	29/480 (6,0)[4,1-8,6]
Preeclàmpsia ⁸	8/480 (1,7)[0,7-3,3]
Part prematur espontani (<37 setmanes gestacionals) [Ruptura prematura de membranes]	15/499 (3,0) [N = 2]
Retard de creixement intrauterí (Pes al néixer <P ₁₀)	39/499 (7,8)[5,6-10,5]
Malformacions congènites majors	4/545 (0,7)[0,2-1,9]
Síndrome de Down	2/545 (0,4)[0,0-1,3]

¹Desviació estàndard; ²basat en la combinació de les professions de la mare i el pare; ³índex de massa corporal; ⁴hàbit tabàquic declarat per la gestant a les enquestes d'hàbits i corroborat amb la determinació de la cotinina plasmàtica (fumadora ≥ 10 ng/mL); ⁵≥ 7 copes/setmana; ⁶consumidores de cocaïna a la periconcepció i 2 durant l'embaràs; ⁷hipertensió diastòlica (≥ 90 mm Hg) en 2 ocasions separades en com a mínim 4-6 hores després de les 20 setmanes gestacionals; ⁸proteïnúria (excreció de proteïna ≥ 0,3 g/dia en orina de 24h o tira reactiva d'orina amb ≥ 2+) i hipertensió gestacional.

Taula E2. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó

	Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
	8-12	15	24-27	34		
Cbl ¹ (pmol/L)	386(369-403) ² [536]	341(324-358) ^{ab} [421]	287(278-296) ^{ab} [461]	262(252-271) ^a [450]	248(239-257) ^{ac} [419]	386(359-414) ^d [408]
HoloTC ³ (pmol/L)	85,5(79,0-92,0) ² [430]	79,0(64,7-93,3) ^{ac} [378]	68,0(63,3-72,7) ^a [400]	74,9(67,3-82,4) ^a [385]	70,8(64,2-77,4) ^a [358]	222,4(202,7-242,2) ^d [340]
MMA ⁴ (µmol/L)	0,13(0,12-0,13) ² [536]	0,13(0,12-0,14) [421]	0,14(0,13-0,15) ^a [461]	0,16(0,16-0,17) ^a [450]	0,18(0,17-0,18) ^a [422]	0,29(0,28-0,30) ^d [408]
Folats (nmol/L)	25,2(23,6-26,8) ⁵ [536]	24,7(23,2-26,4) ^e [421]	12,8(12,0-13,7) ^{ae} [461]	10,8(10,0-11,6) ^{ae} [450]	10,6(9,8-11,5) ^{ae} [421]	23,9(22,6-25,2) ^d [408]
tHcy ⁶ (µmol/L)	5,3(5,2-5,4) ⁵ [536]	4,5(4,4-4,6) ^{ab} [421]	4,6(4,5-4,7) ^{ab} [461]	5,3(5,2-5,4) ^b [450]	6,2(6,0-6,3) ^a [422]	4,9(4,7-5,0) ^d [408]
HoloTC/Cbl	0,22(0,21-0,23) ² [430]	0,22(0,21-0,23) [378]	0,24(0,22-0,25) ^a [399]	0,28(0,26-0,29) ^a [385]	0,28(0,27-0,30) [355]	0,71(0,61-0,81) ^d [340]

¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴àcid metilmalònic; ⁵mitjana geomètrica (IC 95%)[N]; ⁶homocisteïna total. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^ap<0,001. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per folats i tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte:temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^bp<0,05, ^cp<0,01, ^ep<0,001. Prova t de Student per a dades aparellades: ^dp<0,001 respecte al part.

Les gestants amb un ús regular de suplementes amb cobalamina presenten estats tant de cobalamina, d'HoloTC com de raó HoloTC/Cbl més elevats, respecte les gestants no suplementades o suplementades de forma irregular, durant tot l'embaràs. A les 15 setmanes, tot i mantenir concentracions més elevades la diferència no és significativa en cap dels tres marcadors, en la relació HoloTC/Cbl tampoc ho és en el treball de part. Les concentracions de MMA plasmàtic no varien segons l'ús de suplementes. També s'observa un estat en folats (folat plasmàtic superior i tHcy inferior) més elevat en la presència de suplementació regular amb àcid fòlic durant tot l'embaràs. Amb l'excepció del MMA, els biomarcadors plasmàtics indiquen estats més alts en cobalamina i en folats, en els cordons dels nounats nascuts de les gestants suplementades de forma regular durant tot l'embaràs (**Taula E3**). Els canvis en les concentracions dels indicadors plasmàtics respecte al primer trimestre són semblants als observats en el comportament bioquímic global (**Taula E2**) excepte en l'HoloTC, de les 34 setmanes al treball de part, i en els folats, de les 24-27 setmanes al treball de part, on les concentracions de les gestants amb suplementació regular no presenten canvis.

L'estat en cobalamina de les gestants que comencen al tercil baix de cobalamina plasmàtica (≤ 316 pmol/L) es manté inferior, per tots els marcadors bioquímics d'estat en cobalamina durant tot l'embaràs, respecte les gestants del tercil mig i alt, excepte en la raó HoloTC/Cbl. Seguint la mateixa tendència, les concentracions de cobalamina i d'HoloTC plasmàtiques, però també la raó HoloTC/Cbl, són més baixes als cordons dels nounats de les gestants del tercil baix, i les de MMA i tHcy més altes respecte els tercils mig i alt. El folat plasmàtic és més baix en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina respecte els altres tercils, però no de forma significativa ni a les 15 setmanes ni al cordó (**Taula E4**). Els canvis en les concentracions dels indicadors plasmàtics respecte al primer trimestre són semblants als observats en el comportament bioquímic global (**Taula E2**), excepte en l'HoloTC. En les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, la concentració d'HoloTC a partir de les 24-27 setmanes de gestació no presenta canvis. La interacció entre ús de suplementes i temps de gestació es diferencia respecte el comportament observat en la bioquímica global (**Taula E2**), en el fet que la interacció en el tercil baix només s'observa, en els folats i la tHcy, a les 15 setmanes.

Taula E3. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó segons ús de suplementes prenatals

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Cbl ¹ (pmol/L)	Supl no Regular	366(353-379) ^{2a} [270]	328(315-340) ^b [237]	279(269-289) ^{ab} [344]	251(240-262) ^{cb} [328]	235(226-245) ^{cb} [309]	358(330-386) ^{ad} [299]
	Supl Regular	402(383-420) ² [202]	346(329-363) ^b [161]	316(295-337) ^b [98]	292(274-310) ^b [102]	286(263-308) ^b [95]	476(400-552) ^d [96]
HoloTC ³ (pmol/L)	Supl no Regular	76,2(69,7-82,6) ^{2a} [232]	69,1(63,1-75,1) ^e [214]	63,1(58,4-67,8) ^{ab} [299]	65,9(60,2-71,6) ^{ab} [284]	63,2(57,6-68,8) ^{ab} [267]	197,7(176,5-218,8) ^{cd} [252]
	Supl Regular	99,5(86,6-112,4) ² [172]	77,9(69,4-86,3) ^b [145]	84,4(70,5-98,3) ^f [82]	97,4(77,8-117,0) [83]	95,5(73,6-117,4) [77]	310,3(262,8-357,8) ^d [76]
MMA ⁴ (µmol/L)	Supl no Regular	0,13(0,12-0,13) ² [270]	0,13(0,12-0,14) [237]	0,14(0,13-0,14) ^b [337]	0,16(0,15-0,17) ^b [323]	0,17(0,17-0,18) ^b [304]	0,28(0,27-0,30) ^d [294]
	Supl Regular	0,12(0,11-0,13) ² [202]	0,13(0,11-0,15) [161]	0,15(0,13-0,16) ^b [96]	0,16(0,15-0,18) ^b [101]	0,18(0,16-0,20) ^b [96]	0,30(0,27-0,32) ^d [95]
Folats (nmol/L)	Supl no Regular	15,2(14,4-16,1) ^{5c} [288]	15,7(14,6-16,8) ^c [200]	9,6(9,1-10,0) ^{bc} [356]	7,8(7,4-8,2) ^{bc} [346]	7,9(7,5-8,4) ^{bc} [329]	20,4(19,4-21,4) ^{cd} [318]
	Supl Regular	45,1(42,3-48,1) ⁵ [248]	37,5(34,8-40,3) ^b [221]	34,5(31,3-38,1) [105]	31,9(28,7-35,3) [104]	30,0(25,7-35,0) [91]	42,0(37,8-46,7) ^d [90]
tHcy ⁶ (µmol/L)	Supl no Regular	5,5(5,3-5,7) ^{5c} [288]	4,6(4,5-4,7) ^{bg} [200]	4,8(4,7-5,0) ^{bc} [356]	5,5(5,4-5,7) ^{fc} [346]	6,4(6,2-6,6) ^{bc} [329]	5,1(4,9-5,2) ^{cd} [318]
	Supl Regular	5,1(4,9-5,2) ⁵ [248]	4,4(4,3-4,5) ^b [221]	4,0(3,8-4,2) ^b [105]	4,5(4,3-4,7) ^e [104]	5,3(5,1-5,6) ^e [92]	4,2(4,0-4,4) ^d [90]
HoloTC/Cbl	Supl no Regular	0,21(0,19-0,22) ^{2g} [232]	0,21(0,20-0,23) [214]	0,23(0,22-0,24) ^{fg} [299]	0,26(0,25-0,27) ^{ab} [284]	0,27(0,25-0,29) ^b [266]	0,65(0,55-0,76) ^{d g} [252]
	Supl Regular	0,24(0,22-0,26) ² [172]	0,22(0,21-0,26) [145]	0,26(0,24-0,29) [82]	0,32(0,28-0,37) [83]	0,32(0,27-0,36) [75]	0,94(0,67-1,21) ^d [76]

¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴àcid metilmalònic; ⁵mitjana geomètrica (IC 95%)[N]; ⁶homocisteïna total. Prova *t* de Student per a dades no aparellades: ^ap<0,01, ^cp<0,001, ^gp<0,05 comparant l'ús regular de suplementes respecte l'ús irregular/no suplementació. Ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per folats i tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part). Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^bp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^dp<0,001 respecte al part.

Taula E4. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina i folats durant l'embaràs i estat al cordó segons estat inicial en cobalamina¹

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Cbl ² (pmol/L)	Tercil mig-alt	450(428-472) ^{3a} [358]	390(367-413) ^{ab} [280]	327(317-337) ^{abc} [305]	300(288-311) ^{abd} [292]	280(268-291) ^{abe} [275]	445(406-483) ^{af} [266]
	Tercil baix	258(251-265) ³ [178]	242(232-252) ^b [136]	209(200-218) ^b [151]	189(181-198) ^b [152]	185(176-194) ^b [141]	276(250-301) ^f [139]
HoloTC ⁴ (pmol/L)	Tercil mig-alt	101,4(92,2-110,5) ^{3a} [287]	92,9(71,6-114,2) ^{bdg} [251]	77,1(70,7-83,5) ^{ab} [263]	86,9(75,9-97,9) ^{ah} [249]	80,3(71,2-89,3) ^{ab} [236]	271,0(245,5-296,6) ^{af} [223]
	Tercil baix	53,7(50,8-56,7) ³ [143]	51,5(47,4-55,7) ^h [122]	49,1(45,1-53,0) ⁱ [132]	50,4(46,8-54,0) [130]	50,1(44,6-55,6) [119]	124,7(104,4-145,0) ^f [115]
MMA ⁵ (µmol/L)	Tercil mig-alt	0,12(0,11-0,12) ^{3g} [358]	0,12(0,11-0,13) ^j [280]	0,13(0,12-0,13) ^a [305]	0,15(0,14-0,15) ^{ab} [292]	0,16(0,16-0,17) ^{ab} [278]	0,27(0,26-0,28) ^{af} [266]
	Tercil baix	0,14 (0,13-0,15) ³ [178]	0,15(0,13-0,17) [136]	0,16(0,14-0,18) ^b [151]	0,19(0,17-0,21) ^b [152]	0,20(0,18-0,22) ^b [141]	0,32(0,30-0,35) ^f [139]
Folats (nmol/L)	Tercil mig-alt	27,0(25,1-29,0) ^{6g} [358]	25,9(24,0-28,0) ^e [280]	13,6(12,6-14,8) ^{beg} [305]	11,7(10,7-12,8) ^{beg} [292]	11,3(10,2-12,5) ^{bej} [277]	24,6(23,0-26,3) ^f [266]
	Tercil baix	21,8(19,3-24,6) ⁶ [178]	22,8(20,2-25,7) ^c [136]	11,3(10,2-12,6) ^b [151]	9,3(8,3-10,5) ^b [152]	9,4(8,3-10,7) ^b [141]	22,8(20,8-24,9) ^f [139]
tHcy ⁷ (µmol/L)	Tercil mig-alt	5,2(5,1-5,3) ^{6g} [358]	4,4(4,3-4,5) ^{bg} [280]	4,5(4,4-4,7) ^{bcg} [305]	5,1(5,0-5,3) ^g [292]	5,9(5,7-6,1) ^{ab} [278]	4,6(4,5-4,8) ^{af} [266]
	Tercil baix	5,5(5,3-5,7) ⁶ [178]	4,7(4,5-4,8) ^{bd} [136]	4,9(4,7-5,1) ^b [151]	5,6(5,4-5,9) [152]	6,7(6,4-7,0) ^b [141]	5,4(5,1-5,7) ^f [139]
HoloTC/Cbl	Tercil mig-alt	0,22(0,21-0,24) ³ [287]	0,22(0,21-0,23) [251]	0,23(0,21-0,25) [263]	0,28(0,26-0,29) ^b [249]	0,28(0,26-0,30) ^b [233]	0,78(0,66-0,91) ^{fj} [223]
	Tercil baix	0,21(0,20-0,22) ³ [143]	0,22(0,20-0,23) [122]	0,24(0,22-0,25) [131]	0,27(0,25-0,29) ^b [130]	0,28(0,25-0,30) ^h [119]	0,57(0,41-0,72) ^f [115]

¹Tercil de cobalamina plasmàtica durant el 1 trimestre d'embaràs; ²cobalamina; ³mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ⁴holotranscobalamina; ⁵àcid metilmalònic; ⁶mitjana geomètrica (IC 95%)[N]; ⁷homocisteïna total. Prova *t* de Student per a dades no aparellades: ^a*p*<0,001, ^g*p*<0,01, ^j*p*<0,05 comparant començar l'embaràs en el tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/l) respecte els altres tercils. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^b*p*<0,001, ^h*p*<0,01, ⁱ*p*<0,05. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per folats i tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte:temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^c*p*<0,01, ^q*p*<0,05, ^e*p*<0,001. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^f*p*<0,001 respecte al part.

Les freqüències dels polimorfismes *TCII* 776C>G, *TCII* 67A>G, *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *MTRR* 66A>G, *MTRR* 524C>T i *MTR* 2756A>G en gestants i nadons estan resumides a la **Taula E5**. El polimorfisme amb una freqüència més elevada d'homozigots mutants és el *MTRR* 66A>G amb un 25,8% de les gestants i un 27,9% dels nadons amb el genotip *MTRR* 66GG. Degut a les baixes freqüències (< 12%) d'homozigots mutants dels polimorfismes *TCII* 67A>G, *MTHFR* 1298A>C i *MTR* 2756A>G, no s'han considerat per anàlisis posteriors per falta de potència estadística.

Taula E5. Freqüències de polimorfismes en gens implicats en la biodisponibilitat i transport de cobalamina i folats en gestants i nounats

GESTANTS													
<i>Transcobalamina II</i>				<i>Metilentetrahidrofolat-reductasa</i>				<i>5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa reductasa</i>				<i>5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa</i>	
776C>G N (%)		67A>G N (%)		677C>T N (%)		1298A>C N (%)		66A>G N (%)		524C>T N (%)		2756A>G N (%)	
CC	176 (33,8)	AA	418 (80,4)	CC	181 (34,8)	AA	283 (54,4)	AA	147 (28,3)	CC	221 (42,6)	AA	351 (67,5)
CG	248 (47,7)	AG	94 (18,1)	CT	245 (47,1)	AC	192 (36,9)	AG	238 (45,9)	CT	232 (44,7)	AG	161 (31,0)
GG	96 (18,5)	GG	8 (1,5)	TT	94 (18,1)	CC	45 (8,7)	GG	134 (25,8)	TT	66 (12,7)	GG	8 (1,5)
NOUNATS													
<i>Transcobalamina II</i>				<i>Metilentetrahidrofolat-reductasa</i>				<i>5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa reductasa</i>				<i>5-Metiltetrahidrofolat homocisteïna metiltransferasa</i>	
776C>G N (%)		67A>G N (%)		677C>T N (%)		1298A>C N (%)		66A>G N (%)		524C>T N (%)		2756A>G N (%)	
CC	124 (33,8)	AA	285 (78,1)	CC	128 (35,1)	AA	193 (52,6)	AA	95 (26,0)	CC	167 (46,0)	AA	249 (67,8)
CG	174 (47,4)	AG	77 (21,1)	CT	166 (45,5)	AC	146 (39,8)	AG	168 (46,0)	CT	152 (41,9)	AG	106 (28,9)
GG	69 (18,8)	GG	3 (0,8)	TT	71 (19,5)	CC	28 (7,6)	GG	102 (27,9)	TT	44 (12,1)	GG	12 (3,3)

L'evolució de l'estat en cobalamina i en folats durant l'embaràs i al cordó en la presència dels polimorfismes en gens que intervenen en les vies metabòliques d'aquestes vitamines, està descrita en les **Taules E6-E8**. Tot i que no varia el folat plasmàtic, la presència del genotip *MTHFR* 677TT respecte els altres genotips s'associa amb concentracions més elevades de tHcy durant tot l'embaràs i al cordó (**Taula E6**). Els canvis en les concentracions plasmàtiques tant de folats com de tHcy respecte al primer trimestre, són semblants als observats en el comportament bioquímic global (**Taula E2**). A diferència dels altres genotips, en presència del genotip *MTHFR* 677TT, la interacció entre ús regular de suplementes amb àcid fòlic i temps sobre l'estat en folats tan sols s'observa a les 15 setmanes de gestació. En el cas de la tHcy només s'observa la influència de la interacció entre ús de suplementes amb àcid fòlic i temps, a les 34 setmanes de gestació en presència dels genotips *MTHFR* 677CC+CT.

Amb l'excepció de la tHcy més elevada en el genotip *MTRR* 66GG a les 8-12 i a les 15 setmanes de gestació respecte els altres genotips, no s'observen diferències en els indicadors d'estat en cobalamina entre els diferents genotips del polimorfisme *MTRR* 66A<G al llarg de l'embaràs ni al cordó. Per tots els genotips del polimorfisme, el comportament de les concentracions de cobalamina, HoloTC, MMA, tHcy i HoloTC/Cbl respecte al primer trimestre, se sembla a l'observat de forma global (**Taula E2**). L'única excepció és en la concentració d'HoloTC plasmàtica en *MTRR* 66GG, que a partir de les 24-27 setmanes ja no varia respecte al primer trimestre (**Taula E7**).

Pel polimorfisme *MTRR* 524C>T, de forma global no s'observa cap diferència en els indicadors d'estat en cobalamina durant l'embaràs pel fet de ser *MTRR* 524TT. Però en considerar només les gestants que comencen l'embaràs en el tercil baix de cobalamina, s'observa que les concentracions de MMA plasmàtic a les 24-27 i a les 34 setmanes de gestació, són majors en presència del genotip *MTRR* 524TT respecte *MTRR* 524CC+CT (**Gràfic E1**). Per tots els genotips del polimorfisme, les diferències en les concentracions de cobalamina i tHcy durant l'embaràs respecte al primer trimestre, segueixen la mateixa tendència que els observades de forma global (**Taula E2**). No obstant, les concentracions d'HoloTC, MMA i HoloTC/Cbl en presència del genotip *MTRR* 524TT, no varien significativament al llarg de l'embaràs, tot i que les tendències observades inicialment, disminució de les concentracions d'HoloTC i augment de les de MMA i HoloTC/Cbl, respecte al primer trimestre, es mantenen (**Taula E8**). La falta de significació podria ser deguda al reduït nombre de gestants *MTRR* 524TT.

Taula E6. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en folats durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme *MTHFR* 677C>T en gestants

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Folats (nmol/L)	<i>MTHFR</i> 677CC+CT	25,0(23,3-26,8) ¹ [423]	24,7(23,0-26,6) ^a [328]	12,9(12,0-13,9) ^{ab} [363]	10,9(10,1-11,8) ^{ab} [353]	10,8(9,9-11,8) ^{ab} [335]	23,7(22,3-25,2) ^c [321]
	<i>MTHFR</i> 677TT	27,3(23,1-32,3) ¹ [94]	25,8(21,8-30,4) ^d [78]	12,9(10,8-15,4) ^b [79]	11,0(9,1-13,3) ^b [77]	10,2(8,3-12,6) ^b [70]	26,3(23,0-30,2) ^c [71]
tHcy ² (µmol/L)	<i>MTHFR</i> 677 CC+CT	5,2(5,1-5,3) ^{1e} [423]	4,4(4,3-4,5) ^{be} [328]	4,6(4,5-4,7) ^{be} [363]	5,2(5,1-5,3) ^{de} [353]	6,0(5,8-6,2) ^{be} [336]	4,7(4,6-4,9) ^{cf} [321]
	<i>MTHFR</i> 677TT	5,9(5,5-6,2) ¹ [94]	4,8(4,6-5,1) ^b [78]	5,1(4,8-5,5) ^b [79]	6,0(5,6-6,4) [77]	7,1(6,6-7,7) ^b [70]	5,5(5,0-6,0) ^c [71]

¹Mitjana geomètrica (IC 95%)[N]; ²Homocisteïna total. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^bp<0,001. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb àcid fòlic (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte: temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^ap<0,001, ^dp<0,05. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^cp<0,001 respecte al part. Prova *t* de Student per a dades no aparellades: ^ep<0,001, ^fp<0,01 comparant el genotip *MTHFR* 677TT respecte 677CC+CT.

Taula E7. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme *MTRR* 66A>G en gestants

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Cbl ¹ (pmol/L)	<i>MTRR</i>	384(363-406) ² [383]	339(317-362) ^a [303]	282(272-292) ^a [328]	257(246-267) ^{ab} [316]	243(233-253) ^{ac} [293]	379(352-406) ^d [291]
	66AA+AG						
HoloTC ³ (pmol/L)	<i>MTRR</i>	393(368-419) ² [133]	346(324-368) ^a [102]	305(283-327) ^a [113]	275(253-298) ^a [113]	260(239-281) ^a [109]	421(341-500) ^d [100]
	66GG						
MMA ⁴ (µmol/L)	<i>MTRR</i>	82,4(76,0-88,8) ² [318]	81,8(62,7-101,0) ^a [277]	66,9(62,0-71,8) ^a [293]	73,6(64,9-82,3) ^e [281]	68,0(61,6-74,4) ^e [259]	224,1(202,6-245,7) ^d [252]
	66AA+AG						
tHcy ⁵ (µmol/L)	<i>MTRR</i>	94,7(77,2-112,2) ² [111]	72,1(60,9-83,3) ^{ab} [96]	70,1(58,8-81,4) ^a [102]	76,5(61,5-91,4) [99]	76,3(59,7-92,9) [96]	207,9(163,2-252,6) ^d [86]
	66GG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	0,13(0,12-0,13) ² [383]	0,13(0,12-0,14) ^f [303]	0,14(0,13-0,15) ^e [328]	0,16(0,16-0,17) ^a [316]	0,18(0,17-0,19) ^a [294]	0,29(0,27-0,30) ^d [291]
	66AA+AG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	0,12(0,12-0,13) ² [133]	0,12(0,11-0,13) [102]	0,13(0,13-0,14) ^a [113]	0,15(0,15-0,16) ^a [113]	0,17(0,16-0,18) ^a [111]	0,29(0,27-0,31) ^d [100]
	66GG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	5,2(5,1-5,4) ^{6f} [383]	4,4(4,3-4,5) ^{af} [303]	4,6(4,5-4,8) ^{ab} [328]	5,3(5,1-5,5) [316]	6,2(6,0-6,4) ^a [294]	4,8(4,7-5,0) ^d [291]
	66AA+AG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	5,5(5,3-5,7) ⁶ [133]	4,7(4,5-4,8) ^a [102]	4,7(4,5-4,9) ^a [113]	5,4(5,1-5,6) [113]	6,1(5,8-6,5) ^e [111]	4,9(4,7-5,2) ^d [100]
	66GG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	0,22(0,21-0,23) ² [318]	0,22(0,21-0,23) [277]	0,24(0,23-0,25) [292]	0,28(0,26-0,29) ^a [281]	0,28(0,26-0,30) ^a [258]	0,71(0,60-0,81) ^d [252]
	66AA+AG						
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i>	0,23(0,20-0,25) ² [111]	0,21(0,19-0,23) [96]	0,23(0,21-0,25) [102]	0,27(0,24-0,29) [99]	0,28(0,25-0,32) ^a [94]	0,67(0,46-0,89) ^g [86]
	66GG						

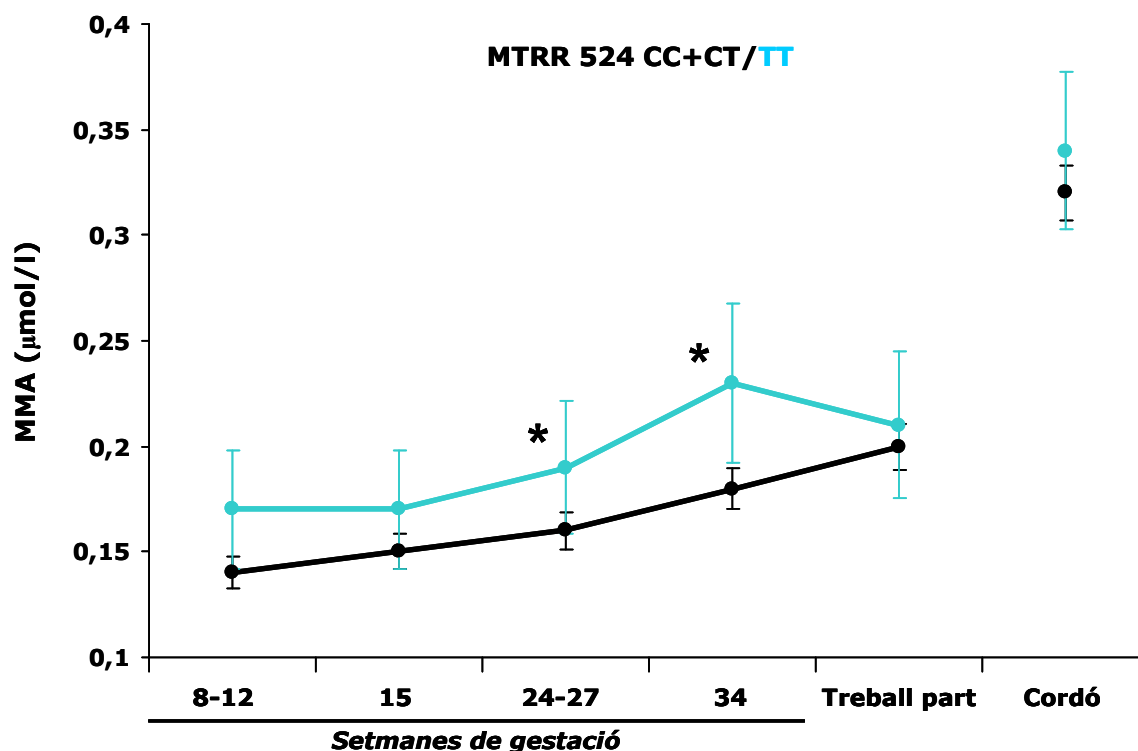
¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴àcid metilmalònic; ⁵homocisteïna total; ⁶mitjana geomètrica (IC 95%)[N]. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^ap<0,001, ^ep<0,01. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte: temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^bp<0,05, ^cp<0,01. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^dp<0,001, ^gp<0,01 respecte al part. Prova *t* de Student per a dades no aparellades: ^fp<0,05 comparant el genotip *MTRR* 66GG respecte 66AA+AG.

Taula E8. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme *MTRR* 524C>T en gestants

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Cbl ¹ (pmol/L)	<i>MTRR</i> 524CC+CT	387(367-406) ² [450]	340(320-359) ^{ab} [358]	287(277-297) ^{ab} [387]	260(250-271) ^a [383]	245(235-255) ^{ab} [355]	391(361-421) ^c [345]
	<i>MTRR</i> 524TT	388(359-417) ² [66]	351(320-382) ^a [48]	293(268-319) ^a [55]	270(245-295) ^a [47]	263(234-291) ^a [48]	370(274-467) ^d [47]
HoloTC ³ (pmol/L)	<i>MTRR</i> 524CC+CT	85,7(78,6-92,8) ² [378]	80,2(63,9-96,7) ^{ae} [329]	67,4(62,5-72,2) ^a [346]	74,4(66,1-82,7) ^f [339]	70,1(63,2-77,0) ^f [312]	224,6(203,1-246,1) ^c [297]
	<i>MTRR</i> 524TT	84,4(67,9-100,9) ² [52]	72,1(61,4-82,7) [45]	70,0(55,3-84,6) [50]	73,0(60,7-85,3) [42]	70,7(52,9-88,5) [44]	194,1(149,7-238,5) ^c [42]
MMA ⁴ (µmol/L)	<i>MTRR</i> 524CC+CT	0,12(0,12-0,13) ² [450]	0,13(0,12-0,14) [358]	0,14(0,13-0,15) ^a [387]	0,16(0,15-0,17) ^a [383]	0,17(0,17-0,18) ^a [357]	0,29(0,28-0,30) ^c [345]
	<i>MTRR</i> 524TT	0,13(0,11-0,15) ² [66]	0,15(0,11-0,18) [48]	0,14(0,12-0,16) [55]	0,17(0,15-0,19) [47]	0,17(0,15-0,19) [49]	0,27(0,24-0,30) ^c [47]
tHcy ⁵ (µmol/L)	<i>MTRR</i> 524CC+CT	5,3(5,2-5,4) ⁶ [450]	4,5(4,4-4,6) ^a [358]	4,6(4,5-4,8) ^a [387]	5,3(5,2-5,5) [383]	6,2(6,0-6,4) ^a [357]	4,9(4,7-5,0) ^c [345]
	<i>MTRR</i> 524TT	5,4(5,1-5,7) ⁶ [66]	4,5(4,2-4,8) ^a [48]	4,7(4,4-5,0) ^a [55]	5,2(4,9-5,7) [47]	6,0(5,4-6,6) ^a [49]	4,8(4,4-5,2) ^c [47]
HoloTC/Cbl	<i>MTRR</i> 524CC+CT	0,22(0,21-0,23) ² [378]	0,22(0,21-0,23) [329]	0,24(0,22-0,25) [345]	0,27(0,26-0,29) ^a [339]	0,28(0,26-0,30) ^a [310]	0,70(0,60-0,81) ^c [297]
	<i>MTRR</i> 524TT	0,21(0,18-0,25) ² [52]	0,21(0,18-0,23) [45]	0,23(0,20-0,26) [50]	0,28(0,24-0,31) [42]	0,28(0,23-0,33) [43]	0,76(0,52-1,00) ^c [42]

¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴àcid metilmalònic; ⁵homocisteïna total; ⁶mitjana geomètrica (IC 95%)[N]. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^ap<0,001, ^fp<0,01. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte: temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^bp<0,05, ^ep<0,01. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^cp<0,001, ^dp<0,05 respecte al part.

Gràfic E1. Comparació de fluctuacions en MMA plasmàtic durant l'embaràs i al cordó segons el polimorfisme *MTRR* 524C<T en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix¹ de cobalamina plasmàtica



¹Tercil baix de cobalamina ≤ 316 pmol/L. MMA, àcid metilmalònic. Gràfic amb mitjanes aritmètiques. Test de Mann-Whitney * $p < 0,05$, comparant el genotip *MTRR* 524TT respecte 524CC+CT.

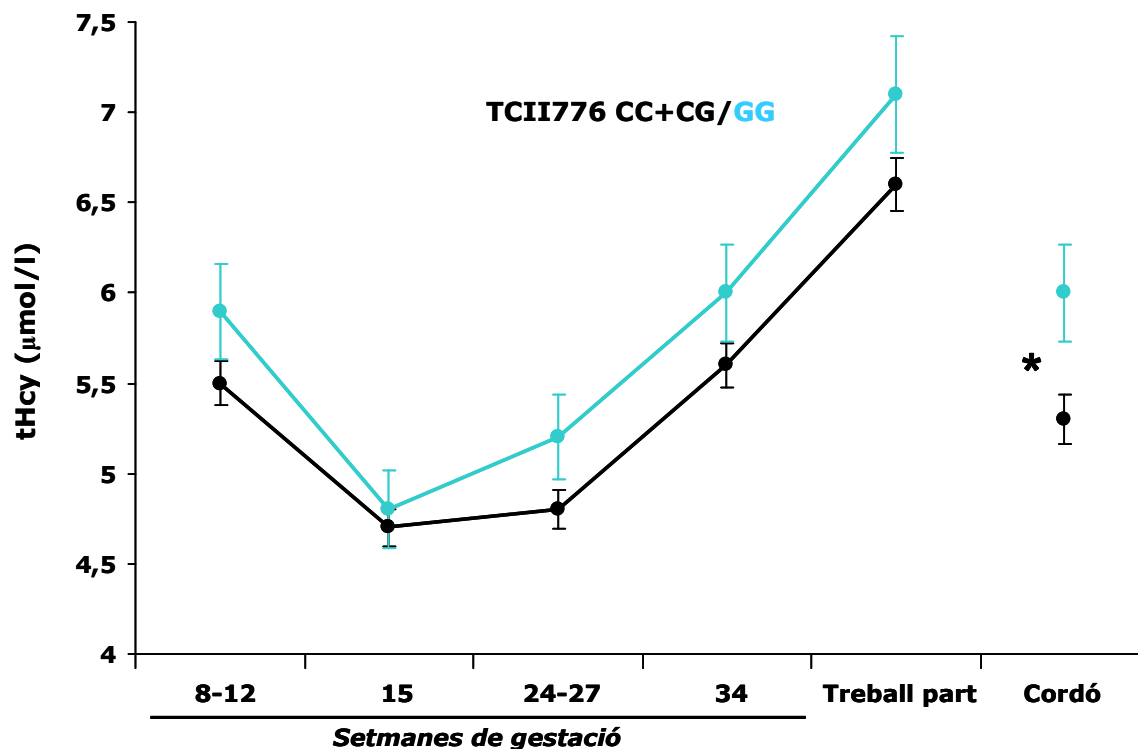
No s'observen diferències en les concentracions dels indicadors bioquímics entre els genotips del polimorfisme *TCII* 776C>G de forma general. No obstant, en considerar només les gestants que comencen l'embaràs en el tercil baix de cobalamina plasmàtica, s'observen concentracions majors de tHcy al plasma dels cordons dels nounats de les gestants amb el genotip *TCII* 776GG respecte *TCII* 776CC+CG (**Gràfic E2**). Les diferències respecte el primer trimestre en les concentracions de cobalamina, HoloTC, MMA, tHcy i HoloTC/Cbl al llarg de l'embaràs per tots els genotips del polimorfisme, se semblen a les observades de forma global (**Taula E2**). L'única excepció és que en presència del genotip *TCII* 776GG a partir de les 15 setmanes tot i que les concentracions d'HoloTC tendeixen a ser inferiors respecte al primer trimestre, no varien de forma significativa (**Taula E9**). A diferència dels altres genotips del polimorfisme, en presència del genotip *TCII* 776GG hi ha una interacció ús de suplement-temps de gestació, en les concentracions de cobalamina a les 24-27 i a les 34 setmanes.

Taula E9. Fluctuacions en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina durant l'embaràs i estat al cordó segons el genotip del polimorfisme *TCII* 776C>G en gestants

		Setmanes gestacionals				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Cbl ¹ (pmol/L)	<i>TCII</i> 776CC+CG	389(369-409) ² [422]	344(323-364) ^a [335]	287(277-297) ^a [368]	262(251-273) ^a [357]	249(238-259) ^{ab} [332]	395(362-427) ^c [322]
	<i>TCII</i> 776GG	376(350-401) ² [95]	328(303-352) ^a [71]	291(267-315) ^{ab} [74]	258(239-277) ^{ab} [73]	241(219-263) ^a [71]	361(307-415) ^c [70]
HoloTC ³ (pmol/L)	<i>TCII</i> 776CC+CG	85,7(78,3-92,9) ² [353]	81,0(63,5-98,5) ^{ab} [306]	66,3(61,6-70,9) ^a [328]	75,1(66,4-83,9) ^d [316]	69,8(62,7-76,9) ^a [292]	219,9(198,1-241,7) ^c [277]
	<i>TCII</i> 776GG	84,9(70,0-99,8) ² [77]	71,5(59,0-83,9) ^d [68]	74,5(59,5-89,5) [68]	69,9(59,6-80,3) [65]	71,9(56,5-87,3) [64]	225,0(179,7-270,3) ^c [62]
MMA ⁴ (µmol/L)	<i>TCII</i> 776CC+CG	0,13(0,12-0,13) ² [422]	0,13(0,12-0,14) [335]	0,14(0,13-0,15) ^e [368]	0,16(0,15-0,17) ^a [357]	0,17(0,17-0,18) ^a [334]	0,29(0,27-0,30) ^c [322]
	<i>TCII</i> 776GG	0,12(0,12-0,13) ² [95]	0,12(0,11-0,13) [71]	0,14(0,13-0,16) ^a [74]	0,16(0,15-0,18) ^a [73]	0,17(0,16-0,19) ^a [72]	0,29(0,27-0,31) ^c [70]
tHcy ⁵ (µmol/L)	<i>TCII</i> 776CC+CG	5,3(5,2-5,4) ⁶ [422]	4,5(4,4-4,6) ^{ab} [335]	4,6(4,5-4,8) ^a [368]	5,3(5,1-5,5) [357]	6,2(6,0-6,4) ^a [334]	4,9(4,7-5,0) ^c [322]
	<i>TCII</i> 776GG	5,4(5,1-5,6) ⁶ [95]	4,5(4,3-4,8) ^a [71]	4,8(4,5-5,0) ^d [74]	5,3(5,1-5,6) [73]	6,0(5,6-6,5) ^e [72]	4,9(4,6-5,3) ^c [70]
HoloTC/Cbl	<i>TCII</i> 776CC+CG	0,22(0,21-0,23) ² [353]	0,22(0,21-0,23) [306]	0,23(0,22-0,24) [328]	0,27(0,26-0,29) ^a [316]	0,28(0,26-0,30) ^a [290]	0,70(0,59-0,80) ^c [277]
	<i>TCII</i> 776GG	0,22(0,20-0,24) ² [77]	0,21(0,19-0,24) [68]	0,24(0,21-0,27) [67]	0,27(0,25-0,29) ^d [65]	0,29(0,25-0,32) ^e [63]	0,77(0,51-1,04) ^f [62]

¹Cobalamina; ²mitjana aritmètica (IC 95%)[N]; ³holotranscobalamina; ⁴àcid metilmalònic; ⁵homocisteïna total; ⁶mitjana geomètrica (IC 95%)[N]. Anova per mesures repetides amb correcció post-hoc, Bonferroni, respecte a les setmanes 8-12: ^ap<0,001, ^dp<0,01, ^ep<0,05. Factor inter-subjecte: ús regular de suplementes amb cobalamina per Cbl, HoloTC i MMA o amb àcid fòlic per tHcy (al 1r trimestre, per les 8-12 i 15 setmanes)(durant els mesos 4-7 per les 24-27, 34 setmanes i al part) i factor intra-subjecte: temps; terme d'interacció entre ús de suplementes i temps: ^bp<0,05. Prova *t* de Student per a dades aparellades: ^cp<0,001; ^fp<0,01 respecte al part.

Gràfic E2. Comparació de fluctuacions en tHcy durant l'embaràs i al cordó segons el polimorfisme *TCII 776C>G* en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix¹ de cobalamina plasmàtica



¹Tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L). tHcy, homocisteïna total; Gràfic amb mitjanes geomètriques. Test de Mann-Whitney * $p < 0,05$ comparant el genotip *TCII 776GG* respecte *776CC+CG*.

Per tots els polimorfismes analitzats, independentment del genotip, les concentracions plasmàtiques del cordó, respecte a les gestants al part, segueixen el comportament observat per la bioquímica global (**Taula E2**), sent més elevades en tots els indicadors, excepte en el cas de la tHcy on la concentració al cordó és inferior.

En investigar els factors predictius dels canvis en els indicadors bioquímics al llarg de l'embaràs, entre el primer trimestre i les 34 setmanes de gestació, els més importants són l'estat en cobalamina a principis d'embaràs i, l'ús continuat de suplementos després d'acabar el primer trimestre. S'observa que començar l'embaràs al tercil baix de cobalamina, s'associa amb una reducció mitjana del 8,5% inferior de cobalamina plasmàtica, i un augment mitjà del 9,3% superior de MMA plasmàtic, respecte a les gestants que inicien l'embaràs al tercil mig-alt de cobalamina plasmàtica. Un augment de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica a les 34 setmanes, s'associa a una reducció mitjana del 2,1% de l'augment en MMA. La suplementació regular amb àcid fòlic durant els mesos 4-7, s'associa a una reducció mitjana de l'11% en tHcy a les 34 setmanes, respecte a la suplementació irregular, o no es suplementació durant aquests mesos (**Taula E10**). Les anàlisis de regressió lineal múltiple, que es van dissenyar per

investigar els factors que podien explicar els canvis en les concentracions plasmàtiques d'HoloTC i de la raó HoloTC/Cbl, entre el primer i el tercer trimestre d'embaràs, no expliquen de forma significativa la variabilitat en aquests indicadors d'estat en cobalamina durant aquest període.

Es va utilitzar l'anàlisi de regressió lineal múltiple per investigar les contribucions d'estat en cobalamina i, suplementació amb àcid fòlic, sobre les fluctuacions de tHcy al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó (**Taula E11**). S'observa que tant el genotip *MTHFR* 677TT en gestants, com la suplementació regular amb àcid fòlic, s'associen respectivament amb l'augment i la disminució de tHcy en tots els punts de l'embaràs i al cordó. Quan s'inclou l'HoloTC al model en lloc de la cobalamina plasmàtica, l'associació entre la suplementació regular i la disminució de la concentració de tHcy a les 15 setmanes, es troba al límit de la significació. La presència del genotip *MTHFR* 677TT s'associa a augments mitjans de tHcy d'entre el 13-19% a finals d'embaràs i al cordó, respecte a les concentracions observades per els altres genotips d'aquest polimorfisme. L'ús regular de suplementes amb àcid fòlic durant els mesos 4-7 s'associa a finals de la gestació a reduccions de tHcy, respecte l'ús irregular o la no suplementació, d'entre el 18-20% en les gestants i del 13-14% als cordons. La presència del genotip *MTRR* 66GG s'associa amb tHcy més elevada durant les primeres 15 setmanes de l'embaràs, si en el model de regressió es considera com a variable independent la concentració de cobalamina en cada extracció, l'associació s'observa fins a les 24-27 setmanes quan s'inclou l'HoloTC en lloc de la cobalamina. Tant la cobalamina com l'HoloTC plasmàtica, s'associen inversament amb la tHcy en tots els punts excepte en el treball de part, i en el cas de la cobalamina, a les 24-27 setmanes, punt en el que l'associació amb l'HoloTC és més important (**Taula E11**). Les reduccions en tHcy són modestes però significatives per ambdós biomarcadors, variant entre 1-2% per cada augment de 50 pmol/L de cobalamina, i entre 0,5-0,8% per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC durant l'embaràs. Les relacions entre les concentracions de cobalamina o HoloTC plasmàtiques i la tHcy al cordó, se semblen a les observades per la gestant durant l'embaràs.

Davant la possibilitat que els polimorfismes que afecten a les reaccions metabòliques dependents de la cobalamina, no s'associïn amb la tHcy (indicador funcional d'estat en cobalamina), en situacions d'estat suficient o bo en cobalamina, es va dissenyar un model per investigar si hi havia associació quan hi ha risc de deficiència (**Taula E12**). Es van considerar com a grup de risc per desenvolupar deficiència en cobalamina, les gestants que inicien l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica. La presència del genotip *MTRR* 524TT no s'associa amb la tHcy en cap punt de l'embaràs ni al cordó. En canvi el genotip *TCII* 776GG en gestants s'associa amb un augment mitjà del 17% i 21%

de la tHcy del cordó dels seus nounats, respecte els altres genotips del polimorfisme, en els models que inclouen la cobalamina i l'HoloTC respectivament. Els dos factors amb una influència més important sobre les concentracions de tHcy, continuen sent el genotip *MTHFR* 677TT en les gestants i, l'ús regular amb suplementes d'àcid fòlic. No obstant, en considerar l'HoloTC en el model en lloc de la cobalamina, l'associació amb el genotip deixa de ser significativa a les 24-27 setmanes i al treball de part. El genotip *MTRR* 66GG en les gestants s'associa amb un augment mitjà del 10-12% de la tHcy a les 15 setmanes, tant en el model que inclou la cobalamina com el que inclou l'HoloTC. Tot i que la cobalamina plasmàtica no s'associa amb la tHcy en cap punt de l'embaràs, un augment de 50 pmol/L en la cobalamina plasmàtica del cordó, s'associa amb una reducció mitjana del 4% en tHcy. Augmentar l'HoloTC en 10 pmol/L, en canvi, s'associa amb reduccions del 2-4% fins a les 24-27 setmanes, i del 0,8% al cordó (**Taula E12**).

Es van investigar quins factors que s'associen amb el MMA plasmàtic al llarg de l'embaràs i al cordó, amb un model de regressió lineal múltiple que inclou a totes les gestants. Tant la cobalamina com l'HoloTC plasmàtica, s'associen inversament amb el MMA a partir de la segona meitat de l'embaràs, tot i que els percentatges de canvi mitjans, són modestos per augments de 50 pmol/L i 10 pmol/L en cobalamina i HoloTC plasmàtica respectivament. En el moment del part l'associació només s'observa en el cas de la cobalamina (**Taula E13**). En fer l'anàlisi considerant només les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica, es van introduir a més, els genotips *MTRR* 524TT, *TCII* 776GG de les gestants com a variables independents al model. El genotip *TCII* 776GG no es va associar amb la concentració de MMA plasmàtica en cap punt de l'embaràs. En canvi, el genotip *MTRR* 524TT es va associar a les 8-12 setmanes, amb un augment mitjà de MMA plasmàtica de 0,05 µmol/L, respecte els altres genotips del polimorfisme, tant en el model ajustat per cobalamina plasmàtica ($p=0,05$) com per HoloTC ($p<0,05$). En el model ajustat per la cobalamina plasmàtica, el genotip *MTRR* 66GG s'associa amb una disminució mitjana de MMA plasmàtica de 0,06 µmol/L, respecte els altres genotips del polimorfisme al cordó. Tant la cobalamina com l'HoloTC plasmàtica s'associen a una disminució mitjana en MMA plasmàtic de 0,029 i 0,041 µmol/L per cada augment de 50 pmol/L de cobalamina plasmàtica i, de 0,016 i 0,029 µmol/L per cada augment de 10 pmol/L d'HoloTC, a les 8-12 i 15 setmanes de gestació respectivament. L'associació es manté en el cas de l'HoloTC a les 24-27 setmanes i en el cas de la cobalamina al cordó (**Taula E14**).

Amb l'anàlisi de regressió lineal múltiple per investigar quines variables contribuïen a la variació dels indicadors bioquímics al plasma del cordó, es va observar que l'estat en cobalamina a principis de l'embaràs s'associa amb tots els marcadors. Els nounats de les gestants que comencen l'embaràs en el tercil baix de cobalamina plasmàtica, presenten en el cordó, concentracions mitjanes 156 i 141 pmol/L inferiors de cobalamina i d'HoloTC i, 0,05 µmol/L majors de MMA i 16% de tHcy, respecte dels altres tercils. Per altra banda, la suplementació regular amb cobalamina durant tot l'embaràs, s'associa amb la cobalamina plasmàtica i l'HoloTC del cordó, amb unes mitjanes 110 i 99 pmol/L majors respectivament, i tHcy 13% menor respecte als cordons dels nounats de les gestants que no se suplementen o ho fan de forma irregular. Respecte a la genètica, la presència del genotip *MTHFR* 677TT en el cordó s'associa amb un augment mitjà del 8% de tHcy, respecte els altres genotips del polimorfisme (**Taula E15**).

Taula E10. Factors associats amb els canvis en indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina entre el primer i el tercer trimestre d'embaràs¹

	MODEL ²				
	Cbl ³	MMA ⁴	MMA	tHcy ⁵	tHcy
R² (F) [N]	0,09 (5,6) ⁶ [333] ^a	0,03 (2,8) [349] ^c	0,03 (2,3) ⁷ [348] ^b	0,05 (3,0) ⁸ [349] ^c	0,05 (3,1) ⁹ [348] ^c
	Coeficient B (error estàndard)				
Inici embaràs tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)	8,49 (2,2) ^a	NS ¹⁰	9,27 (3,8) ^b	NS	NS
Increment de 50 pmol/L en cobalamina plasmàtica a les 34st	-	-2,12 (1,0) ^b	-	NS	-
Suplementació regular amb àcid fòlic durant els mesos 4-7	-	-	-	-11,10 (3,4) ^c	-11,18 (3,1) ^b

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple del percentatge de canvi en l'indicador plasmàtic de l'estat en cobalamina entre el primer trimestre i les 34 setmanes de gestació; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar durant tot l'embaràs, percentil de pes del nounat, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent a les 34 setmanes, genotip *MTRR* 66GG en gestants respecte els genotips corresponents i creatinina plasmàtica a les 34 setmanes; ³% de canvi en cobalamina; ⁴% de canvi en àcid metilmalònic; ⁵% de canvi en homocisteïna total; ⁶ajustat també per ús regular de suplement amb cobalamina durant els mesos 4-7; ⁷ajustat per l'holotranscobalamina (increment de 10 pmol/L) en lloc de la cobalamina plasmàtica a les 34 setmanes; ⁸ajustat pel genotip *MTHFR* 677TT en gestants respecte els genotips corresponents; ⁹ajustat pel genotip *MTHFR* 677TT en gestants respecte els genotips corresponents i per l'holotranscobalamina (increment de 10 pmol/L) en lloc de la cobalamina plasmàtica a les 34 setmanes; ¹⁰no significatiu. ^ap<0,001; ^bp<0,05; ^cp<0,01.

Taula E11. Factors predictius de les fluctuacions de la tHcy al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó¹

	MODELS 1-6 ²					
	8-12 sg ³	15 sg	24-27 sg	34 sg	Treball de part	Cordó
R² (F) [N]	0,25 (11,3) [346] ^a	0,20 (7,8) [303] ^a	0,18 (7,5) [330] ^a	0,22 (9,1) [321] ^a	0,18 (8,0) [352] ^a	0,16 (7,4) [343] ^a
Coeficient B (error estàndard)						
<i>MTHFR</i> 677TT en gestants	13,31 (2,9) ^{4a}	10,41 (2,7) ^a	11,85 (3,4) ^a	15,95 (3,6) ^a	19,01 (3,8) ^a	16,53 (3,9) ^a
<i>MTRR</i> 66GG en gestants	5,54 (2,5) ^{4b}	6,50 (2,4) ^c	NS ⁵	NS	NS	NS
Suplementació regular amb àcid fòlic	-8,30 (2,3) ^{6a}	-4,50 (2,2) ^b	-15,47 (0,0) ^a	-19,83 (3,4) ^a	-18,21 (3,7) ^a	-14,10 (4,0) ^a
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-1,19 (0,0) ^{7c}	-1,60 (0,0) ^a	NS	-1,69 (0,0) ^b	NS	-1,09 (0,0) ^a
	MODELS 7-12 ²					
	8-12 sg ³	15 sg	24-27 sg	34 sg	Treball de part	Cordó
R² (F) [N]	0,26 (12,2) [345] ^a	0,20 (7,7) [301] ^a	0,22 (9,5) [328] ^a	0,23 (9,8) [320] ^a	0,19 (7,9) [320] ^a	0,17 (6,5) [305] ^a
Coeficient B (error estàndard)						
<i>MTHFR</i> 677TT en gestants	12,98 (2,8) ^{4a}	11,07 (2,7) ^a	9,86 (3,2) ^c	13,43 (3,4) ^a	15,49 (3,9) ^a	14,80 (4,1) ^c
<i>MTRR</i> 66GG en gestants	6,18 (2,5) ^{4b}	5,76 (2,4) ^b	5,65 (2,8) ^b	NS ⁵	NS	NS
Suplementació regular amb àcid fòlic	-8,15 (2,2) ^{6a}	NS	-13,33 (3,1) ^a	-18,45 (3,3) ^a	-18,13 (3,8) ^a	-12,72 (4,1) ^c
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-0,50 (2,2) ^{8c}	-0,70 (0,0) ^a	-0,80 (0,0) ^a	-0,50 (0,0) ^c	NS	-0,40 (0,0) ^a

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple: variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar corresponent al moment de l'embaràs, consum de cafè no descafeïnat durant tot l'embaràs, IMC a la primera visita prenatal, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent, edat de la gestant al part, creatinina a l'extracció corresponent; ³setmanes gestacionals; ⁴% de canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ⁵no significatiu; ⁶% de canvi en tHcy associat a l'ús regular de suplement respecte l'ús irregular/no ús corresponent al moment de l'embaràs; ⁷% de canvi en tHcy associat amb un augment de cobalamina plasmàtica a l'extracció corresponent; ⁸% de canvi en tHcy associat amb un augment d'holotranscobalamina plasmàtica a l'extracció corresponent; ^ap<0,001; ^bp<0,05; ^cp<0,01.

Taula E12. Factors predictius de les fluctuacions de la tHcy al llarg de l'embaràs i al cordó en les gestants que inicien la gestació al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)¹

	MODELS 1-6 ²					
	8-12 sg ³	15 sg	24-27 sg	34 sg	Treball de part	Cordó
R² (F) [N]	0,24 (3,8) [118] ^a	0,24 (3,4) [101] ^a	0,13 (2,3) [114] ^b	0,17 (2,7) [111] ^b	0,19 (3,1) [117] ^b	0,26 (4,1) [114] ^a
Coeficient B (error estàndard)						
<i>MTHFR</i> 677TT en gestants	23,24(5,7) ^{4a}	12,98(4,7) ^b	19,48(6,2) ^b	22,14(6,7) ^b	22,89(7,0) ^b	25,11(6,9) ^b
<i>MTRR</i> 66GG en gestants	NS ⁵	10,19(4,4) ^{4c}	NS	NS	NS	NS
<i>TCII</i> 776GG en gestants	NS	NS	NS	NS	NS	17,12(7,4) ^{4c}
Suplementació regular amb àcid fòlic	-10,69(4,7) ^{6c}	-10,08(4,1) ^c	-17,88(6,5) ^b	-22,51(6,9) ^a	-17,55(7,1) ^c	-16,39(7,4) ^c
Increment de 50 pmol/L en Cbl	NS	NS	NS	NS	NS	-4,40(1,2) ^{7a}
MODELS 7-12 ²						
	8-12 sg ³	15 sg	24-27 sg	34 sg	Treball de part	Cordó
R² (F) [N]	0,29 (4,7) [117] ^a	0,31 (4,5) [100] ^a	0,16 (2,6) [112] ^b	0,23 (3,5) [110] ^a	0,22 (3,3) [105] ^a	0,25 (3,6) [101] ^a
Coeficient B (error estàndard)						
<i>MTHFR</i> 677TT en gestants	18,53(5,5) ^{4b}	11,96(4,6) ^c	NS ⁵	12,30(5,8) ^c	NS	17,23(6,9) ^c
<i>MTRR</i> 66GG en gestants	NS	11,74(4,2) ^{4b}	NS	NS	NS	NS
<i>TCII</i> 776GG en gestants	NS	NS	NS	NS	NS	20,68(7,3) ^{4c}
Suplementació regular amb àcid fòlic	-10,08(4,5) ^{6c}	-9,61(3,9) ^c	-14,44(6,0) ^b	-19,51(5,8) ^a	-15,21(6,8) ^c	-13,06(7,0) ^c
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-3,15(1,2) ^{8b}	-3,54(1,0) ^b	-2,27 (1,0) ^c	NS	NS	-0,80(0,0) ^b

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple: variable dependent en cada model: homocisteïna plasmàtica total; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar corresponent al moment de l'embaràs, consum de cafè no descafeïnat durant tot l'embaràs, IMC a la primera visita prenatal, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent, edat de la gestant al part, genotip *MTRR* 524TT en gestants respecte els genotips corresponents, creatinina a l'extracció corresponent; ³setmanes gestacionals; ⁴% de canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ⁵no significatiu; ⁶% de canvi en tHcy associat a l'ús regular de suplement respecte l'ús irregular/no ús corresponent al moment de l'embaràs; ⁷%de canvi en tHcy associat amb un augment de cobalamina plasmàtica a l'extracció corresponent; ⁸% de canvi en tHcy associat amb un augment d'holotranscobalamina plasmàtica a l'extracció corresponent; ^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05.

Taula E13. Factors predictius de les fluctuacions del MMA al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó¹

	MODELS 1-4²			
	24-27 sg³	34 sg	Treball de part	Cordó
R² (F) [N]	0,04 (2,4) [342] ^a	0,07 (3,6) [335] ^b	0,03 (2,3) [369] ^c	0,05 (3,1) [357] ^a
Coeficient B (error estàndard)				
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-0,007 (0,0) ^{4b}	-0,009 (0,0) ^b	-0,008 (0,0) ^b	-0,003 (0,0) ^a

	MODELS 5-7²		
	24-27 sg	34 sg	Cordó
R² (F) [N]	0,05 (3,5) [340] ^a	0,03 (2,5) [334] ^c	0,04 (2,9) [317] ^a
Coeficient B (error estàndard)			
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-0,003 (0,0) ^{5b}	-0,002 (0,0) ^a	-0,001 (0,0) ^a

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple: variable dependent en cada model: àcid metilmalònic; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar corresponent al moment de l'embaràs, IMC a la primera visita prenatal, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent, edat de la gestant al part, genotip *MTRR* 66GG en gestants respecte els genotips corresponents, creatinina a l'extracció corresponent; ³setmanes gestacionals; ⁴concentració de cobalamina plasmàtica a l'extracció corresponent; ⁵concentració d'HoloTC plasmàtica a l'extracció corresponent; ^ap<0,01; ^bp<0,001; ^cp<0,05.

Taula E14. Factors predictius de les fluctuacions del MMA al llarg de l'embaràs i la concentració al cordó en les gestants que inicien la gestació al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)¹

	MODELS 1-3²		
	8-12 sg³	15 sg	Cordó
R² (F) [N]	0,10 (2,6) [126] ^a	0,10 (2,3) [108] ^a	0,07 (2,1) [121] ^a
Coeficient B (error estàndard)			
<i>MTRR</i> 524TT en gestants	0,054 (0,0) ^{4b}	NS ⁵	NS
<i>MTRR</i> 66GG en gestants	NS	NS	-0,06 (0,1) ^{4b}
Increment de 50 pmol/L en Cbl	-0,029 (0,0) ^{6c}	-0,041 (0,0) ^d	-0,016 (0,0) ^a
	MODELS 4-6²		
	8-12 sg	15 sg	24-27 sg
R² (F) [N]	0,12 (2,9) [125] ^c	0,12 (2,7) [107] ^c	0,09 (2,3) [117] ^a
Coeficient B (error estàndard)			
<i>MTRR</i> 524TT en gestants	0,051 (0,0) ^{4a}	NS ⁵	NS
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-0,016 (0,0) ^{7c}	-0,029 (0,0) ^c	-0,011 (0,0) ^d

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple: variable dependent en cada model: àcid metilmalònic; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar corresponent al moment de l'embaràs, IMC a la primera visita prenatal, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent, edat de la gestant al part, genotip *MTRR* 66GG i *TCII* 776GG en gestants respecte els genotips corresponents, creatinina a l'extracció corresponent; ³setmanes gestacionals; ⁴MMA en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ⁵no significatiu; ⁶concentració de cobalamina plasmàtica a cada extracció; ⁷concentració d'HoloTC plasmàtica a cada extracció; ^ap<0,05; ^bp=0,05; ^cp<0,001; ^dp<0,01.

Taula E15. Factors predictius dels indicadors plasmàtics de l'estat en cobalamina al cordó¹

	MODEL²			
	Cbl³	HoloTC⁴	MMA⁵	tHcy⁶
R² (F) [N]	0,14 (9,0) [346] ^a	0,19 (11,0) [297] ^a	0,07 (4,7) [346] ^a	0,15 (9,3) [345] ^a
Coeficient B (error estàndard)				
Inici embaràs tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)	-155,77 (32,1) ^a	-141,37 (21,1) ^a	0,05 (0,0) ^a	15,60 (3,0) ^a
Suplementació regular amb cobalamina durant els mesos 4-7	109,61 (34,1) ^b	98,76 (22,6) ^a	NS ⁷	-12,54 (3,4) ^a
<i>MTHFR</i> 677TT en cordó	-	-	-	7,47 (3,7) ^{8c}

¹Anàlisi de regressió lineal múltiple; ²tots els models es van ajustar per: hàbit de fumar durant tot l'embaràs, pes al naixement, edat gestacional (dies) a l'extracció corresponent al part, genotip *MTHFR* 2756GG en cordó respecte els genotips corresponents i creatinina al cordó; variable dependent: ³cobalamina plasmàtica (pmol/L); ⁴holotranscobalamina plasmàtica (pmol/L); ⁵àcid metilmalònic (µmol/L); ⁶% de canvi en homocisteïna total; ⁷no significatiu; ⁸% de canvi en tHcy en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme. ^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05.

Per tal d'investigar la relació entre l'estat en cobalamina i els polimorfismes implicats en el seu metabolisme, amb el resultat de l'embaràs, es va investigar si s'associaven amb el risc de diabetis gestacional, creixement intrauterí retardat (CIR) i hipertensió gestacional, utilitzant la regressió logística múltiple. El model global no explica de forma significativa el risc de desenvolupar la diabetis gestacional (R^2 [N]: 0,15 [336] $p=0,10$). En la hipertensió gestacional, tot i que el model explica el 23% del risc de desenvolupar la patologia (R^2 [N]: 0,23 [341] $p<0,05$), ni l'estat en cobalamina, l'ús de suplementos, ni els polimorfismes implicats, són factors de risc per aquesta complicació de l'embaràs. El factor del model que més explica el risc d'hipertensió gestacional és l'IMC (OR: 1,27 [IC95% 1,12-1,43] $p<0,001$). El model dissenyat per analitzar el risc de CIR explica el 15% del risc global. Les gestants amb genotip *TCII* 776GG tenen 3 vegades més risc d'un embaràs afectat per CIR respecte les gestants amb els altres genotips del polimorfisme. La magnitud del risc és semblant al que implica fumar durant tot l'embaràs (**Taula E16**).

Taula E16. Factors de risc de creixement intrauterí retardat¹

Risc de creixement intrauterí retardat ²		
R^2 [N]	0,15 [345] ^a	
	OR	IC95%
Fumar durant tot l'embaràs	3,05 ^a	1,13-8,26
<i>TCII</i> 776GG en gestants	2,74 ^{3a}	1,09-6,94

¹Anàlisi de regressió logística múltiple dels factors de risc pel creixement intrauterí retardat; ²tots els models es van ajustar per: IMC a la primera visita prenatal, edat de la gestant al part, estat socioeconòmic, anèmia (Hb < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes, creatinina plasmàtica a les 34 setmanes, inici de l'embaràs al tercil baix de cobalamina, suplementació regular amb àcid fòlic al primer trimestre respecte l'ús irregular/no ús de suplementos, suplementació regular amb cobalamina durant els mesos 4-7 respecte l'ús irregular/no ús de suplementos, genotip *MTHFR* 677TT i *MTRR* 66GG en gestants respecte els genotips corresponents; ³risc de creixement intrauterí retardat en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme. ^a $p<0,05$.

Es van investigar amb anàlisis de regressió logística múltiple, els factors predictors de risc de baix estat en cobalamina a principis i finals d'embaràs (**Taula E17a-c**). Al primer trimestre, el 15% de les gestants presentaven deficiència marginal de cobalamina (≤ 220 pmol/L), al final de l'embaràs la deficiència marginal de cobalamina (≤ 169 pmol/L) era present en un 19% de gestants. Els models per l'inici d'embaràs, no són significatius pel risc global de ser al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L) (R^2 [N]: 0,03 [373] $p=0,73$), al tercil alt de MMA ($\geq 0,10$ $\mu\text{mol/L}$) (R^2 [N]: 0,03 [373] $p=0,75$) ni tenir deficiència marginal de cobalamina (≤ 220 pmol/L) o HoloTC (≤ 35 pmol/L) (R^2 [N]: 0,05 [338] $p=0,64$). Només en el model d'inici de l'embaràs al tercil baix d'HoloTC ($\leq 57,3$ pmol/L), s'observa en el límit del nivell de significació

($p=0,05$), que tenir un estat socioeconòmic mig-alt respecte baix, suposa una reducció del risc del 43% (**Taula E17a**).

En considerar el final de l'embaràs, el treball de part, tots els models són significatius. S'observa que el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix de cobalamina (≤ 199 pmol/L), disminueix en un 42% en tenir un estat socioeconòmic mig-alt respecte baix, i en un 66% per l'ús regular de suplementes amb cobalamina durant tot l'embaràs, respecte l'ús irregular o no ús de suplementes. Iniciar l'embaràs al tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L) augmenta 10 vegades el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix (cobalamina ≤ 199 pmol/L). De forma similar però amb un resultat de major magnitud, el fet de començar l'embaràs al tercil baix d'HoloTC ($\leq 57,3$ pmol/L) augmenta 19 vegades el risc d'acabar l'embaràs en el mateix tercil (HoloTC $\leq 45,5$ pmol/L). En relació al risc d'acabar l'embaràs al tercil alt de MMA plasmàtic ($\geq 0,14$ $\mu\text{mol/L}$), ajustant el model per l'estat en HoloTC al moment del part, iniciar l'embaràs al tercil alt de MMA ($\geq 0,10$ $\mu\text{mol/L}$) augmenta 8 vegades el risc d'acabar en la mateixa situació. En el model ajustat per la cobalamina plasmàtica al moment del part, el risc associat a MMA elevat a principis d'embaràs, augmenta 9 vegades el risc d'acabar al tercil alt de MMA. S'observa un efecte protector en l'augment de 50 pmol/L de la concentració de cobalamina, reduint en un 24% el risc d'acabar al tercil alt de MMA (**Taula E17a-b**). En analitzar els factors de risc d'acabar l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina (≤ 169 pmol/L) o HoloTC (≤ 22 pmol/L), s'observa una disminució del risc del 47% en tenir un estat socioeconòmic mig-alt respecte baix. Per contra l'inici de l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina (≤ 220 pmol/L) o HoloTC (≤ 35 pmol/L) augmenta 11 vegades el risc d'acabar en la mateixa situació, mentre que la presència del genotip *TCII 776GG* en gestants duplica aquest risc respecte els altres genotips del polimorfisme (**Taula E17c**).

Es van comparar les concentracions de MMA plasmàtic (indicador funcional d'estat en cobalamina) en cada punt de l'embaràs i al cordó, entre les gestants que van iniciar l'embaràs amb una combinació de baix estat en cobalamina (≤ 316 pmol/L, tercil baix) i elevat estat en folats ($\geq 34,8$ pmol/L) respecte a les que van iniciar la gestació al tercil baix de cobalamina però mig-baix de folats ($< 34,8$ pmol/L). A les 8-12 setmanes 51 gestants tenien un baix estat en cobalamina i alt de folats, respecte a les 127 gestants en les que el tercil baix de cobalamina es combinava amb el tercil mig-baix de folats. S'observa que el MMA plasmàtic sempre tendeix a ser més elevat en presència d'un baix estat en cobalamina combinat amb un elevat estat en folats, sent significatiu des de les 15 fins a les 34 setmanes de gestació, respecte a la presència només de baix estat en cobalamina (**Gràfic E3**).

Taula E17a. Factors de risc per un baix estat en cobalamina i HoloTC en diferents moments de l'embaràs¹

	Tercil baix de cobalamina ² (≤ 199 pmol/L)		Tercil baix d'HoloTC ² (≤ 45,5 pmol/L)			
	Part ³		Inici embaràs ⁴		Part ³	
R² [N]	0,38 [325] ^a		0,08 [335] (p =0,05)		0,46 [292] ^a	
	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%
Estat socioeconòmic	0,58 ^{5b}	0,35-0,97	0,57 ^b	0,37-0,88	NS	NS
Fumar ⁶	NS ⁷	NS	NS	NS	2,46 ^b	1,10-5,51
Suplementació regular amb cobalamina durant els mesos 4-7	0,34 ^c	0,16-0,72	-	-	NS	NS
Inici embaràs tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L)	10,37 ^a	5,79-18,57	-	-	-	-
Inici embaràs tercil baix d'HoloTC (≤ 57,3 pmol/L)	-	-	-	-	19,49 ^a	9,85-38,54

¹Anàlisi de regressió logística múltiple dels factors de risc per un estat baix en cobalamina; ²tots els models es van ajustar per: IMC a la primera visita prenatal, edat de la gestant al part, anèmia (Hb < 11 g/dL) corresponent al moment de l'embaràs, suplementació regular amb àcid fòlic al primer trimestre respecte a l'ús irregular/no ús de suplementes, genotip *TCII* 776GG, *MTRR* 66GG i *MTRR* 524TT en gestants, respecte els genotips corresponents; ³ajustat també per: creatinina al part; ⁴tercil baix d'HoloTC a l'inici de l'embaràs ≤ 57,3 pmol/L; també ajustat per: planificació de l'embaràs i esmorzar cereals durant tot l'embaràs; ⁵mig-alt respecte baix; ⁶durant el primer trimestre o durant tot l'embaràs, corresponent al moment de l'embaràs al model; ⁷no significatiu. ^ap<0,001; ^bp<0,05; ^cp<0,01.

Taula E17b. Factors de risc per un elevat estat en MMA al final de l'embaràs¹

R ² [N]	Tercil alt MMA ² (≥ 0,14 μmol/L)			
	Part		Part	
	0,30 [338] ^a		0,29 [305] ^a	
	OR	IC95%	OR	IC95%
Increment de 50 pmol/L en Cbl	0,76 ^b	0,65-0,90	-	-
Increment de 10 pmol/L en HoloTC	-	-	NS ³	NS
Inici embaràs tercil alt MMA (≥ 0,10 μmol/L)	8,81 ^a	5,06-15,34	8,02 ^a	4,54-14,15

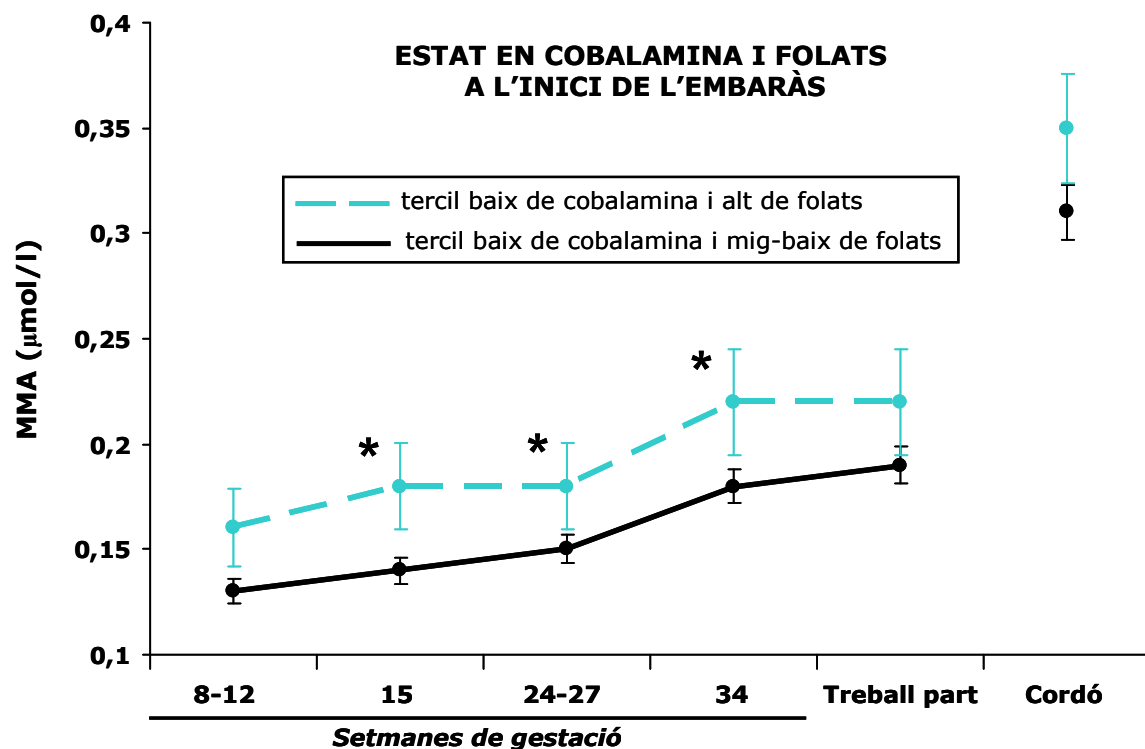
¹Anàlisi de regressió logística múltiple dels factors de risc per un estat baix en cobalamina; ²tots els models es van ajustar per: IMC a la primera visita prenatal, edat de la gestant al part, anèmia (Hb < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes, suplementació regular amb àcid fòlic al primer trimestre respecte a l'ús irregular/no ús de suplementes, estat socioeconòmic, creatinina al part, genotip *TCII* 776GG, *MTRR* 66GG i *MTRR* 524TT en gestants, respecte els genotips corresponents; ³no significatiu. ^ap<0,001; ^bp<0,01

Taula E17c. Factors de risc per deficiència marginal en cobalamina o HoloTC al final de l'embaràs¹

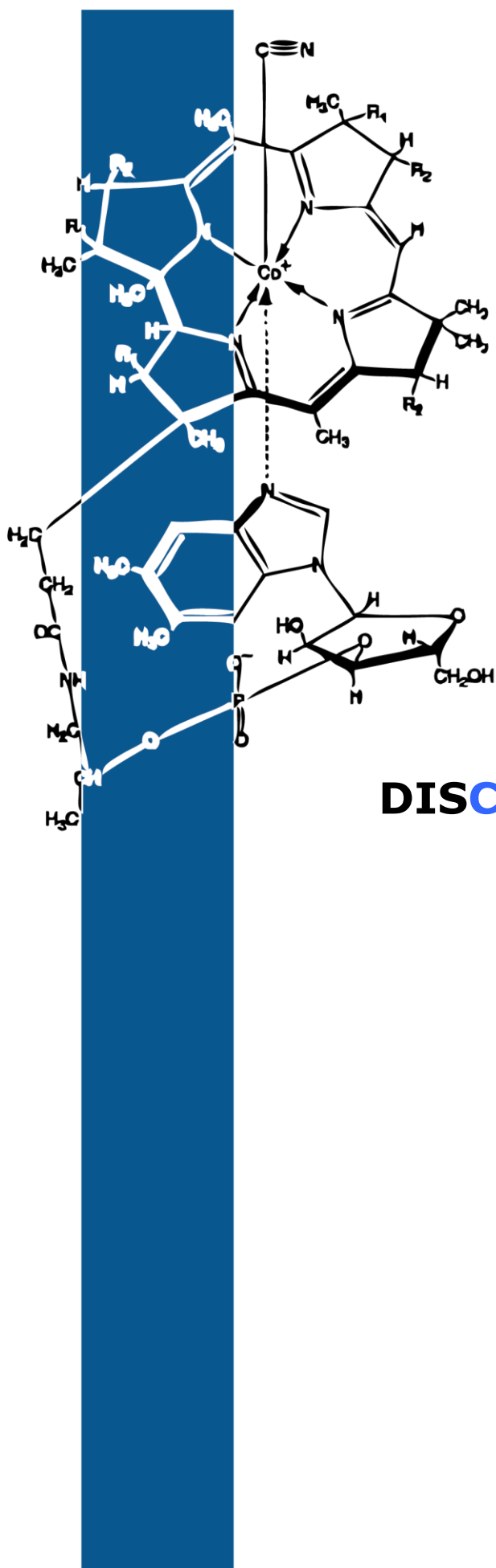
	Deficiència marginal de Cbl (≤ 169 pmol/L) o HoloTC (≤ 22 pmol/L) ²	
	Part	
R ² [N]	0,25 [293] ^a	
	OR	IC95%
<i>TCII</i> 776GG en gestants	2,50 ^{3b}	1,13-5,53
Estat socioeconòmic	0,53 ^{4b}	0,30-0,94
Inici deficiència marginal cobalamina (≤ 220 pmol/L) o HoloTC (≤ 35 pmol/L)	10,73 ^a	4,15-27,76

¹Anàlisi de regressió logística múltiple dels factors de risc per deficiència marginal de cobalamina o holotranscobalamina; ²model ajustat per: IMC a la primera visita prenatal, edat de la gestant al part, anèmia (Hb < 11 g/dL) a partir de les 34 setmanes, suplementació regular amb àcid fòlic al primer trimestre respecte a l'ús irregular/no ús de suplementes, suplementació regular amb cobalamina durant els mesos 4-7 respecte a l'ús irregular/no ús de suplementes, fumar durant tot l'embaràs, creatinina plasmàtica al part, genotip *MTRR* 66GG i *MTRR* 524TT en gestants, respecte els genotips corresponents; ³risc deficiència marginal de Cbl o HoloTC en el genotip homozigot respecte els altres genotips del polimorfisme; ⁴mig-alt respecte baix. ^ap<0,001; ^bp<0,05.

Gràfic E3. Comparació de fluctuacions en MMA durant l'embaràs i al cordó de les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica¹ segons l'estat en folats²



MMA, àcid metilmalònic. Gràfic amb mitjanes aritmètiques. ¹Tercil baix de cobalamina (≤ 316 pmol/L); ²Tercil alt de folats ($\geq 34,8$ pmol/L). Test de Mann-Whitney * $p < 0,05$ comparant les gestants que inicien la gestació al tercil baix de cobalamina i alt de folats respecte les gestants que ho fan al tercil baix de cobalamina i mig-alt de folats.



DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI NUTCIR

DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI NUTCIR

Els embarassos analitzats en l'estudi NutCIR corresponen a gestants amb una mitjana d'edat de 32 anys, propera als 31 anys de mitjana de la població catalana⁶⁸⁶. L'estat socioeconòmic familiar és majoritàriament mig-alt i, es dona un elevat percentatge de planificació de l'embaràs (81,4%) respecte les dades recollides en altres estudis on la mediana de planificació és del 58%⁶⁸⁷. El consum de drogues i alcohol és baix. En relació a l'hàbit de fumar, a Catalunya s'ha observat que un terç de les dones són fumadores al començament de l'embaràs i, que aproximadament un 25% deixen de fumar durant la gestació⁶⁸⁸. En l'estudi NutCIR el 31% de les dones són fumadores en començar l'embaràs, i un 14% deixen de fumar durant la gestació.

Comportament dels biomarcadors plasmàtics d'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs

L'embaràs implica un estrès fisiològic lligat a una major demanda de cobalamina necessària pel desenvolupament fetal. Tot i que, en base a rangs de referència de fora de l'embaràs, en l'estudi NutCIR les gestants presenten majoritàriament concentracions plasmàtiques no deficientes en cobalamina, no es coneix la concentració òptima de cobalamina o HoloTC en l'embaràs.

Les concentracions plasmàtiques de cobalamina presents en l'estudi NutCIR al llarg de l'embaràs, són semblants a les d'altres estudis³¹², trobant una disminució gradual d'aproximadament el 34% entre el primer i tercer trimestre. Les discrepàncies amb les fluctuacions de la cobalamina sèrica trobades en altres estudis, es podrien explicar en part perquè aquests consideren un nombre d'embarassades més petit^{304,338}, els estudis no són longitudinals^{261,313,343}, perquè en els estudis longitudinals, els punts escollits no coincideixen amb els nostres^{308,314}, o per diferències en els hàbits de suplementació de les gestants⁶⁸⁹.

Els factors fisiològics propis de l'embaràs com l'hemodilució, l'augment en l'hematopoesi i la demanda fetal entre d'altres, contribueixen a la disminució global de la cobalamina i l'HoloTC. Respecte al primer trimestre la concentració de cobalamina plasmàtica disminueix durant tot l'embaràs, però contràriament al que s'ha vist en altres estudis, tant realitzats a Europa³⁵⁰ com als EUA³⁰⁷, la disminució és menys accentuada en l'últim trimestre. En analitzar la cobalamina disponible a nivell dels teixits, l'HoloTC, tot i també disminuir al principi de l'embaràs, en el tercer trimestre s'estabilitza. La disminució de la

cobalamina amb l'estabilització de la concentració d'HoloTC al final de l'embaràs, fan que la raó HoloTC/Cbl augmenti al llarg d'aquest. L'augment en aquesta raó a mesura que avança l'embaràs, podria indicar el manteniment en la concentració de la cobalamina disponible als teixits.

La disminució menys pronunciada de la cobalamina i sobretot l'estabilització de l'HoloTC al tercer trimestre, es podrien explicar per diferents mecanismes. En el creixement fetal es donen dues fases, una inicial, hiperplàsica en les primeres 16 setmanes, d'augment del nombre de cèl·lules (síntesi d'ADN) i, una fase final, hipertròfica a partir de les 32 setmanes, d'augment de la mida de les cèl·lules. De les 17 a les 32 setmanes les dues fases són concomitants. La cobalamina és necessària per la síntesi d'ADN, així en l'última etapa de l'embaràs en el que aquest procés passa a un segon terme, la cobalamina necessària a nivell dels teixits seria menor, fet que explicaria l'estabilització de l'HoloTC. Un altre possible explicació seria que l'HoloTC, pot deixar de disminuir i estabilitzar-se, com a possible mecanisme compensatori a un procés d'estrès com és l'embaràs, per cobrir les necessitats del fetus i poder seguir de forma eficient amb l'alimentació del nou-nat en la lactància. Tampoc es pot descartar que l'estabilització de la concentració d'HoloTC podria ser reflex de la seva acumulació en el plasma, com a conseqüència de l'afectació del seu transport cap a la cèl·lula per la disminució de l'afinitat entre l'HoloTC i el seu receptor.

Pel fet que la cobalamina sigui un important cofactor, tant en la formació del succinil CoA a partir del metilmalonil CoA com, en la conversió de la Hcy a metionina, tant el MMA com la tHcy són marcadors de la deficiència en cobalamina. Tot i que en els dos primers trimestres hi ha poques evidències de les deficiències funcionals associades a un baix estat en cobalamina^{344,345}, en el tercer trimestre s'ha trobat baix estat en cobalamina sèrica, associat a dietes inadequades, amb un augment de les concentracions de tHcy i MMA³³⁸. En l'estudi NutCIR, en l'última part de l'embaràs quan hi ha l'estabilització de l'HoloTC, s'observen les concentracions plasmàtiques més elevades de MMA i tHcy de tot l'embaràs, confirmant els resultats d'altres estudis^{308,364,689}. Tant el MMA plasmàtic com la tHcy estan afectats per els mateixos processos fisiològics propis de l'embaràs, que resulten en la dilució de paràmetres plasmàtics. Tot i la influència d'aquests factors, es detecta l'augment dels dos marcadors funcionals d'estat en cobalamina a mesura que avança l'embaràs. Aquest fet podria recolzar la idea que tot i analitzar embarassades amb un bon estat en cobalamina, el final de l'embaràs impliqui una situació que necessiti d'un mecanisme compensatori, per tal de tenir major cobalamina disponible als teixits. El que no es pot discernir, amb les dades disponibles en el nostre estudi, és si

l'estabilització de la concentració d'HoloTC plasmàtica, indica un efecte compensatori o bé la reducció de l'afinitat del receptor d'HoloTC.

El patró de les fluctuacions en tHcy durant l'embaràs, de l'estudi NutCIR, correspon amb estudis anteriors^{364,690}. Tant factors a nivell endocrí, com la disminució gradual de l'estat en folats i cobalamina, podrien contribuir a aquestes fluctuacions. L'estat en MMA global al llarg de l'embaràs, es troba dins del rang normal (0-0,28 µmol/l)⁶⁹¹, basat en valors de referència fora de l'embaràs, suggerint que les mares no són deficientes. Cal tenir en compte que durant els dos primers trimestres de gestació, les gestants es troben en una condició anabòlica, augmentant els dipòsits de greix gràcies tant a la hiperfàgia com a l'augment de la lipogènesi⁶⁹², però que durant l'últim trimestre de gestació, el metabolisme lipídic matern canvia a un estat catabòlic, millorant l'activitat lipolítica del teixit adipós⁶⁹³, com es mostra amb el deteriorament accelerat dels dipòsits de greix. Aquest fet podria contribuir a l'augment, respecte al primer trimestre, fins i tot en presència de l'hemodilució i l'augment de la funció renal³⁰⁸, de les concentracions de MMA plasmàtic al final de la gestació.

Marcadors bioquímics al cordó

Les concentracions plasmàtiques més elevades de cobalamina, HoloTC, folats i MMA, però inferiors de tHcy en les mostres de cordó respecte els valors del treball de part, observades en l'estudi NutCIR, concorden amb les d'altres estudis on a més de sang de cordó³⁶³, també es va obtenir mostra de la gestant ja sigui durant el treball de part^{166,308,364} o just després³⁶⁵.

Elevades concentracions de cobalamina i HoloTC en el cordó, poden estar relacionades amb una absorció més lenta de la cobalamina, probablement conseqüència d'una menor expressió o activitat del receptor³⁵⁶. Les concentracions de cobalamina trobades en els cordons de l'estudi NutCIR, són més elevades que les d'altres estudis europeus, del Regne Unit³⁶⁰, dels Països Baixos³³⁴ o d'Alemanya¹⁶⁶, o fora d'Europa, del Caire³⁴¹, Turquia³²⁷ o Brasil³⁵³. En tots aquests estudis però, les concentracions sèriques de les gestants també eren més baixes que les presents en les gestants de l'estudi NutCIR.

Els folats passen de la mare a la circulació fetal⁶⁹⁴, fent que la concentració en el cordó sigui 2-3 vegades major que la present en les gestants^{327,353,695}. Aquest fet es reafirma en la comparació de les concentracions de folats part-cordó de l'estudi NutCIR.

En comparar les concentracions de tHcy de les gestants en el moment del part, els estudis fets a Nord Amèrica presenten concentracions més baixes respecte els estudis europeus⁶⁹⁶, segurament per la fortificació obligatòria amb àcid fòlic. En l'estudi NutCIR tant les gestants com els cordons presenten concentracions més baixes que les presents en estudis europeus realitzats a Noruega³⁶⁹, els Països Baixos⁶⁹⁷ o Irlanda³⁶⁵. En analitzar la possibilitat que aquests estudis tinguin un percentatge de gestants no suplementades amb àcid fòlic, més elevat que el present en les gestants de l'estudi NutCIR (3%), s'observa que l'estudi neerlandès no dona informació sobre la suplementació, l'irlandès tot i comentar que les dones acostumen a prendre suplementes amb ferro i 400 µg d'àcid fòlic, no donen dades de consum, i el noruec indica que el 63% de les mares no van prendre suplementes en cap moment de l'embaràs, corroborant un major percentatge de mares no suplementades respecte l'estudi NutCIR. L'estudi PreC³⁶⁴ analitza les concentracions de tHcy dividint a les gestants, reclutades a la mateixa província que l'estudi NutCIR, en dos grups segons si s'han o no suplementat al llarg de l'embaràs. Comparant les gestants suplementades de les no suplementades entre els dos estudis, s'observa que les concentracions de tHcy de l'estudi NutCIR, tant de les gestants al part com dels cordons són més baixes. Una explicació a aquests resultats podria ser que la suplementació a l'estudi PreC, no va començar en cap gestant abans del segon trimestre, fent que la suplementació no hagi pogut arribar a disminuir les concentracions de tHcy com en l'estudi NutCIR. També cal considerar que en l'estudi NutCIR el grup de les gestants no suplementades inclou embarassades amb una suplementació irregular, mentre que en l'estudi PreC, la no suplementació és estricta, fent que les concentracions de tHcy puguin ser més elevades en no rebre cap tipus de suplement.

Les concentracions trobades de MMA plasmàtic tant en les gestants en el moment del part com en els cordons, són semblants a les presents en altres estudis^{308,339,363,369}. Les elevades concentracions en el cordó podrien ser conseqüència d'una baixa taxa d'eliminació. No obstant, poden ser resultat d'una adaptació general del nou-nat a la vida extrauterina, en la que les activitats de molts enzims estan sota pressió i de forma independent, han de satisfer l'alta taxa metabòlica durant la vida postnatal³⁵⁶. Davant de gestants majoritàriament no deficients en cobalamina, com són les de l'estudi NutCIR, les elevades concentracions de MMA trobades en els cordons respecte els valors de les gestants, semblen un fet comú en el desenvolupament fetal.

Tot i la millora de l'activitat lipolítica del teixit adipós matern en l'últim trimestre de la gestació, s'ha comprovat com el substrat que travessa la placenta en major mesura és la glucosa seguida per els aminoàcids⁶⁹⁸, mentre que els àcids grassos i el glicerol només travessen la barrera placentària en petites proporcions⁶⁹⁹. Tot i la manca de

transferència placentària directa de triglicèrids, els àcids grassos essencials derivats de la dieta materna, han d'estar disponibles pel fetus. L'habilitat de que aquests àcids grassos presents en els triglicèrids plasmàtics materns passin al fetus, es dona per la presència de receptors de lipoproteïnes³⁶⁷ i activitats lipasa³⁶⁸ en la placenta. A més els àcids grassos lliures en la circulació materna també travessen la placenta⁷⁰⁰. El conjunt d'aquests fets podria ser també una de les explicacions de les elevades concentracions de MMA trobades en el cordó, suggerint que aquestes concentracions no estarien associades amb casos de deficiència en cobalamina. El greix constitueix aproximadament el 50% del valor calòric total de la llet humana⁷⁰¹, els triglicèrids corresponen al major component lipídic tant en el calostre com en la llet madura⁷⁰². La inducció de l'activitat lipogènica en les glàndules mamàries no es dona fins després del part i, per tant, els lípids del calostre han de provenir de la circulació materna. Aquesta seria una possible explicació als resultats de diferents estudis que mostren com contràriament a les concentracions materns després del part, la concentració de MMA en els nounats augmenta^{355,369}. Són necessaris més estudis per tal d'establir l'òptim punt de tall de MMA per tal de minimitzar els falsos negatius i positius, i predeterminar si els pacients amb deficiència en cobalamina es poden detectar a través d'un cribatge del nounat fet entre les 48-72 hores postpart⁷⁰³.

Efecte de la suplementació

L'ús de suplementes durant l'embaràs, és cada vegada més freqüent a causa del creixement del mercat de les preparacions de multivitamínics dirigides a les gestants. La SEGO⁶⁵⁷ recomana un consum de 400 µg diaris d'àcid fòlic fins acabar el primer trimestre d'embaràs. No obstant la majoria de preparacions prenatales al mercat espanyol contenen, a més dels 400 µg d'àcid fòlic, dosis baixes d'altres vitamines i minerals, entre ells 2 µg de CNCbl. No hi ha evidència de si suplementar amb una dosi tan petita de cobalamina, pot afectar l'estat en cobalamina durant l'embaràs i al cordó, sobretot en gestants amb un bon estat en cobalamina. En l'estudi NutCIR s'ha investigat si el consum d'aquests 2 µg de CNCbl, afecta els biomarcadors plasmàtics d'estat en cobalamina. El 92% de les participants van utilitzar suplementes prenatales durant el primer trimestre d'embaràs. Es van identificar dos patrons de suplementació, regular o irregular/no suplementació. No hi va haver suficients gestants que declararessin no suplementar-se per tractar-les com una categoria apart. A partir dels 4 mesos l'ús regular de suplementes es va donar en el 56% de les gestants.

Globalment, l'ús regular de suplementes multivitamínics s'associa amb un millor estat en cobalamina, basat en concentracions plasmàtiques més elevades de cobalamina i HoloTC,

i una raó HoloTC/Cbl més elevada respecte al no ús o ús irregular de suplementos. No observar diferències entre els dos patrons de suplementació a les 15 setmanes, podria ser conseqüència del consum de suplementos durant el primer trimestre per la majoria de les gestants. Aquestes dades demostren que independentment de l'estat en cobalamina de la gestant, la suplementació amb dosis baixes de cobalamina reforça tant l'estat en cobalamina durant l'embaràs, com en el cordó. Les concentracions de MMA no estan afectades per la suplementació en cap moment de l'embaràs ni al cordó. Apart de la baixa dosi de cobalamina en els suplementos, donat que les concentracions de MMA plasmàtiques no indiquen deficiència de forma global en l'estudi NutCIR, no s'esperaria que la suplementació influís en les concentracions de MMA.

Tot i que la suplementació regular amb àcid fòlic s'associa amb un estat global més elevat en folats, respecte al no ús o ús irregular de suplementos durant l'embaràs, i s'associa de forma independent amb la reducció de tHcy en tots els punts, s'observa que la tHcy augmenta a finals de l'embaràs en els 2 patrons de suplementació. Aquest fet corrobora observacions en estudis previs, que l'augment de la concentració de tHcy al final de la gestació no s'explica del tot per el dèficit en folats^{364,704}.

Diferents estudis d'intervenció han mostrat la necessitat de dosis més elevades que les preses per les gestants de l'estudi NutCIR, tant de cobalamina com d'àcid fòlic per tal de mantenir de manera més o menys transitòria, concentracions de cobalamina semblants a les presents fora de l'embaràs^{310,348}. En comparar l'estat en els diferents biomarcadors, durant l'embaràs i en el cordó, entre les gestants suplementades de forma regular i les que ho van fer de forma irregular o no es van suplementar, en l'estudi NutCIR s'observa que la suplementació regular amb àcid fòlic i petites dosis de cobalamina, milloren l'estat en cobalamina i folats, tot i no arribar a les concentracions presents fora de l'embaràs, tant en les gestants com en els cordons dels seus nounats.

Efecte de l'estat de cobalamina a l'inici de la gestació

Tot i que les necessitats de cobalamina durant l'embaràs, en principi queden cobertes en les embarassades no vegetarianes i sense alteracions en l'absorció, un baix estat en aquesta vitamina pot portar a les gestants a tenir problemes per proporcionar-ne suficient quantitat al fetus^{327,330}.

Donat que s'esperaria que l'evolució dels marcadors funcionals d'estat en cobalamina, especialment el MMA i la tHcy, durant l'embaràs variés segons les reserves en cobalamina de la gestant, en l'estudi NutCIR es van categoritzar les gestants per estat

en cobalamina a principis d'embaràs, per tal de diferenciar entre les fluctuacions conseqüència dels canvis fisiològics i endocrins propis de l'embaràs, i les conseqüents a l'estrès de les reserves maternes. S'observa com les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, mantenen durant tot l'embaràs un pitjor estat en cobalamina i HoloTC, respecte les gestants dels altres tercils, i a més presenten concentracions més elevades tant de MMA, tot i no arribar a una concentració mitjana indicativa de deficiència en cobalamina, com de tHcy. Seguint la mateixa tendència, els cordons dels nounats d'aquestes gestants, també presenten un pitjor estat en cobalamina i HoloTC, i majors concentracions de MMA i tHcy, respecte les dels nounats de les gestants del tercil mig-alt.

En les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, a partir de les 24-27 setmanes, les concentracions d'HoloTC no mostren diferències respecte al primer trimestre. Davant d'un baix estat en cobalamina, l'HoloTC resisteix la disminució de la seva concentració, fet que no s'observa en un millor estat en cobalamina. En un estudi realitzat a Dinamarca⁷⁰⁵ amb 27 gestants, s'observa com la concentració d'HoloTC en el segon (mediana [rang] pmol/L: 53 [20-91]) i tercer (60 [21-116]) trimestres, 24 i 36 setmanes de gestació respectivament, no varia respecte l'inici de l'embaràs, 13 setmanes (56 [19-190]). A més de que l'anàlisi es va realitzar amb un petit nombre de gestants, cal considerar que l'estat en cobalamina d'aquestes gestants era pitjor que el present en l'estudi NutCIR. La concentració d'HoloTC a les 13 setmanes equival a la mediana present a les 24-27 setmanes en l'estudi NutCIR, moment en el que deixen d'haver-hi diferències respecte al primer trimestre en les gestants amb pitjor estat en cobalamina.

Les concentracions de la raó HoloTC/Cbl no presenten diferències en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, respecte la resta, però a nivell de cordó els seus nounats sí que tenen una concentració menor respecte els de les gestants del tercil mig-alt. Tot i que durant l'embaràs sembla que la raó HoloTC/Cbl no es veu influïda per l'estat en cobalamina al principi de la gestació, sí que s'observa que les mares en millor estat, proporcionen als seus nounats major concentració de cobalamina que serà disponible a nivell cel·lular.

Com s'ha comentat anteriorment, l'estat elevat en MMA en els cordons respecte a les gestants, s'ha observat en altres estudis d'embaràs fets a Europa^{308,339,356}. En l'estudi NutCIR en fer el seguiment tant de les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix en cobalamina, com les que ho fan en els altres tercils, s'observa que el MMA del cordó sempre està més elevat que el de la gestant. No obstant, les concentracions

plasmàtiques de MMA en el cordons dels nounats nascuts de gestants que comencen l'embaràs al tercil baix en cobalamina, són un 16% més elevades que les que corresponen amb les mares dels altres tercils. Per tant en aquest grup, part de l'augment en MMA al cordó respecte a la gestant, podria ser conseqüència al baix estat en cobalamina.

Respecte a la tHcy, tot i ser inferior al cordó respecte a la gestant com ja s'ha observat en estudis anteriors³⁶⁴, és un 15% més elevat, quan s'associa amb embarassades que inicien la gestació al tercil baix en cobalamina, respecte les gestants que ho fan en els altres tercils. Es confirma la importància de l'estat en cobalamina de la gestant al principi de l'embaràs, sobre l'estat en cobalamina del nounat observada en altres estudis, com el de Guerra-Shinohara i col·laboradors³⁵³, que analitzant 69 gestants i els seus nounats van observar que, les concentracions de tHcy eren majors en els cordons dels nounats de les mares amb un baix estat en cobalamina plasmàtica ($\leq 133,54$ pmol/L) al final de l'embaràs, respecte els nounats de les mares amb un millor estat en cobalamina. Els autors suggereixen el risc que comporta pel nounat l'associació d'aquests fets, tant a la dificultat per metabolitzar la Hcy, com a possibles problemes en el desenvolupament cognitiu dels nounats.

La falta d'interacció entre l'ús regular de suplementes amb cobalamina i el temps de gestació, en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, mostra que les concentracions plasmàtiques en els biomarcadors de cobalamina, no varien en funció de la pauta de suplementació. Aquest fet podria ser conseqüència de que 2 µg/dia de cobalamina, no fossin suficients per millorar l'estat global en cobalamina d'aquest grup, davant l'estrès fisiològic de l'embaràs. No obstant, l'estudi NutCIR és observacional, i no permet descartar que el nombre reduït de participants al tercil baix en cobalamina, combinat amb la variabilitat en l'ús de suplementes dins d'aquest grup, pogués explicar la falta d'associació entre l'estat en cobalamina i la suplementació.

Influència genètica

Per investigar la influència de gens que intervenen en el metabolisme o transport de la cobalamina, sobre les concentracions plasmàtiques en els biomarcadors de cobalamina, en l'estudi NutCIR es van analitzar les concentracions plasmàtiques d'aquests biomarcadors separant les gestants, i els cordons dels seus nounats, amb el genotip homozigot mutant de la resta de genotips del polimorfisme. En els polimorfismes que no s'observaven diferències entre els dos grups, es va tornar a fer la mateixa anàlisi però considerant només les gestants que van començar l'embaràs al tercil baix en cobalamina.

Per evitar problemes de falta de potència estadística, els polimorfismes amb freqüències d'homozigots mutants < 12% no es van analitzar. Els polimorfismes analitzats van ser *TCII 776C>G*, *MTHFR 677C>T*, *MTRR 66A>G* i *MTRR 524C>T*.

En un estudi fet a Espanya⁷⁰⁶ en el que es va analitzar la freqüència del genotip *MTHFR 677TT* en 652 nounats de diferents comunitats autònomes, es va observar que a Catalunya la freqüència del genotip *MTHFR 677TT* era del 15%, considerant com a estimació del valor del global d'Espanya una freqüència que oscil·laria entre el 9,5-14,9%. En l'estudi NutCIR la freqüència del genotip *MTHFR 677TT* en les gestants és del 18,1% i en els nounats arriba fins al 19,5%.

El polimorfisme *MTHFR 677C>T* es caracteritza per una activitat enzimàtica reduïda^{453,454}. La combinació d'estat baix en folats i el genotip *MTHFR 677TT*, s'associa amb elevada tHcy respecte els altres genotips del polimorfisme⁴⁷⁰. Riscs associats al genotip *MTHFR 677TT* com els avortaments de repetició o els DTN, es redueixen davant la suplementació preconcepciva amb àcid fòlic^{472,473}. Tot i no ser de forma global deficientes en folats, les gestants de l'estudi NutCIR amb el genotip *MTHFR 677TT*, tenen major tHcy al llarg de tot l'embaràs i al cordó, respecte els altres genotips del polimorfisme. Aquest fet corrobora el resultat d'un estudi fet a Korea amb 117 gestants, amb embarassos normals i una freqüència de *MTHFR 677TT* del 17,5%, en el que es va observar, en l'única mostra recollida, a les 24-28 setmanes, que tot i presentar un bon estat en folats, les gestants amb genotip *MTHFR 677TT* presentaven concentracions majors de tHcy respecte els altres genotips⁷⁰⁷. Tot i disposar d'un bon estat en folats la disminució de l'activitat enzimàtica produïda per el genotip *MTHFR 677TT*, fa necessària una major concentració de folats per compensar el defecte enzimàtic, tant en les gestants com en els seus nounats.

L'ús regular de suplementes amb àcid fòlic en presència de *MTHFR 677TT*, tan sols frena la disminució en folat plasmàtic a les 15 setmanes. Tot i no haver-hi diferència en l'estat en folats entre els diferents genotips del polimorfisme, la tHcy es manté més elevada en els homozigots, inclús en presència de la suplementació regular amb àcid fòlic. Aquest fet podria suggerir que la presència del genotip *MTHFR 677TT* no permet aprofitar l'aportació de la suplementació amb àcid fòlic, considerant que en la resposta a la suplementació també hi pot haver un component genètic.

Hi ha estudis que relacionen la presència del genotip *MTHFR 677TT* amb el risc de preeclàmpsia^{479,480} i síndrome de Down⁴⁸⁵. Aquesta relació però està en controvèrsia, ja que no s'ha pogut demostrar en tots els casos^{482,486}. A causa de la presència en l'estudi

NutCIR de només 8 casos preeclàmpsia (1,7%) i 2 síndromes de Down (0,4%), no es va poder investigar aquesta relació. Respecte altres estudis realitzats a Espanya, s'observa que mentre en un estudi fet a Astúries⁷⁰⁸, el nombre de casos de síndrome de Down (0,3%), és semblant als de l'estudi NutCIR, la incidència de preeclàmpsia en un estudi fet a Barcelona⁷⁰⁹ (7,4%) és major.

El polimorfisme *MTRR* 66A>G⁵³² pot disminuir l'activitat de la MS, que utilitza la cobalamina com a cofactor en la remetilació de la Hcy. Hi ha però discrepàncies en la seva relació amb les concentracions de tHcy. Es troben estudis, realitzats fora de l'embaràs, on la presència del polimorfisme augmenta la seva concentració⁵²⁴, i d'altres, on no hi ha cap tipus d'associació⁵²⁵. La designació de quin és l'al·lel que implica el risc tampoc és concloent. La freqüència del genotip *MTRR* 66GG en les gestants de l'estudi NutCIR (25,8%) és semblant al present en les gestants (24,7%) en un estudi fet a Espanya, on s'analitzaven les freqüències de 190 parelles mare-nounat, de diferents comunitats autònomes. El genotip és més freqüent en els cordons dels nounats de l'estudi NutCIR (27,9%), que en els de l'estudi de les diferents comunitats autònomes (20,1%)⁷¹⁰.

Ni l'estat en cobalamina plasmàtica ni el patró de canvis durant l'embaràs, varia en l'estudi NutCIR entre els diferents genotips del polimorfisme *MTRR* 66A>G. En presència del genotip *MTRR* 66GG, les concentracions d'HoloTC a partir de les 34 setmanes ja no són inferiors a les inicials. Al principi de l'embaràs s'observa una major tHcy en presència del genotip *MTRR* 66GG, respecte els altres genotips del polimorfisme. La menor concentració de MMA en presència del genotip *MTRR* 66GG respecte els altres genotips, a les 15 setmanes, és un fet aïllat en el comportament d'aquest marcador bioquímic que podria considerar-se un artefacte per les fluctuacions pròpies de l'embaràs. També cal considerar que malgrat adoptar un nivell de significació del 5% per mantenir l'error alfa o tipus I en el nivell convencional existeix el risc de falsos positius, entesos com a resultats significatius que no corresponen a veritables associacions.

Com el polimorfisme *MTRR* 66A>G, tot i que menys estudiat, el *MTRR* 524C>T pot disminuir l'activitat de la MS. Per aquest fet en molts estudis s'analitzen els dos polimorfismes conjuntament^{537,542}. La freqüència de *MTRR* 524TT en les gestants de l'estudi NutCIR (13%), és semblant a la trobada en un estudi fet a Irlanda⁵³¹, on s'analitzava la possible associació entre polimorfismes relacionats amb la MSR i els DTN, i on les embarassades control, sense antecedents de DTN, presentaven una freqüència de *MTRR* 524TT del 15%. Només en considerar les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, s'observa que en la segona meitat de l'embaràs, les

concentracions de MMA són majors en presència del genotip *MTRR* 524TT, respecte els altres genotips. La presència d'aquest genotip podria facilitar l'inici d'una deficiència marginal de cobalamina, en les gestants que comencen l'embaràs en un estat subòptim de cobalamina. Tant la falta de potència com el fet que les concentracions de cobalamina del tercil baix (≤ 316 pmol/L), no s'associïn a deficiències importants en cobalamina, podrien dificultar la detecció de més associacions entre la presència del genotip *MTRR* 524TT i els diferents biomarcadors. Les concentracions d'HoloTC i MMA no són diferents en cap punt de l'embaràs respecte al primer trimestre, però les tendències observades inicialment es mantenen, disminució de les concentracions d'HoloTC i augment de les de MMA. Aquest fet podria ser causa d'una resposta al defecte enzimàtic, produït per la presència del genotip *MTRR* 524TT, per tal de mantenir les concentracions d'HoloTC, i que es reflectiria en l'atenuació de l'augment de les concentracions de MMA. Tot i així, s'associaria a una etapa molt inicial d'aquesta resposta, ja que es manté la disminució en la concentració de cobalamina, i l'augment en la concentració de tHcy al final de l'embaràs respecte al primer trimestre. Cal considerar també l'opció que no s'observin diferències en l'HoloTC i el MMA per falta de potència estadística, com causa del petit nombre gestants amb genotip *MTRR* 524TT i a les petites fluctuacions en les concentracions al llarg de l'embaràs.

No s'observa una relació consistent entre l'ús de suplementos i les fluctuacions en els diferents indicadors d'estat en cobalamina, entre els diferents genotips del polimorfisme *MTRR* 66A>G i *MTRR* 524C>T. Podria ser necessari un estat deficient en cobalamina per poder observar una resposta a la suplementació.

En el global dels estudis consultats en relació al polimorfisme *TCII* 776C>G (**Taula 11 i 12**), s'observa que la freqüència del genotip *TCII* 776GG oscil·la entre el 12-26%, rang que inclou la freqüència (19%) present en les gestants de l'estudi NutCIR. Hi ha discrepàncies sobre l'efecte del polimorfisme *TCII* 776C>G en les concentracions de cobalamina. S'ha proposat que aquest polimorfisme s'associa amb una menor afinitat de la *TCII* per la cobalamina⁴²¹, conseqüència d'una reducció d'HoloTC i de menys cobalamina disponible als teixits. Una segona opció suggereix que la presència del genotip 776GG podria afectar l'afinitat de la *TCII* pel seu receptor, fet que disminuiria el pas de l'HoloTC als teixits donant un augment de la seva concentració^{420,422}.

En cap dels biomarcadors analitzats al llarg de l'embaràs, les concentracions observades difereixen en presència del genotip *TCII* 776GG, respecte els altres genotips. La falta d'efecte del genotip *TCII* 776GG sobre les concentracions de tHcy, es corrobora per altres estudis fets tant en dones d'edat fèrtil⁴²⁶ com en dones de 40-88 anys⁴²¹. Però en

considerar només les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica (≤ 316 pmol/L), s'observa una major concentració de tHcy als cordons dels nounats de les gestants amb el genotip *TCII 776GG*, respecte els altres genotips del polimorfisme. No obstant, a la segona meitat de l'embaràs, en presència del genotip *TCII 776GG* s'observa una resistència a la disminució en la concentració d'HoloTC. Per considerar l'opció d'una disminució de l'afinitat de l'HoloTC pel seu receptor, esperaríem trobar concentracions majors de tHcy i/o MMA en presència del genotip *TCII 776GG*. És possible que la relació entre el genotip i els marcadors funcionals d'estat en cobalamina, només sigui evident en casos de deficiència.

Tot i que podrien ser necessàries concentracions menors de cobalamina per observar diferències a causa de la presència del genotip *TCII 776GG*, els resultats de l'estudi NutCIR mostren la repercussió que pot tenir sobre el nounat la presència d'aquest genotip en la gestant. Així els nounats de les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix en cobalamina i presenten el genotip *TCII 776GG*, tenen concentracions més elevades de tHcy al cordó, que els nounats de gestants amb baix estat en cobalamina però genotips *TCII 776CC+CG*.

Com en els polimorfismes del gen *MTRR* la interacció de l'ús de suplement i el temps de gestació entre les diferents genotips del polimorfisme *TCII 776C>G* no és consistent. Podria ser necessari un estat deficient en cobalamina per poder detectar l'efecte de la suplementació.

Factors predictius dels canvis al llarg de l'embaràs

Per investigar la contribució de factors nutricionals, genètics i d'estil de vida en les fluctuacions dels diferents indicadors d'estat en cobalamina al llarg de l'embaràs, es van dissenyar diferents models de regressió lineal múltiple.

Les gestants de l'estudi NutCIR que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina no aconsegueixen, tot i reduir la disminució de les concentracions de cobalamina, millorar el seu estat, i a més presenten concentracions majors de MMA que les gestants que comencen l'embaràs al tercil mig-alt. Aquest fet suggereix que el MMA més elevat no és tan sols conseqüència del procés fisiològic de l'embaràs⁶⁹³, sinó que també està relacionant amb un estat inferior en cobalamina. En relació a la suplementació, 2 µg de cobalamina no serien suficient per exercir canvis en les concentracions dels indicadors d'estat en cobalamina, excepte en la tHcy. L'augment característic de finals d'embaràs en tHcy, és menor en les gestants que es suplementen de forma regular amb àcid fòlic

durant els mesos 4-7. L'estat inicial de cobalamina en començar l'embaràs, per la cobalamina i el MMA, i la suplementació, per la tHcy, són els dos factors decisius en els canvis que es donen en aquests indicadors bioquímics, analitzats al llarg de l'embaràs.

Factors predictius de tHcy i MMA en cada punt de l'embaràs i en el cordó

En investigar els factors predictius de les concentracions de tHcy a cada extracció s'observa, que a més de l'associació inversa de la suplementació amb la tHcy, tant la presència del genotip *MTHFR* 677TT, com de *MTRR* 66GG, s'associen amb un augment de tHcy. La disminució de les concentracions de tHcy associada a l'augment en la concentració de cobalamina, també es fa palesa en augmentar les concentracions d'HoloTC.

Tant la cobalamina com l'HoloTC s'associen de forma inversa amb la tHcy al llarg de l'embaràs i al cordó. El genotip *MTHFR* 677TT, s'associa amb un augment de tHcy respecte els altres genotips del polimorfisme durant tot l'embaràs, sobretot a partir de les 34 setmanes moment en el que les gestants tenen pitjor estat en folats, i en el cordó. Aquests resultats mostren com de forma contrària al que va observar Powers i els seus col·laboradors⁷¹¹ en 30 gestants amb embarassos normals i suplementades amb àcid fòlic, en les que la presència del genotip *MTHFR* 677TT no s'associava a majors concentracions de tHcy, en l'estudi NutCIR tot i que el 97% de les gestants prenen suplementos prenatals, la presència del genotip *MTHFR* 677TT sí que influeix sobre les concentracions de tHcy. La suplementació regular amb àcid fòlic redueix les concentracions de tHcy sobretot en la segona meitat de l'embaràs, i al cordó. El menor efecte de la suplementació en la primera meitat de l'embaràs podria ser conseqüència d'una baixa variabilitat, a causa de que la majoria de gestants es suplementen en aquest període. El genotip *MTRR* 66GG s'associa, al principi de l'embaràs, amb un augment de tHcy respecte els altres genotips del polimorfisme.

Limitant l'anàlisi a les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, els dos factors més influents sobre les concentracions de tHcy continuen sent la presència del genotip *MTHFR* 677TT i, l'ús regular de suplementos d'àcid fòlic, a més es confirma l'associació amb majors concentracions de tHcy, en els cordons de les gestants amb el genotip *TCII* 776GG, i la no associació del genotip *MTRR* 524TT amb les concentracions de tHcy, ni en l'embaràs ni en el cordó.

En analitzar els factors predictius dels canvis en les concentracions de MMA en cada extracció, s'observa que tant la cobalamina com l'HoloTC s'associen de forma inversa amb el MMA a finals de l'embaràs i al cordó. Limitant l'anàlisi a les gestants que

comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina s'observa a més, que el genotip *MTRR* 524TT s'associa a majors concentracions de MMA, respecte els altres genotips, al primer trimestre. En analitzar l'estat en MMA entre les variants del genotip, s'observava que les majors concentracions de MMA es donaven al segon trimestre. El model de regressió permet estudiar la relació tenint en compte l'estat en cobalamina. En el model ajustat per la cobalamina plasmàtica s'observa que el genotip *MTRR* 66GG s'associa de forma inversa amb el MMA en el cordó. Aquesta relació no era evident en contrastar el MMA plasmàtic entre les variants en l'anàlisi bivariant. S'ha suggerit que l'efecte del polimorfisme *MTRR* 524C>T podria està relacionat amb la presència del polimorfisme *MTRR* 66A>G⁵³⁷. En incloure els dos polimorfismes de forma conjunta, a més d'un baix estat en cobalamina, es podrien mostrar associacions que per separat no s'observarien.

Factors predictius dels valors dels indicadors bioquímics cordó

Un bon estat en cobalamina al principi de l'embaràs i la suplementació regular, s'associen amb un estat més elevat en cobalamina al cordó. A més el genotip *MTHFR* 677TT s'associa amb un augment de tHcy, confirmant el fet que la presència de l'al·lel 677T disminueix l'activitat de l'enzim MTHFR amb el resultat d'un augment de tHcy⁴⁸⁴.

Les majors concentracions de MMA i tHcy mostren, com l'estat en cobalamina és pitjor en els cordons dels nounats de les mares que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, respecte els nounats de les mares dels altres tercils. Es demostra així la importància, pel nounat, de l'inici de l'embaràs amb un bon estat en cobalamina.

En el cordó s'observa com la suplementació amb 2 µg de cobalamina de forma regular durant els mesos 4-7, afavoreix l'augment de les concentracions de cobalamina i HoloTC i la menor concentració de tHcy. La suplementació regular amb cobalamina en les gestants afavoreix l'estat en cobalamina dels seus nounats.

Factors de risc per complicacions en l'embaràs

En l'embaràs l'estat baix amb cobalamina s'ha relacionat amb l'augment del risc de CIR³³³ i amb una predisposició tant de les gestants com dels seus nounats a l'adipositat excessiva i a la resistència a la insulina^{222,336,712}. La hipertensió gestacional s'ha relacionat amb l'hiperhomocisteïnèmia⁷¹³. En l'estudi NutCIR es va investigar, amb anàlisis de regressió logística, si l'estat en cobalamina i dels polimorfismes que afecten el seu metabolisme, s'associen amb aquestes tres complicacions de l'embaràs.

Dels models dissenyats, només el de CIR explica de forma significativa el risc global de desenvolupar aquesta complicació de l'embaràs. Ni l'estat en cobalamina ni l'ús regular de suplementos prenatals s'associen al risc de CIR, no obstant, la presència del genotip *TCII 776GG* en al gestant triplica el risc de CIR. Ser fumadora durant tot l'embaràs s'associa amb la mateixa magnitud de risc. L'associació entre fumar i el risc de CIR està ben establerta^{714,715,716}.

En l'estudi NutCIR no es va observar cap associació entre l'estat en cobalamina i l'ús regular de suplementos amb el risc de cap de les complicacions estudiades. L'associació entre estat en cobalamina matern i la resistència a la insulina observada en estudis previs^{336,712} va ser en dones amb pitjor estat en cobalamina (< 150 pmol/L) que les de l'estudi NutCIR. En un estudi realitzat als Països Baixos³³⁴ on el valor de mediana [interval de confiança 95%] de cobalamina d'aquesta població era 179 [134-219] pmol/L no es va trobar relació entre l'estat de cobalamina i el pes al néixer. Aquests valors són inferiors als presents al tercil baix de cobalamina 189 [181-198] pmol/L, a l'estudi NutCIR.

En els resultats de les regressions s'ha de considerar el limitat nombre d'embarassos que es podien incloure en cada model: CIR 39/499 (7,8%), diabetis gestacional 33/483 (6,8%), i hipertensió 29/480 (6,0%). Aquest fet pot haver dificultat, per falta de potència estadística, l'observació d'associacions entre les complicacions analitzades i l'estat en cobalamina. En comparar la incidència d'aquestes tres complicacions, s'observa que en una revisió sobre estats hipertensius en l'embaràs⁷¹⁷, la incidència d'hipertensió és la mateixa que en l'estudi NutCIR. En relació a la diabetis gestacional, en un estudi realitzat a Barcelona⁷⁰⁹, el percentatge de gestants amb aquesta complicació és del 8,2%. En la incidència de CIR és on s'observen valors més dispersos, en un estudi realitzat a Barcelona⁷¹⁸ on es van analitzar 7645 embarassos, la incidència de CIR és del 12,6%.

Factors de risc de les gestants amb baix estat en cobalamina

L'estat en cobalamina durant el primer trimestre de l'embaràs, podria ser provisionalment inferior al típic per una gestant, si pateix nàusees/vòmits. Aquestes molèsties són transitòries i característiques del principi de l'embaràs. No està clar que es pugui recuperar l'estat en cobalamina en desaparèixer aquests símptomes. Independentment de si l'estat inicial en cobalamina és atípic o no, un altre factor que pot millorar-lo és l'ús regular de suplementos amb CNCbl. En l'estudi NutCIR es van investigar els factors que podien contribuir al risc d'acabar l'embaràs en un estat baix en cobalamina.

Com es comença l'embaràs determina en gran mesura, la manera en el que aquest acabarà. L'inici de l'embaràs al tercil baix de cobalamina, HoloTC o al tercil alt de MMA, augmenten 10, 19 i 8 vegades respectivament el risc d'acabar l'embaràs en el mateix tercil. En la mateixa línia començar l'embaràs amb una deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, augmenta 11 vegades els risc de finalitzar l'embaràs de la mateixa forma.

Un millor estat socioeconòmic familiar i la suplementació regular amb cobalamina al final de l'embaràs redueixen en un 42% i 66% respectivament, el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix de cobalamina plasmàtica. Fumar al final de l'embaràs duplica el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix d'HoloTC. La presència del genotip *TCII* 776GG en la gestant, duplica el risc d'acabar l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, respecte els altres genotips del polimorfisme.

Factors de risc per les gestants amb baix estat en cobalamina i alt en folats

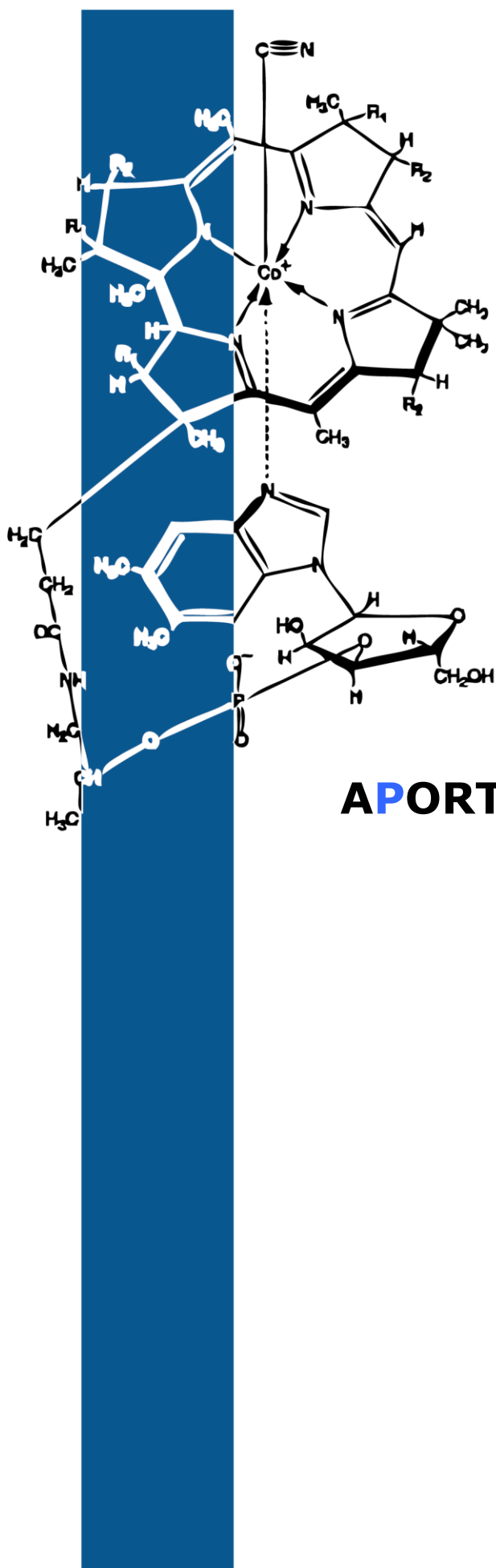
A Espanya les polítiques oficials de suplementació amb àcid fòlic, per la prevenció de defectes del tub neural, i les campanyes informatives als professionals van començar el 2001⁶⁰³. Tot i que la majoria de les dones prenen àcid fòlic quan saben que estan embarassades, el percentatge de dones que el prenen abans de l'embaràs és encara molt baix⁶⁰⁴.

La fortificació obligatòria ha aportat millores en l'estat nutricional en folats i es considera un dels mètodes més eficaços per aconseguir fer arribar la quantitat recomanada d'ingesta d'àcid fòlic a la població diana^{607,608,609}. Però en països on és vigent, s'ha observat que la prevalença d'elevades concentracions en folat sèric ha augmentat. Un dels efectes causants és la combinació de la ingesta de diferents suplementes.

A Europa diferents països entre els quals trobem Turquia, França, Àustria, Itàlia i el Regne Unit, s'han interessat per la fortificació obligatòria, però és un tema candent, encara en debat, no per falta d'evidències de la seva eficàcia sinó per les conseqüències col·laterals d'aquesta fortificació.

Amb les dades obtingudes en l'estudi NutCIR, s'observa que l'inici de l'embaràs amb un baix estat en cobalamina i elevat en folats, respecte l'inici d'un baix estat en cobalamina però mig-baix de folats, s'associa amb concentracions plasmàtiques més elevades de MMA, indicant un agreujament de l'estat en cobalamina en aquestes gestants. En els països amb fortificació obligatòria aquest fet es pot agreujar. S'ha observat que els

nounats que presenten riscos més accentuats de patir l'adipositat excessiva i a la resistència a la insulina, són els procedents de mares que a més de baix estat en cobalamina, presenten elevat estat en folats^{222,336}. La possibilitat d'una cofortificació àcid fòlic-cobalamina es planteja com a una possibilitat de reduir més el risc de DTN davant una exclusiva fortificació amb àcid fòlic³⁹⁶, però només s'ha analitzat fora de l'embaràs que en individus amb baixes concentracions en cobalamina, elevades concentracions de folats s'associen a un empitjorament de les conseqüències metabòliques, com augments més important tant de tHcy com de MMA. Elevades concentracions de folats poden ser precursoras de l'exacerbació de les manifestacions clíniques pròpies de la deficiència en cobalamina^{220,221,222}.



APORTACIONS DE LA TESI

APORTACIONS DE LA TESI

En el nostre estudi de la població, sense cap influència de suplementació, més de la meitat dels individus deficientes en folats es troben entre els 18-44 anys. Del 31% d'individus amb deficiència marginal en cobalamina o HoloTC, el 13% també estan en aquest grup d'edat. La gent gran és la que presenta més prevalença de deficiència en cobalamina i també en HoloTC, són els individus amb millor estat en folats però també amb les concentracions més elevades de tHcy, que podria ser conseqüència del procés d'envelliment.

En el nostre estudi d'embaràs, respecte al primer trimestre, hi ha un empitjorament de l'estat en cobalamina que es manté durant tot l'embaràs. En l'últim trimestre, però, la tendència a disminuir de la cobalamina plasmàtica és menys accentuada i, l'HoloTC s'estabilitza. En aquesta última part de l'embaràs és quan hi ha les concentracions plasmàtiques més elevades de MMA i tHcy de tot l'embaràs. La tHcy pot estar influïda per la disminució gradual de folats, i el MMA per la millora de l'activitat lipolítica del teixit adipós, però el nostre estudi demostra que la reducció de l'estat en cobalamina també contribueix a l'augment dels dos marcadors.

En el cordó, respecte les concentracions de la gestant al part, les concentracions plasmàtiques de cobalamina, HoloTC, folats i MMA són més elevades, però la tHcy és menor. Tenir la cobalamina i l'HoloTC plasmàtica més elevades podria estar relacionat amb una absorció més lenta de la cobalamina, possible conseqüència d'una menor activitat del receptor. L'elevat MMA podria ser causa d'una baixa taxa d'eliminació, o resultat d'una adaptació general del nounat a la vida extrauterina.

No hem observat que l'HoloTC, respecte la cobalamina, sigui un marcador més sensible als petits canvis d'estat en cobalamina, conseqüència de l'ús diari de suplementes amb 2 µg de CNCbl. Aquesta pauta s'associa amb un estat més elevat en cobalamina, tant en la gestant com en el cordó del nounat.

Les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, mantenen durant tot l'embaràs i també en els cordons dels seus nounats, un pitjor estat en cobalamina i majors concentracions de MMA (dóna suport al fet que a més del procés fisiològic de l'embaràs també està relacionat amb l'estat en cobalamina) i tHcy respecte els altres tercils. Aquestes concentracions no es recuperen al llarg de l'embaràs, i que a més, repercuteixin en un pitjor estat en els cordons dels nounats, podria associar l'augment de MMA a una situació d'estrès de reserves de cobalamina, conseqüència de l'inici

de l'embaràs amb un estat baix en cobalamina. La concentració d'HoloTC plasmàtica al final de la gestació, davant d'un baix estat en cobalamina, es manté estable, fet que no s'observa en un millor estat en cobalamina.

Els polimorfismes amb la major freqüència d'homozigots mutants són per ordre decreixent: *MTRR* 66A>G, *TCII* 776C>G, *MTHFR* 677C>T i *MTRR* 524C>T, tant en l'estudi de la població com en el de l'embaràs.

La presència dels genotips *MTRR* 524TT, *TCII* 776CG i 776GG, s'associa en la nostra població, a una reducció de la cobalamina disponible als teixits. Cap es relaciona amb tHcy elevada. Contràriament la presència del genotip *MTRR* 524TT s'associa amb tHcy inferior respecte els altres genotips, en les dones de la població.

L'hàbit de fumar i el consum d'alcohol s'associen amb un pitjor estat en cobalamina en la nostra població. Fumar ≥ 6 cigarretes/dia s'associa inversament amb l'estat en HoloTC i amb tHcy més elevada en la gent gran. En analitzar per separat les dones d'edat fèrtil, l'hàbit tòxic que s'associa amb tHcy més elevada, és el consum d'alcohol ≥ 30 g/dia.

En les gestants amb baix estat en cobalamina a principis d'embaràs, en investigar els factors predictius del MMA en cada mostra de l'embaràs i al cordó, s'observa que el genotip *MTRR* 524TT s'associa amb MMA plasmàtic més elevat, respecte els altres genotips, al primer trimestre. La presència d'aquest genotip podria facilitar l'empitjorament d'estat en cobalamina en les gestants que comencen l'embaràs en un estat subòptim de cobalamina. La presència del genotip *TCII* 776GG en les gestants, s'associa a una major concentració de tHcy als cordons dels seus nounats. Tant la falta de potència estadística com el fet que les concentracions de cobalamina del tercil baix (≤ 316 pmol/L), no s'associïn a deficiències importants de cobalamina, podrien ser el motiu de no detectar les associacions entre la presència dels genotips *MTRR* 524TT i *TCII* 776GG i, els diferents biomarcadors d'estat en cobalamina.

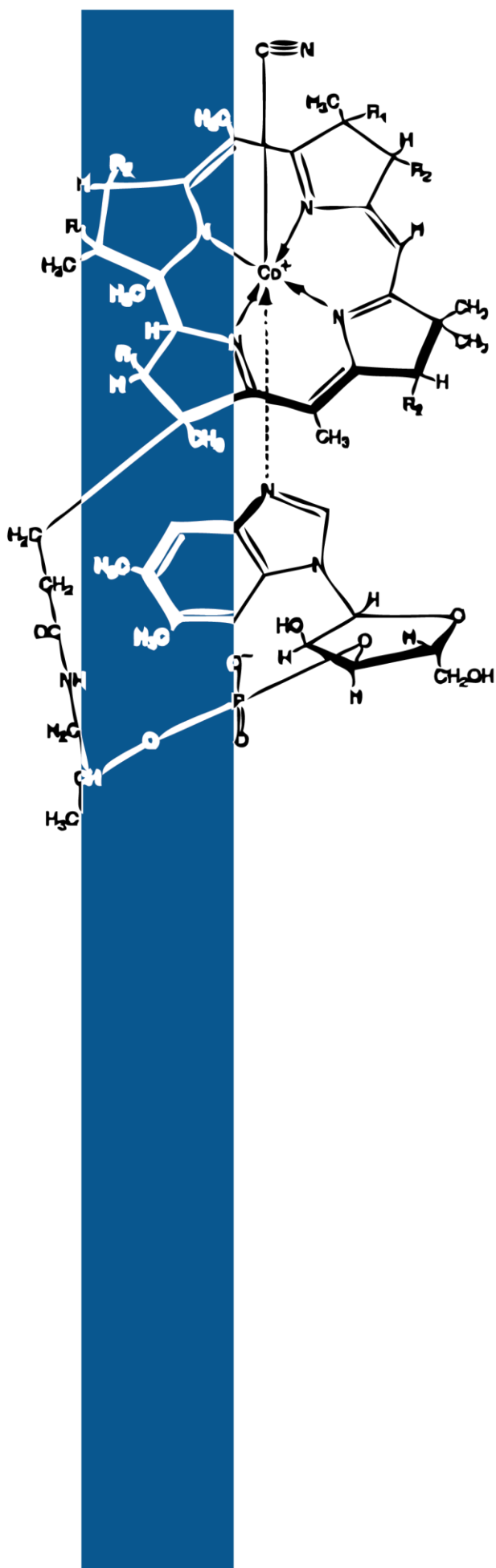
El genotip *MTRR* 66GG s'associa a tHcy més elevada respecte els altres genotips, però les diferències només són significatives al principi de l'embaràs. En presència del genotip *MTRR* 66GG les concentracions plasmàtiques d'HoloTC al final de l'embaràs s'estabilitzen i no difereixen de les inicials. Les tendències a un millor estat en HoloTC, davant major tHcy en presència de *MTRR* 66GG respecte els altres genotips, es podrien relacionar amb una resposta compensatòria a una etapa inicial de deficiència marginal en cobalamina. En investigar els factors predictius de la variabilitat en MMA en cada mostra de l'embaràs i al cordó, s'observa que en les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de

cobalamina, la presència del genotip *MTRR* 66GG, considerant l'estat en cobalamina en el model, s'associa inversament al MMA plasmàtic en el cordó.

En les complicacions de l'embaràs, el risc de CIR es triplica per la presència del genotip *TCII* 776GG en la gestant.

L'inici de l'embaràs determina de manera important el final d'aquest. Començar al tercil baix de cobalamina, HoloTC, al tercil alt de MMA o amb una deficiència marginal de cobalamina o HoloTC, augmenten el risc d'acabar l'embaràs en el mateix estat. Com a factors ambientals s'observa com un millor estat socioeconòmic familiar i, la suplementació regular amb cobalamina al final de l'embaràs, s'associen a acabar l'embaràs amb un millor estat en cobalamina, per altra banda, el fet de fumar durant tot l'embaràs, duplica el risc d'acabar-lo al tercil baix d'HoloTC. La presència del genotip *TCII* 776GG en les gestants, duplica el risc d'acabar l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina o HoloTC.

En analitzar en la nostra població, els individus amb baix estat en cobalamina i elevat en folats, respecte els que amb el mateix estat en cobalamina no tenen elevats folats, s'observa que tant una reducció de la cobalamina disponible a nivell dels teixits, com un elevat estat en folats, s'associen amb tHcy elevada. El baix estat en cobalamina és més pronunciat en els individus amb elevat estat en folats. Aquest fet es corrobora en les gestants, que tot i no estar implicades a un sistema de fortificació obligatòria, sí que ho estan amb les polítiques protocol·làries de suplementació prenatal. El mateix anàlisi fet en la població mostra que davant un baix estat en cobalamina, la combinació amb elevades concentracions de folat, fa que marcadors de deficiència en cobalamina, com el MMA plasmàtic, siguin més elevats, indicant un pitjor estat en cobalamina en aquestes gestants.



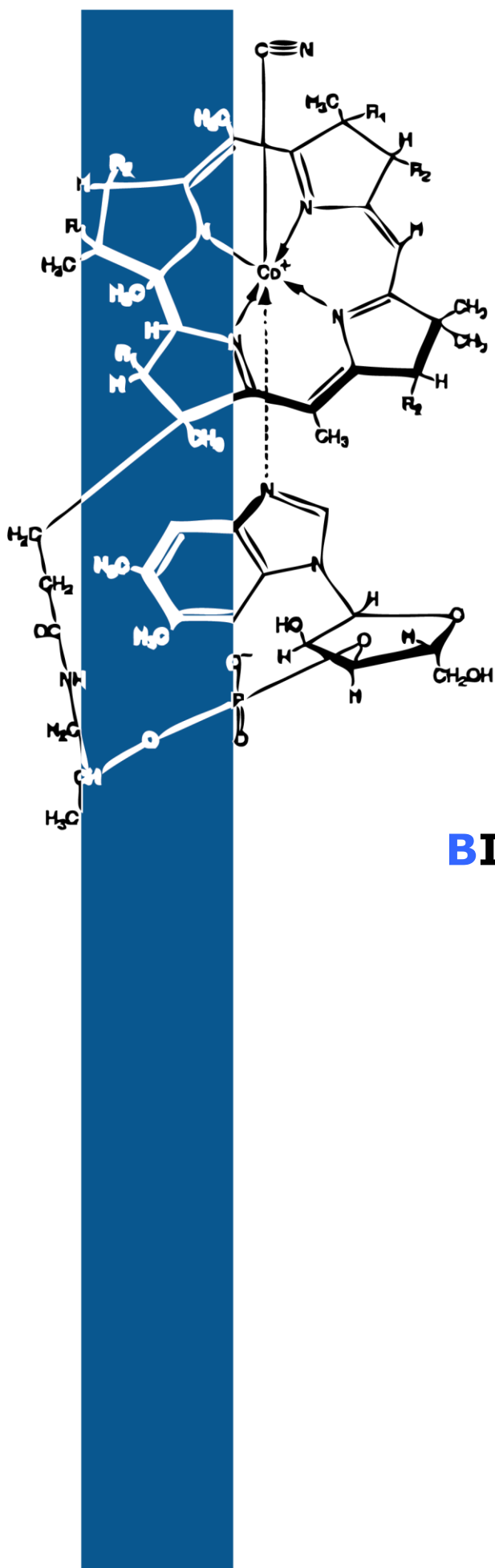
CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- En una mostra representativa de la nostra població, els individus amb pitjor estat en cobalamina i més risc de deficiència, són els de 18-44 anys i la gent gran.
- Els polimorfismes amb la major freqüència d'homozigots mutants són per ordre decreixent, tant en la població com en les gestants: *MTRR* 66A>G, *TCII* 776C>G, *MTHFR* 677C>T i *MTRR* 524C>T.
- En l'embaràs l'HoloTC respecte la cobalamina plasmàtica, no és un marcador més sensible a l'ús diari de suplementes amb 2 µg de CNCbl.
- En adults la presència dels genotips *MTRR* 524TT, *TCII* 776CG i 776GG s'associa a una reducció de la cobalamina disponible als teixits.
- En les dones, el genotip *MTRR* 524TT s'associa inversament amb la tHcy.
- L'hàbit de fumar ≥ 6 cigarretes/dia i el consum de ≥ 30 g/dia d'alcohol s'associen a un pitjor estat en cobalamina.
- El MMA i la tHcy, marcadors funcionals d'alteració en vies metabòliques a on intervé la cobalamina, són més elevats quan el baix estat en cobalamina està acompanyat amb un elevat estat en folats, tant en adults com en gestants.
- Durant l'embaràs l'estat en cobalamina empitjora tot i que al final d'aquest, quan les concentracions de MMA plasmàtic i tHcy són més elevades, la tendència a disminuir de la cobalamina plasmàtica és menys accentuada i l'HoloTC s'estabilitza. En el cordó, respecte les concentracions plasmàtiques de la gestant al part, la cobalamina, l'HoloTC, i el MMA estan més elevats, però la tHcy és inferior.
- La suplementació amb 2 µg de CNCbl durant l'embaràs, pot ajudar a alentir la reducció de la cobalamina plasmàtica pròpia de l'embaràs.
- Les gestants que comencen l'embaràs al tercil baix de cobalamina, mantenen durant tot l'embaràs un pitjor estat en cobalamina respecte les gestants dels altres tercils. També s'observa un pitjor estat en els cordons dels seus nounats. Les concentracions plasmàtiques de MMA i tHcy són majors respectivament, en presència dels genotips *MTRR* 524TT i *MTRR* 66GG. No obstant, el genotip *MTRR* 66GG en les gestants,

s'associa a MMA plasmàtic inferior i, la presència del genotip *TCII 776GG* a major tHcy al cordó.

- El risc de CIR es triplica amb la presència del genotip *TCII 776GG* en les gestants.
- La presència del genotip *TCII 776GG* en les gestants, duplica el risc d'acabar l'embaràs amb deficiència marginal de cobalamina o d'HoloTC.
- L'hàbit de fumar durant tot l'embaràs, duplica el risc d'acabar l'embaràs al tercil baix d'HoloTC. Un millor estat socioeconòmic familiar i la suplementació regular amb cobalamina al final de l'embaràs, s'associen a acabar l'embaràs amb un millor estat en cobalamina.



REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:137-81.
2. Combe JS. History of a case of anaemia. *Trans Med Chir Soc Edinb* 1824;1:194-204.
3. Addison T. On the constitutional and local effects of disease of the supra-renal capsules. London: Samuel Highley;1855.
4. Curran JA. The tradition of Austin Flint and Alexander Skene at "Long Island". *Minn Med* 1965;48:1719-22.
5. Castle WB, Minot GR, Christian HA. Pathological physiology and clinical description of the anemias. Oxford: Oxford University Press; 1936.
6. Robscheit-Robbins FS, Whipple GH. Blood regeneration in severe anemia:XIV.A liver fraction potent in pernicious anemia fed alone and combined with whole liver, liver ash and fresh bile. *J Exp Med* 1929;49:215-77.
7. Minot GR, Murphy WP. Treatment of pernicious anemia by a special diet. 1926. *Yale J Biol Med* 2001;74:341-53.
8. Castle WB, Townsend WC, Heath CW. Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anemia:III. The nature of the reaction between normal human gastric juice and beef muscle leading to clinical improvement and increased blood formation similar to the effect of liver feeding. *Am J Med Sci* 1930;180:305-335.
9. The official web site of the Nobel foundation [consultat al maig del 2010]. Disponible a: <http://nobelprize.org/>.
10. Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K. Crystalline Vitamin B12. *Science* 1948;107:396-7.
11. Smith EL. Purification of anti-pernicious anaemia factor from liver. *Nature* 1948;161:638-9.
12. Smith EL. Presense of cobalt in the anti-pernicious anaemia factor. *Nature* 1948; 162:144-5.
13. Hodgkin DG, Pickworth J, Robertson JH, Trueblood KN, Prosen RJ, White JG. *Nature* 1955;176:325-8.
14. Hall CA, Finkler AE. The dynamics of transcobalamin II. A vitamin B12 binding substance in plasma. *J Lab Clin Med* 1965;65:459-68.
15. Woodward RB. The total synthesis of vitamin B12. *Pure Appl Chem* 1973;33:145-77.
16. Poston JM. Leucine 2,3-aminomutase: a cobalamin-dependent enzyme present in bean seedlings. *Science* 1977;195:301-2.
17. Watanabe F, Nakano Y, Tamura Y, Yamanaka H. Vitamin B12 metabolism in a photosynthesizing green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1991;1075:36-41.

18. Watanabe F, Tamura Y, Stupperich E, Nakano Y. Uptake of cobalamin by *Euglena* mitochondria. *J Biochem* 1993;114:793-9.
19. Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:275-83.
20. Scott AL. Discovering nature's diverse pathways to vitamin B12: a 35-year odyssey. *J Org Chem* 2003;68:2529-39.
21. Roth JR, Lawrence JG, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, Church GM. Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1993;175:3303-16.
22. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. Versió catalana de la 6a ed. anglesa. Barcelona: Reverté; 2007.
23. Green R, Miller JW. Vitamin B₁₂. In: Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. *Handbook of vitamins*. 4th ed. United States of America: Taylor & Francis Group; 2007.p.413-57.
24. Kapadia CR. Vitamin B12 in health and disease: part I-inherited disorders of function, absorption, and transport. *Gastroenterologist* 1995;3:329-44.
25. Barrios MF, Hernández IG, Gómez HG. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;15:159-74.
26. Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004;171:251-9.
27. Garrett R, Grisham CM. Metabolism and its regulation. In: Hugel R (director). *Biochemistry*. 3rd ed. Belmont: Cengage Learning; 2005.p.536-896.
28. Rétey J. The stereochemistry of the reaction catalyzed by ethanolamine ammonia-lyase, an adenosylcobalamin-dependent enzyme. An example of racemisation accompanying substitution. *J Biol Chem* 1974;249:6359-60.
29. Mahoney MJ, Hart AC, Steen VD, Rosenberg LE. Methylmalonicacidemia: biochemical heterogeneity in defects of 5'-deoxyadenosylcobalamin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2799-803.
30. Coffee CJ. *Metabolism*. USA: Fence Creek Publishing;1998.
31. Weissbach H, Peterkofsky A, Redfield BG, Dickerman H. Studies on the terminal reaction in the biosynthesis of methionine. *J Biol Chem* 1963;238:3318-24.
32. Downing M, Schweigert BS. Role of vitamin B12 in nucleic acid metabolism. IV. Metabolism of C14-labeled thymidine by *Lactobacillus leichmannii*. *J Biol Chem* 1956;220:521-6.
33. Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997;66:269-313.
34. Koutmos M, Datta S, Patridge KA, Smith JL, Matthews RG. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:18527-32.

- 35.** Thompson MD, Cole DE, Ray JG. Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr* 2009;89:697S-701S.
- 36.** Schjonsby H. Vitamin B12 absorption and malabsorption. *Gut* 1989;30:1686-91.
- 37.** Chanarin I. The megaloblastic anaemias. London: Blackwell Scientific Publications; 1969.
- 38.** Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, Bell MC. Vitamin B12 turnover in man. The assimilation of vitamin B12 from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 1966;18:176-84.
- 39.** Farquharson J, Adams JF. The forms of vitamin B12 in foods. *Br J Nutr* 1976;36:127-36.
- 40.** USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Vitamin B-12 (μg) Content of Selected Food per Common Measure, sorted by nutrient content [consultat a l'agost del 2010]. Disponible a:
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR18/nutrlist/sr18w418.pdf>.
- 41.** Watanabe F, Katsura H, Takenaka S, Enomoto T, Miyamoto E, Nakatsuka T et al. Characterization of vitamin B12 compounds from edible shellfish, clam, oyster, and mussel. *Int J Food Sci Nutr* 2001;52:263-8.
- 42.** Satoko A, Miyamoto E, Watanabe F, Enomoto T, Kuda T, Hayashi M et al. Purification and characterization of corrinoid compound from a japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun". *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2005;28:2561-9.
- 43.** Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. Vitamin B12 assimilation from chicken meat. *Am J Clin Nutr* 1978;31:825-30.
- 44.** Doscherholmen A, McMahon J, Economon P. Vitamin B12 absorption from fish. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981;167:480-4.
- 45.** Russell RM, Baik H, Kehayias JJ. Older men and women efficiently absorb vitamin B-12 from milk and fortified bread. *J Nutr* 2001;131:291-3.
- 46.** Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. Vitamin B12 absorption from eggs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;149:987-90.
- 47.** Doscherholmen A. Inhibition by raw eggs of vitamin B12 absorption. *JAMA* 1978;240:2045.
- 48.** Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. Inhibitory effect of eggs on vitamin B12 absorption: description of a simple ovalbumin ^{57}Co -vitamin B12 absorption test. *Br J Haematol* 1976;33:261-72.
- 49.** Levine AS, Doscherholmen A. Vitamin B12 bioavailability from egg yolk and egg white: relationship to binding proteins. *Am J Clin Nutr* 1983;38:436-9.
- 50.** Bennink MR, Ono K. Vitamin B12, E and D of raw and cooked beef. *J Food Sci* 1982;47:1786-92.
- 51.** Nishioka M, Tanioka Y, Miyamoto E, Enomoto T, Watanabe F. Characterization of vitamin B12 in skipjack meats and loss of the vitamin from the fish meats by various cooking conditions. *Vitamins* 2006;80:507-11.

- 52.** Watanabe F, Abe K, Fujita T, Goto M, Hiemori M, Nakano Y. Effects of microwave heating on the loss of vitamin B12 in foods. *J Agric Food Chem* 1998;46:206-10.
- 53.** Arkbåge K, Witthöft C, Fondén R, Jägerstad M. Retention of vitamin B12 during manufacture of six fermented dairy products using a validated radio protein-binding assay. *Int Dairy J* 2003;13:101-9.
- 54.** Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. Navarra: Ediciones Universidad de Navarra, S.A. (EUNSA); 2010.
- 55.** Yates AA, Schilcker SA, Sutor CW. Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc* 1998;98:699-706.
- 56.** Seetharam B. Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr* 1999;19:173-95.
- 57.** Seetharam B, Alpers DH. Cellular uptake of cobalamin. *Nutr Rev* 1985;43:97-102.
- 58.** Del Corral A, Carmel R. Transfer of cobalamin from the cobalamin-binding protein of egg yolk to R binder of human saliva and gastric juice. *Gastroenterology* 1990;98:1460-6.
- 59.** Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency—an update. *Haematologica* 2006;91:1506-12.
- 60.** Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH. Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1978;61:47-54.
- 61.** Ramanujam KS, Seetharam S, Seetharam B. Synthesis and secretion of cobalamin binding proteins by opossum kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:543-50.
- 62.** Sourial NA, Waters AH. Effect of pH on binding of B12 to IF and R-protein. *Br J Haematol* 1992;81:136-8.
- 63.** Russell-Jones GJ, Alpers DH. Vitamin B12 transporters. *Pharm Biotechnol* 1999;12:493-520.
- 64.** Morbak AL, Hvas AM, Lloyd-Wright Z, Sanders TA, Bleie O, Refsum H et al. Effect of vitamin B12 treatment on haptocorrin. *Clin Chem* 2006;52:1104-11.
- 65.** Ermens AA, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin Biochem* 2003;36:585-90.
- 66.** Stupperich E, Nexø E. Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *Eur J Biochem* 1991;199:299-303.
- 67.** Herbert V, Castle WB. Divalent cation and pH dependence of rat intrinsic factor action in everted sacs and mucosal homogenates of rat small intestine. *J Clin Invest* 1961;40:1978-83.

- 68.** Andrès E, Dali-Youcef N, Vogel T, Serraj k, Zimmer J. Oral cobalamin (vitamin B(12)) treatment. An update. *Int J Lab Haematol* 2009;31:1-8.
- 69.** Guéant JL, Monin B, Boissel P, Gaucher P, Nicolas JP. Biliary excretion of cobalamin and cobalamin analogues in man. *Digestion* 1984;30:151-7.
- 70.** Kholty S, Gueant JL, Bressler L, Djalali M, Boissel P, Gerard P et al. Portal and biliary phases of enterohepatic circulation of corrinoids in humans. *Gastroenterology* 1991;101:1399-408.
- 71.** Kanazawa S, Herbert V. Mechanism of enterohepatic circulation of vitamin B12: movement of vitamin B12 from bile R-binder to intrinsic factor due to the action of pancreatic trypsin. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:336-44.
- 72.** Shinton NK. Vitamin B12 and folate metabolism. *Br Med J* 1972;1:556-9.
- 73.** Nicolas JP, Guéant JL. Gastric intrinsic factor and its receptor. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:515-31.
- 74.** Marcoullis G, Parmentier Y, Nicolas JP, Jimenez M, Gerard P. Cobalamin malabsorption due to nondegradation of R proteins in the human intestine. Inhibited cobalamin absorption in exocrine pancreatic dysfunction. *J Clin Invest* 1980;66:430-40.
- 75.** Allen RH, Seetharam B, Allen NC, Podell ER, Alpers DH. Correction of cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency with a cobalamin analogue that binds with high affinity to R proteins but not to intrinsic factor. In vivo evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1978;61:1628-34.
- 76.** Nicolas JP, Jimenez M, Marcoullis G, Parmentier Y. In vivo evidence that intrinsic factor-cobalamin complex traverses the human intestine intact. *Biochim Biophys Acta* 1981;675:328-33.
- 77.** Andersen KJ, von der Lippe G. The effect of proteolytic enzymes on the vitamin B12-binding proteins of human gastric juice and saliva. *Scand J Gastroenterol* 1979;14:833-8.
- 78.** Guéant JL, Parmentier Y, Djalali M, Bois F, Nicolas JP. Sequestration of crystalline and endogenous cobalamin by R binders down to the distal ileum in exocrine pancreatic dysfunction. *Clin Chim Acta* 1983;134:95-106.
- 79.** Kittang E, Schjønby H. Effect of gastric anacidity on the release of cobalamins from food and their subsequent binding to R-protein. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1031-7.
- 80.** Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem* 1998;273:5235-42.
- 81.** Ardeman S, Chanarin I, Doyle JC. Studies on secretion of gastric intrinsic factor in man. *Br Med J* 1964;2:600-3.
- 82.** Herbert V. Mechanism of intrinsic factor action in everted sacs of rat small intestine. *J Clin Invest* 1959;38:102-9.
- 83.** Seetharam B, Alpers DH, Allen RH. Isolation and characterization of the ileal receptor for intrinsic factor-cobalamin. *J Biol Chem* 1981;256:3785-90.

- 84.** Herbert V. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988;48:852-8.
- 85.** Ross GI, Mollin DL, Cox EV, Ungley CC. Hematologic responses and concentration of vitamin B12 in serum and urine following oral administration of vitamin B12 without intrinsic factor. *Blood* 1954;9:473-88.
- 86.** Doscherholmen A, Hagen PS. A dual mechanism of vitamin B12 plasma absorption. *J Clin Invest* 1957;36:1551-7.
- 87.** Castle WB. Current concepts of pernicious anemia. *Am J Med* 1970;48:541-8.
- 88.** Seetharam B, Christensen EI, Moestrup SK, Hammond TG, Verroust PJ. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest* 1997;99:2317-22.
- 89.** Rothenberg SP. Identification of a macromolecular factor in the ileum which binds intrinsic factor and immunologic identification of intrinsic factor in ileal extracts. *J Clin Invest* 1968;47:913-23.
- 90.** Donaldson RM Jr, Mackenzie IL, Trier JS. Intrinsic factor-mediated attachment of vitamin B12 to brush borders and microvillous membranes of hamster intestine. *J Clin Invest* 1967;46:1215-28.
- 91.** Seetharam B, Levine JS, Ramasamy M, Alpers DH. Purification, properties, and immunochemical localization of a receptor for intrinsic factor-cobalamin complex in the rat kidney. *J Biol Chem* 1988;263:4443-9.
- 92.** Ramanujam KS, Seetharam S, Ramasamy M, Seetharam B. Renal brush border membrane bound intrinsic factor. *Biochim Biophys Acta* 1990;1030:157-64.
- 93.** Birn H, Verroust PJ, Nexo E, Hager H, Jacobsen C, Christensen EI et al. Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B12 and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* 1997;272:26497-504.
- 94.** Bork P, Beckmann G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 1993;231:539-45.
- 95.** Kozyraki R, Gofflot F. Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr Pharm Des* 2007;13:3038-46.
- 96.** Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 2001;21:407-28.
- 97.** Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cells-surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 2003;5:1-18.
- 98.** Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 2004;103:1573-9.
- 99.** Coudroy G, Gburek J, Kozyraki R, Madsen M, Trugnan G, Moestrup SK et al. Contribution of cubilin and amnionless to processing and membrane targeting of cubilin-amnionless complex. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2330-7.

- 100.** Li F, Watkins D, Rosenblatt DS. Vitamin (B12) and birth defects. *Mol Genet Metab* 2009;98:166-72.
- 101.** He Q, Madsen M, Kilkenney A, Gregory B, Christensen EI, Vorum H et al. Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 2005;106:1447-53.
- 102.** Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin", a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9725-9.
- 103.** Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB et al. Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8612-7.
- 104.** Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000;275:12003-8.
- 105.** Ahuja R, Yammani R, Bauer JA, Kalra S, Seetharam S, Seetharam B. Interactions of cubilin with megalin and the product of the amnionless gene (AMN): effect on its stability. *BiochemJ* 2008;410:301-8.
- 106.** Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1859-67.
- 107.** Ramanujam KS, Seetharam S, Ramasamy M, Seetharam B. Expression of cobalamin transport proteins and cobalamin transcytosis by colon adenocarcinoma cells. *Am J Physiol* 1991;260:G416-22.
- 108.** Sullivan LW, Herbert V, Castle WB. In vitro assay for human intrinsic factor. *J Clin Invest* 1963;42:1443-58.
- 109.** Brada N, Grodon MM, Wen J, Alpers DH. Transfer of cobalamin from intrinsic factor to transcobalamin II. *J Nutr Biochem* 2001;12:200-6.
- 110.** Chanarin I, Muir M, Hughes A, Hoffbrand AV. Evidence for intestinal origin of transcobalamin II during vitamin B12 absorption. *Br Med J* 1978;1:1453-5.
- 111.** Quadros EV, Regec AL, Khan KM, Quadros E, Rothenberg SP. Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *Am J Physiol* 1999;277:G161-6.
- 112.** Jenkins WJ, Empson R, Jewell DP, Taylor KB. Subcellular localization of vitamin B12 during absorption in the guinea-pig ileum. *Gut* 1981;22:617-22.
- 113.** Horadagoda NU, Batt RM. Lysosomal localisation of cobalamin during absorption by the ileum of the dog. *Biochim Biophys Acta* 1985;838:206-10.
- 114.** Dan N, Culter DF. Transcytosis and processing of intrinsic factor-cobalamin in Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1994;269:18849-55.
- 115.** Allen RH, Majerus PW. Isolation of vitamin B12-binding proteins using affinity chromatography.3.Purification and properties of human plasma transcobalamin II. *J Biol Chem* 1972;247:7709-17.

- 116.** Quadros EV, Rothenberg SP, Jaffe EA. Endothelial cells from human umbilical vein secrete functional transcobalamin II. *Am J Physiol* 1989;256:C296-303.
- 117.** Green PD, Savage CR Jr, Hall CA. Mouse transcobalamin II: biosynthesis and uptake by L-929 cells. *Arch Biochem Biophys* 1976;176:683-9.
- 118.** Rappazzo ME, Hall CA. Transport function of transcobalamin II. *J Clin Invest* 1972;51:1915-8.
- 119.** Jacob E, Baker SJ, Herbert V. Vitamin B12-binding proteins. *Physiol Rev* 1980;60:918-60.
- 120.** Nexø E, Hvas AM, Bleie O, Refsum H, Fedosov SN, Vollset SE et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48:1768-71.
- 121.** Bose S, Seetharam S, Seetharam B. Membrane expression and interactions of human transcobalamin II receptor. *J Biol Chem* 1995;270:8152-7.
- 122.** Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. The binding properties of the human receptor for the cellular uptake of vitamin B12. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:1006-10.
- 123.** Sennett C, Rosenberg LE, Mellman IS. Transmembrane transport of cobalamin in prokaryotic and eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 1981;50:1053-86.
- 124.** Nielsen R, Sorensen BS, Birn H, Christensen EI, Nexø E. Transcellular transport-of vitamin B(12) in LLC-PK1 renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1099-106.
- 125.** Birn H, Willnow TE, Nielsen R, Norden AG, Bönsch C, Moestrup SK et al. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B(12). *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F408-16.
- 126.** Yammani RR, Seetharam S, Dahms NM, Seetharam B. Transcobalamin II receptor interacts with megalin in the renal apical brush border membrane. *J Membr Biol* 2003;193:57-66.
- 127.** Youngdahl-Turner P, Mellman IS, Allen RH, Rosenberg LE. Protein mediated vitamin uptake. Adoptive endocytosis of the transcobalamin II-cobalamin complex by cultured human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1979;118:127-34.
- 128.** Bose S, Komorowski R, Seetharam S, Gilfix B, Rosenblatt DS, Seetharam B. In vitro and in vivo inactivation of transcobalamin II receptor by its antiserum. *J Biol Chem* 1996;271:4195-200.
- 129.** Bose S, Seetharam S, Dahms NM, Seetharam B. Bipolar functional expression of transcobalamin II receptor in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1997;272:3538-43.
- 130.** Ross GI. Vitamin B12 assay in body fluids. *Nature* 1950;166:270-1.
- 131.** Schilling RF, Fairbanks VF, Miller R, Schmitt K, Smith MJ. "Improved" vitamin B12 assays: a report on two commercial kits. *Clin Chem* 1983;29:582-3.
- 132.** Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76:871-81.

- 133.** Joosten E, Van den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP et al. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993;58:468-76.
- 134.** Herrmann W, Schorr H, Bodis M, Knapp JP, Müller A, Stein G et al. Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2000;30:1083-9.
- 135.** Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency:II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:99-107.
- 136.** Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews LM, Grigsby J, Kaye K et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:1197-204.
- 137.** England JM, Down MC, Wise IJ, Linnell JC. The transport of endogenous vitamin B12 in normal human serum. *Clin Sci Mol Med* 1976;51:47-52.
- 138.** Nexø E, Gimsing P. Turnover in humans of iodine- and cobalamin-labeled transcobalamin I and of iodine-labeled albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:391-8.
- 139.** Hom BL, Olesen HA. Plasma clearance of 57cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;23:201-11.
- 140.** Schneider RJ, Burger RL, Mehlman CS, Allen RH. The role and fate of rabbit and human transcobalamin II in the plasma transport of vitamin B12 in the rabbit. *J Clin Invest* 1976;57:27-38.
- 141.** Lindemans J, Schoester M, Van Kapel J. Application of a simple immunoabsorption assay for the measurement of saturated and unsaturated transcobalamin II and R-binders. *Clin Chim Acta* 1983;132:53-61.
- 142.** Carmel R. R-binder deficiency. A clinically benign cause of cobalamin pseudodeficiency. *JAMA* 1983;250:1886-90.
- 143.** Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B12 balance. *Lab Invest* 1988;58:332-7.
- 144.** Herbert V, Fong W, Gulle V, Stopler T. Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B12 (cobalamin) absorption in patients with AIDS. *Am J Hematol* 1990;34:132-9.
- 145.** Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B12 in serum samples from healthy subjects and patients. *J Clin Pathol* 1993;46:537-9.
- 146.** Hvas AM, Nexø E. Holotranscobalamin—a first choice assay for diagnosing early vitamin B deficiency?. *J Intern Med* 2005;257:289-98.
- 147.** Hin H, Clarke R, Sherliker P, Atoyebi W, Emmens K, Birks J et al. Clinical relevance of low serum vitamin B12 concentrations in older people: the Banbury B12 study. *Age Ageing* 2006;35:416-22.
- 148.** Clarke R, Sherliker P, Hin H, Nexø E, Hvas AM, Schneede J et al. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007;53:963-70.

- 149.** Obeid R, Herrmann W. Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1746-50.
- 150.** Carmel R, Herbert V. Deficiency of vitamin B12-binding alpha globulin in two brothers. *Blood* 1969;33:1-12.
- 151.** Von Castel-Roberts KM, Morkbak AL, Nexo E, Edgemon CA, Maneval DR, Shuster JJ et al. Holo-transcobalamin is an indicator of vitamin B-12 absorption in healthy adults with adequate vitamin B-12 status. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1057-61.
- 152.** Schrempf W, Eulitz M, Neumeister V, Siegert G, Koch R, Reichmann H et al. Utility of measuring vitamin B(12) and its active fraction, holotranscobalamin, in neurological vitamin B(12) deficiency syndromes. *J Neurol* 2011;258:393-401.
- 153.** Bor MV, Cetin M, Aytaç S, Altay C, Nexo E. Nonradioactive vitamin B12 absorption test evaluated in controls and in patients with inherited malabsorption of vitamin B12. *Clin Chem* 2005;2151-5.
- 154.** Lindgren A, Kilander A, Bagge E, Nexo E. Holotranscobalamin – a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999;29:321-9.
- 155.** Chen X, Remacha AF, Sardà MP, Carmel R. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holo-transcobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2005;81:110-4.
- 156.** England JM, Linnell JC. Problems with the serum vitamin B12 assay. *Lancet* 1980;2:1072-4.
- 157.** Das KC, Manusselis C, Herbert V. Determination of vitamin B12 (cobalamin) in serum and erythrocytes by radioassay, and of holo-transcobalamin II (holo-TCII) and holo-haptocorrin (holo-TCI and III) in serum by adsorbing holo-TCII on microfine silica. *J Nutr Biochem* 1991;2:455-64.
- 158.** Ulleland M, Eilersen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526-32.
- 159.** Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561-2.
- 160.** Loikas S, Lopponen M, Suominen P, Moller J, Irjala K, Isoaho R et al. RIA for serum holo-transcobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval. *Clin Chem* 2003;49:455-62.
- 161.** Orning L, Rian A, Campbell A, Brady J, Fedosov SN, Bramlage B et al. Characterization of a monoclonal antibody with specificity for holo-transcobalamin. *Nutr Metab (Lond)* 2006;3:3.
- 162.** Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente E, Orning L. Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem* 2008;54:567-73.
- 163.** Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278-85.

- 164.** Garrod MG, Green R, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN et al. Fraction of total plasma vitamin B12 bound to transcobalamin correlates with cognitive function in elderly Latinos with depressive symptoms. *Clin Chem* 2008;54:1210-7.
- 165.** Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexo E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006;52:129-37.
- 166.** Obeid R, Morkbak AL, Munz W, Nexo E, Herrmann W. The cobalamin-binding proteins transcobalamin and haptocorrin in maternal and cord blood sera at birth. *Clin Chem* 2006;52:263-9.
- 167.** Bor MV, Nexo E, Hvas AM. Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B12 absorption better than does serum vitamin B12. *Clin Chem* 2004; 50:1043-9.
- 168.** Kovachy RJ, Copley SD, Allen RH. Recognition, isolation, and characterization of rat liver D-methylmalonyl coenzyme A hydrolase. *J Biol Chem* 1983;258:11415-21.
- 169.** Rasmussen K, Moelby L, Jensen MK. Studies on methylmalonic acid in humans. II. Relationship between concentrations in serum and urinary excretion, and the correlation between serum cobalamin and accumulation of methylmalonic acid. *Clin Chem* 1989;35:2277-80.
- 170.** Moelby L, Rasmussen K, Jensen MK, Pedersen KO. The relationship between clinically confirmed cobalamin deficiency and serum methylmalonic acid. *J Intern Med* 1990;228:373-8.
- 171.** Koehler KM, Romero LJ, Stauber PM, Pareo-Tubbeh SL, Liang HC, Baumgartner RN et al. Vitamin supplementation and other variables affecting serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in elderly men and women. *J Am Coll Nutr* 1996;15:364-76.
- 172.** Holleland G, Schneede J, Ueland PM, Lund PK, Refsum H, Sandberg S. Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in relation to current diagnostic strategies. *Clin Chem* 1999;45:189-98.
- 173.** Schneede J, Dagnelie PC, van Staveren WA, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicators of functional cobalamin deficiency in infants on macrobiotic diets. *Pediatr Res* 1994;36:194-201.
- 174.** Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, Schneede J, Vollset SE, Orning L et al. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74:233-41.
- 175.** Hvas AM, Ellegaard J, Nexo E. Increased plasma methylmalonic acid level does not predict clinical manifestations of vitamin B12 deficiency. *Arch Intern med* 2001;161:1534-41.
- 176.** Bates CJ, Schneede J, Mishra G, Prentice A, Mansoor MA. Relationship between methylmalonic acid, homocysteine, vitamin B12 intake and status and socio-economic indices, in a subset of participants in the British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 y and over. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:349-57.

- 177.** Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988;81:466-74.
- 178.** Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318:1720-8.
- 179.** Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
- 180.** Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B-12 deficiency. *J Nutr* 1996;126:1266S-72S.
- 181.** Minet JC, Bissé E, Aebischer CP, Beil A, Wieland H, Lütschg J. Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. *Am J Clin Nutr* 2000;72:751-7.
- 182.** Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 2000;46:1277-83.
- 183.** Clarke R, Refsum H, Birks J, Evans JG, Johnston C, Sherliker P et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1241-7.
- 184.** Haugen HN, Blegen EM. Blood urea and plasma endogenous creatinine in renal insufficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1953;5:63-6.
- 185.** Carmel R, Vasireddy H, Aurangzeb I, George K. High serum cobalamin levels in the clinical setting--clinical associations and holo-transcobalamin changes. *Clin Lab Haematol* 2001;23:365-71.
- 186.** Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. The usefulness of holotranscobalamin in predicting vitamin B12 status in different clinical settings. *Curr Drug Metab* 2005;6:47-53.
- 187.** Soria C, Chadeaux B, Coudé M, Gaillard O, Kamoun P. Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin Chem* 1990;36:2137-8.
- 188.** Hultberg B, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993;40:230-5.
- 189.** Arnadottir M, Hultberg B, Nilsson-Ehle P, Thysell H. The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:41-6.
- 190.** Herrmann W, Schorr H, Geisel J, Riegel W. Homocysteine, cystathionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients with renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:739-46.
- 191.** Rasmussen K, Vyberg B, Pedersen KO, Brochner-Mortensen J. Methylmalonic acid in renal insufficiency: evidence of accumulation and implications for diagnosis of cobalamin deficiency. *Clin Chem* 1990;36:1523-4.
- 192.** Hvas AM, Juul S, Gerdes LU, Nexø E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. *J Intern Med* 2000;247:507-12.

- 193.** Vogiatzoglou A, Oulhaj A, Smith AD, Nurk E, Drevon CA, Ueland PM et al. Determinants of plasma methylmalonic acid in a large population: implications for assessment of vitamin B12 status. *Clin Chem* 2009;55:2198-206.
- 194.** Loikas S, Koskinen P, Irjala K, Lopponen M, Isoaho R, Kivela SL et al. Renal impairment compromises the use of total homocysteine and methylmalonic acid but not total vitamin B12 and holotranscobalamin in screening for vitamin B12 deficiency in the aged. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:197-201.
- 195.** Gibbs BF, Itiaba K, Mammer OA, Crawhall JC, Cooper BA. A rapid method for the analysis of urinary methylmalonic acid. *Clin Chim Acta* 1972;38:447-53.
- 196.** Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Lindenbaum J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1986;77:1606-12.
- 197.** Rasmussen K. Solid-phase sample extraction for rapid determination of methylmalonic acid in serum and urine by a stable-isotope-dilution method. *Clin Chem* 1989;35:260-4.
- 198.** Schneede J, Ueland PM. Automated assay of methylmalonic acid in serum and urine by derivatization with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography, and fluorescence detection. *Clin Chem* 1993;39:392-9.
- 199.** Babidge PJ, Babidge WJ. Determination of methylmalonic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1994;216:424-6.
- 200.** Husek P. Simultaneous profile analysis of plasma amino and organic acids by capillary gas chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;669:352-7.
- 201.** Schneede J, Ueland PM. Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for routine determination of methylmalonic acid in human serum. *Anal Chem* 1995;67:812-9.
- 202.** Johnson DW. Dimethylaminoethyl esters for trace, rapid analysis of fatty acids by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:2388-93.
- 203.** Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000;46:1804-10.
- 204.** Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem* 2001;47:1993-2002.
- 205.** Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G, Ueland PM. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:2103-9.
- 206.** Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987;162:185-96.

- 207.** 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;40:873-81.
- 208.** Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-4.
- 209.** Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AK. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998;44:311-6.
- 210.** Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1999;45:1517-22.
- 211.** Pernet P, Lasnier E, Vaubourdolle M. Evaluation of the AxSYM homocysteine assay and comparison with the IMx homocysteine assay. *Clin Chem* 2000;46:1440-1.
- 212.** Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
- 213.** Selhub J, Jaques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.
- 214.** Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993;7:1344-53.
- 215.** Selhub J, Jaques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW et al. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999;131:331-9.
- 216.** Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994;96:239-46.
- 217.** Van Dusseldorp M, Schneede J, Refsum H, Ueland PM, Thomas CM, De Boer E et al. Risk of persistent cobalamin deficiency in adolescents fed a macrobiotic diet in early life. *Am J Clin Nutr* 1999;69:664-71.
- 218.** Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:90-8.
- 219.** Bjorkegren K, Svardsudd K. Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes—a population-based study. *J Intern Med* 2001;249:423-32.
- 220.** Selhub J, Morris MS, Jacques PF. In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19995-20000.
- 221.** 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;85:193-200.

- 222.** Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 2008;29:38.
- 223.** Schneede J. Prerequisites for establishing general recommendations for diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency and cost-utility evaluation of these guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:369-75.
- 224.** Bolann BJ, Solli JD, Schneede J, Grottum KA, Loraas A, Stokkeland M et al. Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamin-induced reduction in increased serum methylmalonic acid. *Clin Chem* 2000;46:1744-50.
- 225.** Carmel R. Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *Am J Haematol* 1990;34:108-14.
- 226.** Institute of Medicine and Committee (IOM). Dietary reference intake: folate other B vitamins and choline. Washington, DC:National Academy Press; 1998.
- 227.** Araki A, Sako Y, Ito H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis* 1993, 103:149-57.
- 228.** Kira J, Tobimatsu S, Goto I. Vitamin B12 metabolism and massive-dose methyl vitamin B12 therapy in Japanese patients with multiple sclerosis. *Intern Med* 1994.
- 229.** Takasaki Y, Moriuchi Y, Tsushima H, Ikeda E, Koura S, Taguchi J et al. Effectiveness of oral vitamin B12 therapy for pernicious anemia and vitamin B12 deficiency anemia. *Rinsho Ketsueki* 2002;43:165-9.
- 230.** Glass GB, Skeggs HR, Lee DH, Jones EL, Hardy WW. Hydroxocobalamin. I. Blood levels and urinary excretion of vitamin B12 in man after a single parenteral dose of aqueous hydroxocobalamin, aqueous cyanocobalamin and cyanocobalamin zinc-tannate complex. *Blood* 1961;18:511-21.
- 231.** Glass GB, Lee DH, Hardy WW. Hydroxocobalamin. II. Absorption from the site of injection and uptake by the liver and calf muscle in man. *Blood* 1961;18:522-6.
- 232.** Herbert V, Zalusky R, Skeggs HR. Retention of injected hydroxocobalamin versus cyanocobalamin versus liver extract-bound cobalamin. *Am J Clin Nutr* 1963;12:145-9.
- 233.** Hertz H, Kristensen HP, Hoff-Jorgensen E. Studies on vitamin B12 retention. Comparison of retention following intramuscular injection of cyanocobalamin and hydroxocobalamin. *Scand J Haematol* 1964;1:5-15.
- 234.** Bastrup-Madsen P. Treatment of vitamin B12 deficiency. Evaluation of therapy with cyanocobalamin, hydroxocobalamin, and depot cobalamin Betolvex. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1974;29:89-95.
- 235.** Hall CA, Begley JA, Green-Colligan PD. The availability of therapeutic hydroxocobalamin to cells. *Blood* 1984;63:335-41.
- 236.** Berninger TA, Bird AC, Arden GB. Leber's hereditary optic atrophy. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1989;10:211-27.
- 237.** Freeman AG. Cyanocobalamin a case for withdrawal: discussion paper. *J R Soc Med* 1992;85:686-7.

- 238.** Berlin R. Vitamin B12 injections. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291:56.
- 239.** Lederle FA. Oral cobalamin for pernicious anemia. Medicine's best kept secret?. *JAMA* 1991;265:94-5.
- 240.** Nyholm ES. Oral o parenteral therapy for vitamin B12 deficiency. *Lancet* 1999;353:411.
- 241.** Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. *Acta Med Scand* 1968;184:247-58.
- 242.** Elia M. Oral or parenteral therapy for B12 deficiency. *Lancet* 1998;352:1721-2.
- 243.** Kuzminski AM, Del Giacco EJ, Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 1998;92:1191-8.
- 244.** Bolaman Z, Kadikoylu G, Yukselen V, Yavasoglu I, Barutca S, Senturk T. Oral versus intramuscular cobalamin treatment in megaloblastic anemia: a single-center, prospective, randomized, open-label study. *Clin Ther* 2003;25:3124-34.
- 245.** Andrès E, Affenberger S, Vinzio S, Kurtz JE, Noel E, Kaltenbanch G et al. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: clinical manifestations and treatment. *Am J Med* 2005;118:1154-9.
- 246.** Bulter CC, Vidal-Alaball J, Cannings-John R, McCaddon A, Hood K, Papaioannou A et al. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Fam Pract* 2006;23:279-85.
- 247.** Rabuñal Rey R, Monte Secades R, Peña Zemsch M, Bal Alvarado M, Gómez Gigirey A. Should we use oral replacement for vitamin B12 deficiency as the first option of treatment?. *Rev Clin Esp* 2007;207:179-82.
- 248.** Freeman AG. Oral or parenteral therapy for B12 deficiency. *Lancet* 1999;353:410-1.
- 249.** Freeman AG. Sublingual cobalamin for pernicious anaemia. *Lancet* 1999;354:2080.
- 250.** Zeitlin HC, Sheppard K, Baum JD, Bolton FG, Hall CA. Homozygous transcobalamin II deficiency maintained on oral hydroxocobalamin. *Blood* 1985;66:1022-7.
- 251.** Huemer M, Simma B, Fowler B, Suormala T, Bodamer OA, Sass JO. Prenatal and postnatal treatment in cobalamin C defect. *J Pediatr* 2005;147:469-72.
- 252.** Schiff M, Benoist JF, Tilea B, Royer N, Giraudier S, Ogier de Baulny H. Isolated remethylation disorders: do our treatments benefit patients?. *J Inherit Metab Dis* 2010;34:137-45.
- 253.** Verhaeverbeke I, Mets T, Mulkens K, Vandewoude M. Normalization of low vitamin b12 serum levels in older people by oral treatment. *J Am Geriatr Soc* 1997;45:124-5.
- 254.** Andrès E, Vogel T, Federici L, Zimmer J, Kaltenbach G. Update on oral cyanocobalamin (vitamin B12) treatment in elderly patients. *Drugs Aging* 2008;35:927-32.
- 255.** Lane LA, Rojas-Fernandez C. Treatment of vitamin b(12)-deficiency anemia: oral versus parenteral therapy. *Ann Pharmacother* 2002;36:1268-72.

- 256.** Delpre G, Stark P, Niv Y. Sublingual therapy for cobalamin deficiency as an alternative to oral and parenteral cobalamin supplementation. *Lancet* 1999;354:740-1.
- 257.** Sharabi A, Cohen E, Sulkes J, Garty M. Replacement therapy for vitamin B12 deficiency: comparison between the sublingual and oral route. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56:635-8.
- 258.** Slot WB, Merkus FW, Van Deventer SJ, Tytgat GN. Normalization of plasma vitamin B12 concentration by intranasal hydroxocobalamin in vitamin B12-deficient patients. *Gastroenterology* 1997;113:430-3.
- 259.** Berg MJ, van Dyke DC, Chenard C, Niebyl JR, Hirankarn S, Bendich A et al. Folate, zinc, and vitamin B-12 intake during pregnancy and postpartum. *J Am Diet Assoc* 2001;101:242-5.
- 260.** Schulpis k, Spiropoulos A, Gavrili S, Karikas G, Grigori C, Vlachos G et al. Maternal-neonatal folate and vitamin B12 serum concentrations in Greeks and in Albanian immigrants. *J Hum Nutr Diet* 2004;17:443-8.
- 261.** Baker PN, Wheeler SJ, Sanders TA, Thomas JE, Hutchinson CJ, Clarke K et al. A prospective study of micronutrient status in adolescent pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1114-24.
- 262.** Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. Vitamin B-12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997;66:741-9.
- 263.** Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750-9.
- 264.** Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357-75.
- 265.** Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A et al. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004;33:34-41.
- 266.** Dawber TR, Meadors GF, Moore FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham study. *Am J Pub Health Nations Health* 1951;41:279-86.
- 267.** Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2-11.
- 268.** Scott JM. Bioavailability of vitamin B12. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:S49-53.
- 269.** Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood* 2008;112:2214-21.
- 270.** Tucker KL, Rich S, Rosenberg I, Jacques P, Dallal G, Wilson PW et al. Plasma vitamin B-12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:514-22.
- 271.** Dawson DW, Sawers AH, Sharma RK. Malabsorption of protein bound vitamin B12. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:675-8.
- 272.** Gozzard DI, Dawson DW, Lewis MJ. Experiences with dual protein bound aqueous vitamin B12 absorption test in subjects with low serum vitamin B12 concentrations. *J Clin Pathol* 1987;40:633-7.

- 273.** Bauman WA, Shaw S, Jayatilleke E, Spungen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care* 2000;23:1227-31.
- 274.** Herbert V. The five possible causes of all nutrient deficiency: illustrated by deficiencies of vitamin B12. *Am J Clin Nutr* 1973;26:77-86.
- 275.** Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arch Intern Med* 1996;156:1097-100.
- 276.** Howard JM, Azen C, Jacobsen DW, Green R, Carmel R. Dietary intake of cobalamin in elderly people who have abnormal serum cobalamin, methylmalonic acid and homocysteine levels. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:582-7.
- 277.** Hanger HC, Sainsbury R, Gilchrist NL, Beard ME, Duncan JM. A community study of vitamin B12 and folate levels in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:1155-9.
- 278.** Seal EC, Metz J, Flicker L, Melny J. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral vitamin B12 supplementation in older patients with subnormal or borderline serum vitamin B12 concentrations. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:146-51.
- 279.** Nilsson-Ehle H. Age-related changes in cobalamin (vitamin B12) handling. Implications for therapy. *Drugs Aging* 1998;12:277-92.
- 280.** Döscherholmen A, Ripley D, Chang S, Silvis SE. Influence of age and stomach function on serum vitamin B12 concentration. *Scand J Gastroenterol* 1977;12:313-9.
- 281.** Kasper H. Vitamin absorption in the elderly. *Int J Vitam Nutr Res* 1999;69:169-72.
- 282.** Van Asselt DZ, De Groot LC, Van Staveren WA, Blom HJ, Wevers RA, Biemond I et al. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998;68:328-34.
- 283.** Krasinski SD, Russell RM, Samloff IM, Jacob RA, Dallal GE, McGandy RB et al. Fundic atrophic gastritis in an elderly population. Effect on hemoglobin and several serum nutritional indicators. *J Am Geriatr Soc* 1986;34:800-6.
- 284.** Kaptan K, Beyan C, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Gülsen M et al. *Helicobacter pylori*—is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency?. *Arch Intern Med* 2000;160:1349-53.
- 285.** Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency?. *Am J Clin Nutr* 2009;89:693S-6S.
- 286.** Norman EJ, Morrison JA. Screening elderly populations for cobalamin (vitamin B12) deficiency using the urinary methylmalonic acid assay by gas chromatography mass spectrometry. *Am J Med* 1993;94:589-94.
- 287.** Stabler SP. Screening the older population for cobalamin (vitamin B12) deficiency. *J Am Geriatr Soc* 1995;43:1290-7.
- 288.** 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;90:1586-92.

- 289.** Selhub J, Morris MS, Jaques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B-12 interaction to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamina B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr* 2009;89:702S-6S.
- 290.** Rothenberg SP. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. *Semin Hematol* 1999;36:65-74.
- 291.** Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Hebert LE, Scherr PA et al. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. *Arch Neurol* 2005;62:641-5.
- 292.** Clarke R, Birks J, Nexo E, Ueland PM, Schneede J, Scott J et al. Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1384-91.
- 293.** Smith AD. The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine?. *Food Nutr Bull* 2008;29:S143-72.
- 294.** Kivipelto M, Annerbo S, Hultdin J, Bäckman L, Viitanen M, Fratiglioni L et al. Homocysteine and holo-transcobalamin and the risk of dementia and Alzheimers disease: a prospective study. *Eur J Neurol* 2009;16:808-13.
- 295.** Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002;159:2099-101.
- 296.** Robinson DJ, O'Luanaigh C, Tehee E, O'Connell H, Hamilton F, Chin AV et al. Association between holotranscobalamin, vitamin B12, homocysteine and depressive symptoms in community-dwelling elders. *Int J Geriatr Psychiatry* 2011;26:307-13.
- 297.** Sachdev PS, Parslow RA, Lux O, Salonikas C, Wen W, Naidoo D et al. Relationship of homocysteine, folic acid and vitamin B12 with depression in a middle-aged community sample. *Psychol Med* 2005;35:529-38.
- 298.** Beydoun MA, Shroff MR, Beydoun HA, Zonderman AB. Serum folate, vitamin B-12, and homocysteine and their association with depressive symptoms among U.S. adults. *Psychosom Med* 2010;72:862-73.
- 299.** Jensen E, Dehlin O, Erfurth EM, Hagberg B, Samuelsson G, Svensson T et al. Plasma homocysteine in 80-year-olds: relationships to medical, psychological and social variables. *Arch Gerontol Geriatr* 1998;26:215-26.
- 300.** Kado DM, Bucur A, Selhub J, Rowe JW, Seeman T. Homocysteine levels and decline in physical function: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med* 2002;113:537-42.
- 301.** Valente E, Scott JM, Ueland PM, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011;57:856-63.
- 302.** Garry PJ, Goodwin JS, Hunt WC. Folate and vitamin B12 status in a healthy elderly population. *J Am Geriatr Soc* 1984;32:719-26.
- 303.** Barber KE, Christie ML, Thula R, Cutfield RG. Vitamin B12 concentrations in the elderly: a regional study. *N Z Med J* 1989;102:402-4.
- 304.** Koebnick C, Heins UA, Dagnelie PC, Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID, Hothorn T et al. Longitudinal concentrations of vitamin B(12) and vitamin B(12) binding proteins during uncomplicated pregnancy. *Clin Chem* 2002;48:928-33.

- 305.** Boger WP, Wright LD, Beck GD, Bayne GM. Vit B12: correlation of serum concentrations and pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:140-3.
- 306.** Temperley IJ, Meehan MJ, Gatenby PB. Serum vitamin B12 levels in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1968;75:511-6.
- 307.** Baker H, DeAngelis B, Holland B, Gittens-Williams L, Barrett T Jr. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. *J Am Coll Nutr* 2002;21:33-7.
- 308.** Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD, Schneede J, Arija V et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin status in healthy women and their offspring. *J Nutr* 2007;137:1863-7.
- 309.** Lowenstein L, Lalonde M, Deschenes EB, Shapiro L. Vitamin B12 in pregnancy and the puerperium. *Am J Clin Nutr* 1960;8:265-75.
- 310.** Young JE, Barrows C Jr, Okuda K, Chow BF. Vitamin B12 serum level in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1959;14:149-53.
- 311.** Bartels PC, Helleman PW, Soons JB. Investigation of red cell size-distribution histograms related to folate, vitamin B12 and iron state in the course of pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 1989;49:763-71.
- 312.** Takimoto H, Mito N, Umegaki K, Ishiwaki A, Kusama K, Abe S et al. Relationship between dietary folate intakes, maternal plasma total homocysteine and B-vitamins during pregnancy and fetal growth in Japan. *Eur J Nutr* 2007;46:300-6.
- 313.** Barón MA, Solano L, Peña E, Morón A. Nutritional status of folate, vitamin B12 and iron in pregnant adolescents. *Arch Latinoam Nutr* 2003;53:150-6.
- 314.** Milman N, Byg KE, Bergholt T, Eriksen L, Hvas AM. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women. *Eur J Haematol* 2006;76:521-5.
- 315.** Koebnick C, Hoffmann I, Dagnelie PC, Heins UA, Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID et al. Long-term ovo-lacto vegetarian diet impairs vitamin B-12 status in pregnant women. *J Nutr* 2004;134:3319-26.
- 316.** Mahfoud A, Domínguez CL, Rodríguez D, Giamporcaro R. Nutritional deficiency of vitamin B12 in infancy as a cause of encephalopathy. *Rev Neurol* 2009;48:444-5.
- 317.** Kühne T, Bubl R, Baumgartner R. Maternal vegan diet causing a serious infantile neurological disorder due to vitamin B12 deficiency. *Eur J Pediatr* 1991;150:205-8.
- 318.** Weiss R, Fogelman Y, Bennett M. Severe vitamin B12 deficiency in an infant associated with a maternal deficiency and a strict vegetarian diet. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:270-1.
- 319.** Casella EB, Valente M, de Navarro JM, Kok F. Vitamin B12 deficiency in infancy as a cause of developmental regression. *Brain Dev* 2005;27:592-4.
- 320.** Shojania AM. Folic acid and vitamin B12 deficiency in pregnancy and in neonatal period. *Clin Perinatol* 1984;11:433-59.
- 321.** Serra-Majem L, Bes-Rastrollo M, Román-Viñas B, Pfrimer K, Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA. Dietary patterns and nutritional adequacy in a Mediterranean country. *Br J Nutr* 2009;101:S21-8.

- 322.** Allen LH. Vitamin B12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. *Adv Exp med Biol* 1994;352:173-86.
- 323.** Srilakshmi B. *Dietetics*. 5th. New Delhi: New Age Internatinal (P) Ltd ;2006.
- 324.** Chanarin I. *The megaloblastic anaemias*, 2nd ed. London: Blackwell Scientific Publications;1979.
- 325.** McLintock C, Repke JT, Buckin B. Hematologic disease in pregnancy. In: Powrie RO, Greene MF, Camann W (editors). *De Swiet's Medical disorders in obstetric practice*. 5th ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010. p.48-81.
- 326.** Relton CL, Pearce MS, Parker L. The influence of erythrocyte folate and serum vitamin B12 status on birth weight. *Br J Nutr* 2005;93:593-9.
- 327.** Koc A, Kocyigit A, Soran M, Demir N, Sevinc E, Erel O et al. High frequency of maternal vitamin B12 deficiency as an important cause of infantile vitamin B12 deficiency in Sanliurfa province of Turkey. *Eur J Nutr* 2006;45:291-7.
- 328.** Molina VC, Médici M, Taranto MP, Font de Valdez G. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 2008;62:162-8.
- 329.** Molina VC, Médici M, Taranto MP, Font de Valdez G. *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B deficiency. *J Appl Microbiol* 2009;106:467-73.
- 330.** Hinton CF, Ojodu JA, Fernhoff PM, Rasmussen SA, Scanlon KS, Hannon WH. Maternal and neonatal vitamin B12 deficiency detected through expanded newborn screening—United States, 2003-2007. *J Pediatr* 2010;157:162-3.
- 331.** Meeting maternal nutrient needs during lactation. In: Subcommittee on nutritional during lactation, Committee on nutritional status during pregnancy and lactation, Food and nutrition board, Institute of medicine, National academy of sciences. *Nutritional during lactation*. Washington DC: National Academy Press; 1991. p.213-233.
- 332.** Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J et al. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1385-91.
- 333.** Muthayya S, Kurpad AV, Duggan CP, Bosch RJ, Dwarkanath P, Mhaskar A et al. Low maternal vitamin B12 status is associated with intrauterine growth retardation in urban South Indians. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:971-801.
- 334.** Hogeveen M, Blom HJ, van der Heijden EH, Semmekrot BA, Sporcken JM, Ueland PM et al. Maternal homocysteine and related B vitamins as risk factors for low birthweight. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:572.e1-6.
- 335.** Yajnik CS, Deshpande SS, Panchanadikar AV, Naik SS, Deshpande JA, Coyaji KJ et al. Maternal total homocysteine concentration and neonatal size in India. *Asia Pac J Clin Nutr* 2005;14:179-81.
- 336.** Krishnaveni GV, Hill JC, Veena SR, Bhat DS, Wills AK, Karat CL et al. Low plasma vitamin B(12) in pregnancy is associated with gestational "diabesity" and later diabetes. *Diabetologia* 2009;2350-8.

- 337.** Van den Berg H. Vitamin and mineral status in healthy pregnant women. In: Berger H, editor. *Vitamins and minerals in pregnancy and lactation*, Nestle Nutrition Workshop Series vol. 16. New York: Nestec Ltd Verey/Raven Press Ltd; 1988.p.93-107.
- 338.** Chéry C, Barbé F, Lequere C, Abdelmouttaleb I, Gérard P, Barbarino P et al. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1105-8.
- 339.** Hay G, Clausen T, Whitelaw A, Trygg K, Johnston C, Henriksen T et al. Maternal folate and cobalamin status predicts vitamin status in newborn and 6-month-old infants. *J Nutr* 2010;140:557-64.
- 340.** García-Casal MN, Osorio C, Landaeta M, Leets I, Matus P, Fazzino F et al. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1064-70.
- 341.** Hussein L, Abdel Aziz S, Tapouzada S, Boehles H. Serum vitamin B(12) concentrations among mothers and newborns and follow-up study to assess implication on the growth velocity and the urinary methylmalonic acid excretion. *Int J Vitam Nutr Res* 2009;79:297-307.
- 342.** Brabin BJ, van den Berg H, Nijmeyer F. Folic acid, cobalamin, and hematological status during pregnancy in rural Kenya: the influence of parity, gestation, and Plasmodium falciparum malaria. *Am J Clin Nutr* 1986;43:803-15.
- 343.** Bondevik GT, Schneede J, Refsum H, Lie RT, Ulstein M, Kvale G. Homocysteine and methylmalonic acid levels in pregnant Nepali women. Should cobalamin supplementation be considered?. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:856-64.
- 344.** Metz J, McGrath K, Bennett M, Hyland K, Bottiglieri T. Biochemical indices of vitamin B12 nutrition in pregnant patients with subnormal serum vitamin B12 levels. *Am J Hematol* 1995;48:251-5.
- 345.** Pardo J, Peled Y, Bar J, Hod M, Sela BA, Rafael ZB et al. Evaluation of low serum vitamin B(12) in the non-anaemic pregnant patient. *Hum Reprod* 2000;15:224-6.
- 346.** Morkbak AL, Hvas AM, Milman N, Nexø E. Holotranscobalamin remains unchanged during pregnancy. Longitudinal changes of cobalamins and their binding proteins during pregnancy and postpartum. *Haematologica* 2007;92:1711-2.
- 347.** Gadowsky SL, Gale K, Wolfe SA, Jory J, Gibson R, O'Connor DL. Biochemical folate, B12, and iron status of a group of pregnant adolescents accessed through the public health system in southern Ontario. *J Adolesc Health* 1995;16:465-74.
- 348.** Metz J, Festenstein H, Welch P. Effect of folic acid and vitamin B12 supplementation on tests of folate and vitamin B12 nutrition in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1965;16:472-9.
- 349.** Edelstein T, Stevens K, Baumslag N, Metz J. Folic acid and vitamin B12 supplementation during pregnancy in a population subsisting on a suboptimal diet. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1968;75:133-47.
- 350.** Bruinse HW, van den Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61:31-7.
- 351.** Erdberg MR, Baker H, Pasher I, Sobotka H. Study of the roles of folic acid and vitamin B12 in pregnancy.II. *Am J Obstet Gynecol* 1958;75:767-72.

- 352.** Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, Martinez H, Lopez P, Muñoz E et al. Vitamin B-12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1013-9.
- 353.** Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *BJOG* 2002;109:784-91.
- 354.** Ziffer H, Baker H, Pasher I, Sobotka H. A comparison of maternal and foetal folic acid and vitamin B12 at parturition. *Br Med J* 1958;1:978-9.
- 355.** Molloy AM, Mills JL, McPartlin J, Kirke PN, Scott JM, Daly S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B12, and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:499-503.
- 356.** Obeid R, Munz W, Jäger M, Schmidt W, Herrmann W. Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. *Am J Clin Nutr* 2005;82:133-9.
- 357.** Muthayya S, Dwarkanath P, Mhaskar M, Mhaskar R, Thomas A, Duggan C et al. The relationship of neonatal serum vitamin B12 status with birth weight. *Asia Pac J Clin Nutr* 2006;15:538-43.
- 358.** Baker H, Frank O, Thomson AD, Langer A, Munves ED, De Angelis B et al. Vitamin profile of 174 mothers and newborns at parturition. *Am J Clin Nutr* 1975;28:59-65.
- 359.** Okuda K, Helliger AE, Chow BF. Vitamin B12 serum level and pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1956;4:440-3.
- 360.** Abbas A, Snijders RJ, Sadullah S, Nicolaidis KH. Fetal blood ferritin and cobalamin in normal pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 1994;9:14-8.
- 361.** Graber SE, Scheffel U, Hodgkinson B, McIntyre PA. Placental transport of vitamin B12 in the pregnant rat. *J Clin Invest* 1971;50:1000-4.
- 362.** Giugliani ER, Jorge SM, Gonçalves AL. Serum vitamin B12 levels in parturients, in the intervillous space of the placenta and in full-term newborns and their interrelationships with folate levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41:330-5.
- 363.** Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio Neto LF, D'Almeida V et al. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1312-21.
- 364.** Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 2004;50:1406-12.
- 365.** Molloy AM, Mills JL, Cox C, Daly SF, Conley M, Brody LC et al. Choline and homocysteine interrelations in umbilical cord and maternal plasma at delivery. *Am J Clin Nutr* 2005;82:836-42.
- 366.** Pardo J, Gindes L, Orvieto R. Cobalamin (vitamin B12) metabolism during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;84:77-8.

- 367.** Overbergh L, Lorent K, Torrekens S, Van Leuven F, Van den Berghe H. Expression of mouse alpha-macroglobulins, lipoprotein receptor-related protein, LDL receptor, apolipoprotein E, and lipoprotein lipase in pregnancy. *J Lipid Res* 1995;36:1774-86.
- 368.** Bonet B, Brunzell JD, Gown AM, Knopp RH. Metabolism of very-low-density lipoprotein triglyceride by human placental cells: the role of lipoprotein lipase. *Metabolism* 1992;41:596-603.
- 369.** Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE, Guttormsen AB, Markestad T, Solheim E et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001;108:624-30.
- 370.** Bjorke-Monsen AL, Torsvik I, Saetran H, Markestad T, Ueland PM. Common metabolic profile in infants indicating impaired cobalamin status responds to cobalamin supplementation. *Pediatrics* 2008;122:83-91.
- 371.** Jackson IM, Doig WB, McDonald G. Pernicious anaemia as a cause of infertility. *Lancet* 1967;2:1159-60.
- 372.** Hall M, Davidson RJ. Prophylactic folic acid in women with pernicious anaemia pregnant after periods of infertility. *J Clin Pathol* 1968; 21:599-602.
- 373.** Sanfilippo JS, Liu YK. Vitamin B12 deficiency and infertility: report of a case. *Int J Fertil* 1991;36:36-8.
- 374.** Bennett M. Vitamin B12 deficiency, infertility and recurrent fetal loss. *J Reprod Med* 2001;46:209-12.
- 375.** Reznikoff-Etiévant MF, Zittoun J, Vaylet C, Pernet P, Milliez J. Low vitamin B(12) level as a risk factor for very early recurrent abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;104:156-9.
- 376.** McLean E, de Benoist B, Allen LH. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull* 2008;29:S38-51.
- 377.** Ray JG, Goodman J, O'Mahoney PR, Mamdani MM, Jiang D. High rate of maternal vitamin B12 deficiency nearly a decade after Canadian folic acid flour fortification. *QJM* 2008;101:475-7.
- 378.** Felkner M, Suarez L, Canfield MA, Brender JD, Sun Q. Maternal serum homocysteine and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009;85:574-81.
- 379.** Wang L, Wang F, Guan J, Le J, Wu L, Zou J et al. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1359-67.
- 380.** O'Dell BL, Whitley JR, Hogan AG. Vitamin B12, a factor in prevention of hydrocephalus in infant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;76:349-53.
- 381.** Grainger RB, O'Dell BL, Hogan AG. Congenital malformations as related to deficiencies of riboflavin and vitamin B12, source of protein, calcium to phosphorus ratio and skeletal phosphorus metabolism. *J Nutr* 1954;54:33-48.
- 382.** Woodward JC, Newberne PM. The pathogenesis of hydrocephalus in newborn rats deficient in vitamin B12. *J Embryol Exp Morphol* 1967;17:177-87.

- 383.** Schorah CJ, Smithells RW, Scott J. Vitamin B12 and anencephaly. *Lancet* 1980;1:880.
- 384.** Gardiki-Koudiou P, Seller MJ. Amniotic fluid folate, vitamin B12 and transcobalamins in neural tube defects. *Clin Genet* 1988;33:441-8.
- 385.** Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703-8.
- 386.** Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
- 387.** Van der Put NM, Thomas CM, Eskes TK, Trijbels FJ, Steegers-Theunissen RP, Mariman EC et al. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM* 1997;90:505-10.
- 388.** Suarez L, Hendricks K, Felkner M, Gunter E. Maternal serum B12 levels and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population. *Ann Epidemiol* 2003;13:81-8.
- 389.** Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Gooskens RH, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:11-7.
- 390.** Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, Burke H, Sutton M, Brody LC et al. Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification. *Pediatrics* 2009;123:917-23.
- 391.** Zhang T, Xin R, Gu X, Wang F, Pei L, Lin L et al. Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutr* 2009;12:680-6.
- 392.** Wild J, Schorah CJ, Sheldon TA, Smithells RW. Investigation of factor influencing folate status in women who have had a neural tube defect-affected infant. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:546-9.
- 393.** Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 1994;43:1475-80.
- 394.** Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P et al. Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 1992;120:863-71.
- 395.** Afman LA, van der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM* 2001;94:159-66.
- 396.** Ray JG, Wyatt PR, Thompson MD, Vermeulen MJ, Meier C, Wong PY et al. Vitamin B12 and the risk of neural tube defects in a folic-acid-fortified population. *Epidemiology* 2007;18:362-6.
- 397.** Latha V, Sridhar M. Vitamin B supplementation to prevent neural tube defects?. *Indian Pediatr* 2010;47:361-2.
- 398.** Carmel R. Mandatory fortification of the food supply with cobalamin: an idea whose time has not yet come. *J Inherit Metab Dis* 2010;34:67-73.

- 399.** Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999; 67:317-23.
- 400.** Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Weir DG et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359:227-8.
- 401.** Ceyhan ST, Beyan C, Atay V, Yaman H, Alanbay I, Kaptan K et al. Serum vitamin B12 and homocysteine levels in pregnant women with neural tube defect. *Gynecol Endocrinol* 2010;26:578-81.
- 402.** Molloy AM, Kirke P, Hillary I, Weir DG, Scott JM. Maternal serum folate and vitamin B12 concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 1985;60:660-5.
- 403.** Economides DL, Ferguson J, Mackenzie IZ, Darley J, Ware II, Holmes-Siedle M. Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:23-5.
- 404.** Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF et al. Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1436-41.
- 405.** Wald NJ, Hackshaw AD, Stone R, Sourial NA. Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:319-24.
- 406.** Stoll C, Dott B, Alembik Y, Koehl C. Maternal trace elements, vitamin B12, vitamin B, folic acid, and fetal malformations. *Reprod Toxicol* 1999;13:53-7.
- 407.** Weekes EW, Tamura T, Davis RO, Birch R, Vaughn WH, Franklin JC et al. Nutrient levels in amniotic fluid from women with normal and neural tube defect pregnancies. *Biol Neonate* 1992;61:226-31.
- 408.** Steen MT, Boddie AM, Fisher AJ, Macmahon W, Saxe D, Sullivan KM et al. Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1998;18:545-55.
- 409.** Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Van Hook JW. Amniotic fluid B12, calcium, and lead levels associated with neural tube defects. *Am J Perinatol* 1999;16:373-8.
- 410.** Steegers- Theunissen RP, Steegers EA, de Boer R, Thomas CM, Kloosterman MD, Eskes TK. Elevated folate levels in amniotic fluid after oral supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;36:283-91.
- 411.** Li N, Seetharam S, Lindemans J, Alpers DH, Arwert F, Seetharam B. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. *Biochim Biophys Acta* 1993;1172:21-30.
- 412.** Li N, Sood GK, Seetharam S, Seetharam B. Polymorphism of human transcobalamin II: substitution of proline and/or glutamine residues by arginine. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:515-20.

- 413.** Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97:1092-8.
- 414.** Quadros EV, Sai P, Rothenberg SP. Functional human transcobalamin II isoproteins are secreted by insect cells using the baculovirus expression system. *Blood* 1993;81:1239-45.
- 415.** Hansen M, Nexø E. The interaction of human transcobalamin isopeptides in cerebrospinal fluid and plasma with cobalamin and the cellular acceptor. *Biochim Biophys Acta* 1987;926:359-64.
- 416.** Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE, Randaccio L. Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalamin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4386-91.
- 417.** Silla Y, Chandamouli B, Maiti S, Sengupta S. A single nucleotide polymorphism in transcobalamin II (I5V) induces structural changes in the protein as revealed by molecular modeling studies. *Biochemistry* 2011;50:1396-402.
- 418.** Bose S, Feix J, Seetharam S, Seetharam B. Dimerization of transcobalamin II receptor. Requirement of a structurally ordered lipid bilayer. *J Biol Chem* 1996;271:11718-25.
- 419.** Guéant JL, Xiaohong L, Ortiou S, Gérard P, Shue S, Namour F. The association between plasma homocysteine and holotranscobalamin and the transcobalamin 776C>G polymorphism is influenced by folate in the absence of supplementation and fortified diet. *Am J Clin Nutr* 2006;83:171-2.
- 420.** Lievers KJ, Afman LA, Kluijtmans LA, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M et al. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. *Clin Chem* 2002;48:1383-9.
- 421.** Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;100:718-20.
- 422.** Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E et al. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2006;27:294.
- 423.** Namour F, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Guéant JL. Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:769-74.
- 424.** Afman LA, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 2002;10:433-8.
- 425.** Wans S, Schüttler K, Jakubizka S, Müller A, Luley C, Dierkes J. Analysis of the transcobalamin II 776C>G (259P>R) single nucleotide polymorphism by denaturing HPLC in healthy elderly: associations with cobalamin, homocysteine and holo-transcobalamin II. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1532-6.

- 426.** Von Castel-Dunwoody KM, Kauwell GP, Shelnutt KP, Vaughn JD, Griffin ER, Maneval DR et al. Transcobalamin 776C→G polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1436-41.
- 427.** Aléssio AC, Hoehr NF, Siqueira LH, Bydlowski SP, Annichino-Bizzacchi JM. Polymorphism C766G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphism in healthy children. *Throm Res* 2007;119:571-7.
- 428.** Castro R, Barroso M, Rocha M, Esse R, Ramos R, Ravasco P et al. The TCN2 776C>G polymorphism correlates with vitamin B(12) cellular delivery in healthy adult populations. *Clin Biochem* 2010;64:5-9.
- 429.** Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R, Miller JW. Transcobalamin C776G genotype modifies the association between vitamin B12 and homocysteine in older Hispanics. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:503-9.
- 430.** Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M. 776C>G polymorphism of the transcobalamin II gene as a risk factor for spina bifida. *Mol Genet Metab* 2003;80:364.
- 431.** Swanson DA, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Conley M, Weiler A et al. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:239-44.
- 432.** Guéant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett* 2003;344:189-92.
- 433.** Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Rymo L, Zafiropoulos A, Arvanitis DA et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2002;17:3033-6.
- 434.** Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Spada R, Romano A, Fajardo A et al. Association of homocysteine (but not of MTHFR 677 C>T, MTR 2756 A>G and TCN2 776 C>G) with ischaemic cerebrovascular disease in Sicily. *Thromb Haemost* 2006;96:154-9.
- 435.** Zetterberg H, Zafiropoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003;18:1948-50.
- 436.** Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Signore CC, Molloy AM, Cotter A et al. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2005;11:477-80.
- 437.** 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;28:856-65.
- 438.** Li N, Seetharam S, Seetharam B. Genomic structure of human transcobalamin II: comparison to human intrinsic factor and transcobalamin I. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:756-64.
- 439.** Hobbs CA, Cleves MA, Karim MA, Zhao W, MacLeod SL. Maternal folate-related gene environment interactions and congenital heart defects. *Obstet Gynecol* 2010;116:316-22.

- 440.** Zetterberg H, Coppola A, D'Angelo A, Palmér M, Rymo L, Blennow K. No association between the MTHFR A1298C and transcobalamin C776G genetic polymorphisms and hyperhomocysteinemia in thrombotic disease. *Thromb Res* 2002;108:127-31.
- 441.** Pereira AC, Lourenço DM, Maffei FH, Morelli VM, Rollo HA, Zago MA et al. A transcobalamin gene polymorphism and the risk of venous thrombosis. The BRATROS (Brazilian Thrombosis Study). *Thromb Res* 2007;119:183-8.
- 442.** Guéant JL, Chabi NW, Guéant-Rodriguez RM, Mutchinick OM, Debard R, Payet C et al. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C→G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet* 2007;44:363-7.
- 443.** Födinger M, Veitl M, Skoupy S, Wojcik J, Röhrer C, Hagen W et al. Effect of TCN2 776C>G on vitamin B12 cellular availability in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 2003;64:1095-100.
- 444.** Sunder-Plassmann G, Födinger M. Genetic determinants of the homocysteine level. *Kidney Int Suppl* 2003;63:S141-4.
- 445.** Anwar W, Gérard P, Moutabarrek A, Namour F, Guéant JL. End-stage renal disease increases plasma transcobalamin and neutralizes influence of TCN 776C>G polymorphism. *Kidney Int* 2004;66:2092-3.
- 446.** Winkelmayr WC, Skoupy S, Eberle C, Födinger M, Sunder-Plassmann G. Effects of TCN2 776C>G on vitamin B, folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* 2004;65:1877-81.
- 447.** Zetterberg H, Nexö E, Regland B, Minthon L, Boson R, Palmér M et al. The transcobalamin (TC) codon 259 genetic polymorphism influences holo-TC concentration in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *Clin Chem* 2003;49:1195-8.
- 448.** James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B:947-56.
- 449.** Rosenblatt DS, Cooper BA, Lue-Shing S, Wong PW, Berlow S, Narisawa K et al. Folate distribution in cultured human cells. Studies on 5,10-CH₂-H₄PteGlu reductase deficiency. *J Clin Invest* 1979;63:1019-25.
- 450.** 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;10:111-3.
- 451.** Murakami S, Matsubara N, Saitoh M, Miyakaw S, Shoji M, Kubo T. The relation between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res* 2001;27:349-52.
- 452.** Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998;62:1258-60.
- 453.** Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-21.
- 454.** Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtil Ellison R et al. The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001;156:409-15.

- 455.** Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45.
- 456.** Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet* 1997;350:861.
- 457.** Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 1998; 69:152-4.
- 458.** Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006;131:395-401.
- 459.** Van der Molen EF, Arends GE, Nelen WL, van der Put NJ, Heil SG, Eskes TK et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1258-63.
- 460.** Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM et al. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM* 1995;88:763-6.
- 461.** Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H et al. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am Hum Genet* 1999;64:1045-55.
- 462.** Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R et al. Genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151-7.
- 463.** Brouns R, Ursem N, Lindemans J, Hop W, Pluijm S, Steegers E et al. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. *Prenat Diagn* 2008;28:485-93.
- 464.** Naushad SM, Devi AR. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. *J Perinat Med* 2010;38:63-9.
- 465.** 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;346:1070-1.
- 466.** Muñoz JB, Lacasaña M, Cavazos RG, Borja-Aburto VH, Galavíz-Hernández C, Garduño CA. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod* 2007;13:419-24.
- 467.** De Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R et al. The C667T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1998;35:1009-13.
- 468.** Mornet E, Muller F, Lenvoisé-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997;100:512-4.

- 469.** Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998;157:487-92.
- 470.** 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;93:7-9.
- 471.** 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;349:1591-3.
- 472.** 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;128:1336-41.
- 473.** Botto LD, Mulinare J. Re:Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1999;150:323-4.
- 474.** Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:569-73.
- 475.** 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;77:687-93.
- 476.** Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142-50.
- 477.** 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;11:671-8.
- 478.** Kim OJ, Hong SP, Ahn JY, Hong SH, Hwang TS, Kim SO et al. Influence of combined methionine synthase (MTR 2756A>G) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with ischemic stroke. *Yonsei Med J* 2007;48:201-9.
- 479.** Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Cappucci G, Paladini D, Martinelli P et al. Factor V Leiden, C>T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997;77:1052-4.
- 480.** Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet* 1997;34:525-6.
- 481.** Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and adverse outcomes of pregnancy: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Med* 2004;117:26-31.

- 482.** Also-Rallo E, Lopez-Quesada E, Urreizti R, Vilaseca MA, Laila JM, Balcells S et al. Polymorphisms of genes involved in homocysteine metabolism in preeclampsia and in uncomplicated pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;120:45-52.
- 483.** Ananth CV, Peltier MR, De Marco C, Elsasser DA, Getahun D, Rozen R et al. Associations between 2 polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and placental abruption. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:385.
- 484.** Da Silva LR, Vergani N, Galdieri L de C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet A* 2005;135:263-7.
- 485.** James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
- 486.** Chadeaux-Vekemans B, Coudé M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jaïs J et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002;51:766-7.
- 487.** Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;121A:219-24.
- 488.** Chango A, Potier De Courcy G, Boisson F, Guillard JC, Barbé F, Perrin MO et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults the Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort. *Br J Nutr* 2000;84:891-6.
- 489.** James SJ. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. *Am J Med Genet A* 2004;127A:1-4.
- 490.** Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and methionine synthase 2756A→G polymorphisms: a study of 2168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:2175-80.
- 491.** Yates Z, Lucock M. Methionine synthase polymorphism A2756G is associated with susceptibility for thromboembolic events and altered B vitamin/thiol metabolism. *Haematologica* 2002;751-6.
- 492.** Regland B. Schizophrenia and single-carbon metabolism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:1124-32.
- 493.** Slopian R, Jasiewicz K, Meczekalski B, Warenik-Szymankiewicz A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of genes encoding MTHFR, MTR, and MTHFD1 and the risk of depression in postmenopausal women in Poland. *Maturitas* 2008;61:252-5.
- 494.** Van der Put NM, Gabreëls 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;62:1044-51.

- 495.** Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
- 496.** Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ, Jonas PA, Burgess T, Binks K et al. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet Metab* 2004;81:273-81.
- 497.** Wiltshire EJ, Mohsin F, Chan A, Donaghue KC. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genen polymorphisms and protection from microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2008;9:348-53.
- 498.** Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, Goldschmidt N, Wexler ID, Ben-Yehuda A et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr* 2000;130:2493-7.
- 499.** Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;61:3272-5.
- 500.** Stolzenberg-Solomon RZ, Qiao YL, Abnet CC, Ratnasinghe DL, Dawsey SM, Dong ZW et al. Esophageal and gastric cardia cancer risk and folate- and vitamin B(12)-related polymorphisms in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1222-6.
- 501.** Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002;132:1872-8.
- 502.** Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997;66:269-313.
- 503.** Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3059-64.
- 504.** Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-74.
- 505.** Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:3628-34.
- 506.** Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1851-8.
- 507.** Luccock MD, Wild J, Lumb CH, Oliver M, Kendall R, Daskalakis I et al. Risk of neural tube defect-affected pregnancy is associated with block in maternal one-carbon metabolism at the level of N-5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase. *Biochem Mol Med* 1997;61:28-40.
- 508.** Luccock MD, Daskalakis I, Lumb CH, Schorah CJ, Levene MI. Impaired regeneration of monoglutamyl tetrahydrofolate leads to cellular folate depletion in mothers affected by a spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metab* 1998;65:18-30.

- 509.** Shaw GM, Todoroff K, Finnell RH, Lammer EJ, Leclerc D, Gravel RA et al. Infant methionine synthase variants and risk for spina bifida. *J Med Genet* 1999;36:86-7.
- 510.** Al Farra HY. Methionine synthase polymorphisms (MTR 2756 A>G and MTR 2758 C>G) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan. *Indian J Hum Genet* 2010;16:138-43.
- 511.** Morrison K, Edwards YH, Lynch SA, Burn J, Hol F, Mariman E. Methionine synthase and neural tube defects. *J Med Genet* 1997;34:958.
- 512.** Van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 1997;8:511-7.
- 513.** Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE et al. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *QJM* 1996;89:571-7.
- 514.** Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 1999;17:298-309.
- 515.** Hyndman ME, Bridge PJ, Warnica JW, Fick G, Parsons HG. Effect of heterozygosity for the methionine synthase A→G mutation on the risk for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol* 2000;86:1144-6.
- 516.** Klerk M, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, den Heijer M, Schouten EG et al. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thromb Res* 2003;110:87-91.
- 517.** Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000;149:131-7.
- 518.** Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;154:667-72.
- 519.** Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, Welch R et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* 2007;120:2696-703.
- 520.** Semmler A, Simon M, Moskau S, Linnebank M. Polymorphisms of methionine metabolism and susceptibility to meningioma formation: laboratory investigation. *J Neurosurg* 2008;108:999-1004.
- 521.** Kurzwelly D, Knop S, Guenther M, Loeffler J, Korfel A, Thiel E et al. Genetic variants of folate and methionine metabolism and PCNSL incidence in a German patient population. *J Neurooncol* 2010;100:187-92.
- 522.** 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;62:4519-24.

- 523.** 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;157:451-6.
- 524.** Guéant-Rodriguez RM, Jullière Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTR A2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005;94:510-5.
- 525.** 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;168:315-22.
- 526.** Kim SY, Park SY, Choi JW, Kim DJ, Lee SY, Lim JH et al. Association between MTHFR 1298A>C polymorphism and spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy. *Am J Reprod Immunol* 2011;66:252-8.
- 527.** Popp RA, Trifa AP, Militaru M, Crisan TO, Petrisor F, Farcas MF et al. Methionine synthase reductase (MTRR) gene 66G>A polymorphism as a possible risk factor for recurrent spontaneous abortion. *Annals of RSCB* 2009;14:28-32.
- 528.** Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M. Polymorphism of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. *J Appl Genet* 2003;44:111-3.
- 529.** Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, Laffling AJ, Jonas PA, Lynch SA et al. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. *J Med Genet* 2004;41:256-60.
- 530.** Gos M, Sliwerska E, Szecht-Potocka A. Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory genes in Polish families with neural tube defects. *J Appl Genet* 2004;45:363-8.
- 531.** 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;85:220-7.
- 532.** Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1188-93.
- 533.** 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 matern risk factor for spina bifida. *J Mol Med* 2006;84:1047-54.
- 534.** Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-30.
- 535.** O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome?. *Am J Med Genet* 2002;107:151-5.

- 536.** Gast A, Bermejo JL, Flohr T, Stanulla M, Burwinkel B, Schrappe M et al. Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Leukemia* 2007;21:320-5.
- 537.** 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;41:13378-85.
- 538.** Beetstra S, Suthers G, Dhillon V, Salisbury C, Turner J, Altree M et al. Methionine-dependence phenotype in the de novo pathway in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with and without breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2565-71.
- 539.** Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:337-49.
- 540.** Kim DJ, Park BL, Koh JM, Kim GS, Kim LH, Cheong HS et al. Methionine synthase reductase polymorphisms are associated with serum osteocalcin levels in postmenopausal women. *Exp Mol Med* 2006;38:519-24.
- 541.** Ravel C, Chantot-Bastarud S, Chalmey C, Barreiro L, Adnin-Seifer I, Pfeffer J et al. Lack of association between genetic polymorphisms in enzymes associated with folate metabolism and unexplained reduced sperm counts. *PLoS One* 2009;4:e6540.
- 542.** Rouissi K, Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Cherni L, Ben Othman F et al. Polymorphisms in one-carbon metabolism pathway genes and risk for bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195:43-53.
- 543.** Bennett MA. Utilization of homocystine for growth in presence of vitamin B12 and folic acid. *J Biol Chem* 1950;187:751-6.
- 544.** Weissbach H, Taylor RT. Roles of vitamin B12 and folic acid in methionine synthesis. *Vitam Horm* 1970;28:415-40.
- 545.** Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. In: Banerjee R, editor. *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York: John Wiley and Sons;1999.p.681-706.
- 546.** Wilson MC, Farmer JL, Rothman F. Thymidylate synthesis and aminopterin resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1966;92:186-96.
- 547.** Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr* 2004;24:105-31.
- 548.** Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962;41:1263-76.
- 549.** 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;2:337-40.
- 550.** Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985;5:115-41.

- 551.** Katzen HM, Buchanan JM. Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine.8.Repression-derepression, purification, and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*. J Biol Chem 1965;240:825-35.
- 552.** Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. Biochim Biophys Acta 1971;250:459-77.
- 553.** Vanoni MA, Daubner SC, Ballou DP, Matthews RG. Chemistry and Biology of Pteridines.Berlin:Walter de Gruyter;1983.
- 554.** Lavoie A, Tripp E, Hoffbrand AV. The effect of vitamin B12 deficiency on methylfolate metabolism and pteroylpolyglutamate synthesis in human cells. Clin Sci Mol Med 1974;47:617-30.
- 555.** Fujii K, Nagasaki T, Huennekens FM. Accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cobalamin-deficient L1210 mouse leukemia cells. J Biol Chem 1982;257:2144-6.
- 556.** Fowler B, Whithouse C, Wenzel F, Wraith JE. Methionine and serine formation in control and mutant human cultured fibroblasts: evidence for methyl trapping and characterization of remethylation defects. Pediatr Res 1997;41:145-51.
- 557.** Shane B, Watson JE, Stokstad EL. Uptake and metabolism of [3H] folate by normal and by vitamin B-12-and methionine-deficient rats. Biochim Biophys Acta 1977;497:241-52.
- 558.** Tisman G, Herbert V. B12 dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B12 deficiency. Blood 1973;41:465-9.
- 559.** Gutstein S, Bernstein LH, Levy L, Wagner G. Failure of response to N5-methyltetrahydrofolate in combined folate and B12 deficiency. Evidence in support of the "folate trap" hypothesis. Am J Dig Dis 1973;18:142-6.
- 560.** Zittoun J, Marquet J, Zittoun R. Effect of folate and cobalamin compounds on the deoxyuridine suppression test in vitamin B12 and folate deficiency. Blood 1978;51:119-28.
- 561.** Hoffbrand AV, Jackson BF. Correction of the DNA synthesis defect in vitamin B12 deficiency by tetrahydrofolate: evidence in favour of the methyl-folate trap hypothesis as the cause of megaloblastic anaemia in vitamin B12 deficiency. Br J Haematol 1993;83:643-7.
- 562.** Smulders YM, Smith DE, Kok RM, Teerlink T, Swinkels DW, Stehouwer CD et al. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for methylfolate trap. Br J Haematol 2006;132:623-9.
- 563.** Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate. Br Med Bull 1999;55:669-82.
- 564.** Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. Lancet Neurol 2006;5:949-60.
- 565.** Clarke S, Banfiels K. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Camel R, Jacobsen DW, eds. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge, UK:Cambridge University Press;2001.p.63-78.

- 566.** Weir DG, Molloy AM, Keating JN, Young PB, Kennedy S, Kennedy DG et al. Correlation of the ratio of S-adenosyl-L-methionine to S-adenosyl-L-homocysteine in the brain and cerebrospinal fluid of the pig: implications for the determination of this methylation ratio in human brain. *Clin Sci (Lond)* 1992;82:93-7.
- 567.** Molloy AM, Orsi B, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG, Scott JM. The relationship between the activity of methionine synthase and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine in the brain and other tissues of the pig. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1349-55.
- 568.** Lee CC, Surtees R, Duchon LW. Distal motor axonopathy and central nervous system myelin vacuolation caused by cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain* 1992;115:935-55.
- 569.** Weir DG, Scott JM The biochemical basis of the neuropathy in cobalamin deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:479-97.
- 570.** Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. *J Nutr* 2003;133:3731S-9S.
- 571.** Sanderson P, McNulty H, Mastroiacovo P, Mc Dowell IF, Melse-Boonstra A, Finglas PM et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. *Br J Nutr* 2003;90:473-9.
- 572.** 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;135:1139-45.
- 573.** Stover PJ. Folate biochemical pathways and their regulation. In: Bailey LB (ed). *Folate in health and disease*. 2nd ed. USA: Taylor & Francis Group;2010.p.49-74.
- 574.** 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;95:145-51.
- 575.** 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;136:189-94.
- 576.** Ashokkumar B, Mohammed ZM, Vaziri ND, Said HM. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. *Am J Clin Nutr* 2007;86:159-66.
- 577.** 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;65:1790-5.
- 578.** Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged ≥ 60 years in the United States. *Am J Clin Nutr* 2010;92:383-9.
- 579.** Sweeney MR, McPartlin J, Weir DG, Daly S, Pentieva K, Daly L et al. Evidence of unmetabolized folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. *Br J Nutr* 2005;94:727-30.

- 580.** Slesinski MJ, Subar AF, Kahle LL. Dietary intake of fat, fiber and other nutrients is related to the use of vitamin and mineral supplements in the United States: the 1992 National Health Interview Survey. *J Nutr* 1996;126:3001-8.
- 581.** Reynolds E. Fortification of flour with folic acid. Fortification has several potential risks. *BMJ* 2002;324:918.
- 582.** Reynolds E. Effects of folic acid. *Lancet* 2002;359:2039.
- 583.** Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1733-44.
- 584.** 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;356:1795-9.
- 585.** Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:850-61.
- 586.** Kim YI. Will mandatory acid fortification prevent or promote cancer?. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1123-8.
- 587.** Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the *apcMin* mouse. *Cancer Res* 2000;60:5434-40.
- 588.** 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;60:3191-9.
- 589.** Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K et al. Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:269-75.
- 590.** Hibbard BM. The role of folic acid in pregnancy;with particular reference to anaemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964;71:529-42.
- 591.** Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J* 1981;282:1509-11.
- 592.** Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613-9.
- 593.** Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, Rodriguez PL, Martinez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn* 1990;10:149-52.
- 594.** Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP et al. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983;1:1027-37.
- 595.** Medical Research Group (MRC) Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
- 596.** Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.

- 597.** 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;41:1-7.
- 598.** Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention.
- 599.** Bailey LB. Dietary reference intakes for folate: the debut of dietary folate equivalents. *Nutr Rev* 1998;294-9.
- 600.** International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual Report 2008 (with data for 2006). Italy: The international centre of Birth Defects-ICBDSR Centre;2008.p.216-20.
- 601.** Coll O, Pisa S, Palacio M, Quinto L, Cararach V. Awareness of the use of folic acid to prevent neural tube defects in a Mediterranean area. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115:173-7.
- 602.** González González AI, García Carballo M. Folic acid and neural tube defects in Primary Health Care. *Medifam* 2003;13:305-10.
- 603.** Dirección de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sis Nac Salud*. 2001;25:66-7.
- 604.** Martínez-Frías ML; Grupo de trabajo del ECEMC. Folic acid dose in the prevention of congenital defects. *Med Clin (Barc)* 2007;128:609-16.
- 605.** Food and Drug Administration. Food standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. 21 CFR Parts 136,137,139. *Fed Reg* 1996:8781-97.
- 606.** 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;57:8-10.
- 607.** Persad VL, Van den Hof MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002;167:241-5.
- 608.** Hertrampf E, Cortés 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;133:3166-9.
- 609.** Chen LT, Rivera MA. The Costa Rica experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev* 2004;62:S40-3.
- 610.** Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin Status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82:442-50.
- 611.** Rosenberg IH. Science-based micronutrient fortification: which nutrients, how much, and how to know?. *Am J Clin Nutr* 2005;82:279-80.
- 612.** Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chem* 2000;70:275-89.

- 613.** Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final rule. Fed.Regist 1996;61:8781-97.
- 614.** Choumenkovitch SF, Selhub J, Wilson PW, Rade JJ, Rosenberg IH, Jacques PF. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. J Nutr 2002;132:2792-8.
- 615.** Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. Am J Clin Nutr 2003;77:8-9.
- 616.** Yeung L, Yang Q, Berry RJ. Contributions of total daily intake of folic acid to serum folate concentrations. JAMA 2008;300:2486-7.
- 617.** 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;91:231-7.
- 618.** Ervin RB, Wright JD, Kennedy-Stephenson J. Use of dietary supplements in the United States, 1988-94. Vital Health Stat 11 1999;244:1-14.
- 619.** Bailey RL, McDowell MA, Dodd KW, Gahche JJ, Dwyer JT, Picciano MF. Total folate and folic acid intakes from foods and dietary supplements of US children aged 1-13y. Am J Clin Nutr 2010;92:353-8.
- 620.** Mills JL, Von Kohorn I, Conley MR, Zeller JA, Cox C, Williamson RE et al. Low vitamin B-12 concentrations in patients without anemia: the effect of folic acid fortification of grain. Am J Clin Nutr 2003;77:1474-7.
- 621.** Oakley GP Jr. Let's increase folic acid fortification and include vitamin B12. Am J Clin Nutr 1997;65:1889-90.
- 622.** Freire WB, Howson CP, Cordero JF. Recommended levels of folic acid and vitamin B12 fortification: a PAHO/MOD/CDC technical consultation. Nutr Rev 2004;62:S1-2.
- 623.** Food and Nutrition Program of the Pan American Health Organization; March of Dimes; Centers for Disease Control and Prevention. Nutr Rev 2004;62:S62-6.
- 624.** Carmel R. Efficacy and safety of fortification and supplementation with vitamin B12: biochemical and physiological effects. Food Nutr Bull 2008;29:S177-87.
- 625.** Ray JG, Cole DE, Boss SC. An Ontario-wide study of vitamin B12, serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: is a preventable public health issue on the rise?. Clin Biochem 2000;33:337-43.
- 626.** Ray JG, Vermeulen MJ, Langman LJ, Boss SC, Cole DE. Persistence of vitamin B12 insufficiency among elderly women after folic acid food fortification. Clin Biochem 2003;36:387-91.
- 627.** Shrubsole MJ, Jin F, Dai Q, Shu XO, Potter JD, Hebert JR. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. Cancer Res 2001;61:7136-41.
- 628.** Lajous M, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, Willett W, Romieu I. Folate, vitamina B(6), and vitamina B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:443-8.

- 629.** Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, Chin A Paw MJ, Hiddink GJ, van Dusseldorp M et al. Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *J Nutr* 2003;133:801-7.
- 630.** Stone KL, Bauer DC, Sellmeyer D, Cummings SR. Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1217-21.
- 631.** Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jaques PF, Selhub J, Cupples LA et al. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005;20:152-8.
- 632.** Adams MJ Jr, Khoury MJ, Scanlon KS, Stevenson RE, Knight GJ, Haddow JE et al. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. *Teratology* 1995;51:311-7.
- 633.** Tice JA, Ross E, Coxson PG, Rosenberg I, Weinstein MC, Hunink MG et al. Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond. *JAMA* 2001;286:936-43.
- 634.** Carmel R, Karnaze DS. The deoxyuridine suppression test identifies subtle cobalamin deficiency in patients without typical megaloblastic anemia. *JAMA* 1985;253:1284-7.
- 635.** Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency. Subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrable in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J Lab Clin Med* 1987;109:454-63.
- 636.** Carmel R. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:639-55.
- 637.** Carmel R. The disappearance of cobalamin absorption testing: a critical diagnostic loss. *J Nutr* 2007;137:2481-4.
- 638.** Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750-9.
- 639.** Herbert V. Anti-hyperhomocysteinemic supplemental folic acid and vitamin B12 are significantly destroyed in gastric juice if co-ingested with supplemental vitamin C and iron. *Blood* 1996;88:492.
- 640.** Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 2004;160:339-49.
- 641.** Archer SL, Stamler J, Moag-Stahlberg A, Van Horn L, Garside D, Chan Q et al. Association of dietary supplement use with specific micronutrient intakes middle-aged American men and women: the INTERMAP Study. *J Am Diet Assoc* 2005;105:1106-14.
- 642.** Herbert V, Bigaouette J. Call for endorsement of a petition to the Food and Drug Administration to always add vitamin B-12 to any folate fortification or supplement. *Am J Clin Nutr* 1997;65:572-3.

- 643.** Strouts BL. American Institute of Baking. Evaluation of production and finished quality characteristics of white pan bread fortified with vitamin B-12. Flour fortification initiative, 1998 [consultat al gener 2011]. Disponible a:
<http://www.sph.emory.edu/wheatflour/DOCS/B12whitebreadstudy.pdf>
- 644.** Samaniego Vaesken ML, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Folic acid fortified foods available in Spain: types of products, level of fortification and target population groups. *Nutr Hosp* 2009;24:459-66.
- 645.** 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;141:929-37.
- 646.** World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA*. 1997;277:925-6.
- 647.** Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: and expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
- 648.** Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B₁₂ performed in 96-well microtitre plates. *J Clin Pathol*. 1991;44:592-5.
- 649.** Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43-53.
- 650.** Brattström L. Pregnancy-related decrease in total plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2003;77:993-4.
- 651.** Mount JN, Heduan E, Herd C, Jupp R, Kearney E, Marsh A. Adaptation of coenzyme stimulation assays for the nutritional assessment of vitamins B1, B2, and B6 using the Cobas Bio centrifugal analyser. *Ann Clin Biochem* 1987;24:41-6.
- 652.** 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;50:391-402.
- 653.** McCaddon A, Blennow K, Hudson P, Regland B, Hill D. Transcobalamin polymorphism and homocysteine. *Blood* 2001;98:3497-9.
- 654.** Protocol de seguiment de l'embaràs a Catalunya. Direcció General de Salut Pública. 2ª ed.rev. Barcelona:Treballs Gràfics, AS, 2005.
- 655.** Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. La medición de la Clase Social en Ciencias de la Salud. Barcelona:SG Editores; 1995.
- 656.** Kahn SR, Platt R, McNamara H, Rozen R, Chen MF, Genest J Jr et al. Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:151.
- 657.** 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.
- 658.** Van den Boom A, Serra-Majem LI, Ribas L, Ngo J, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J et al. The contribution of ready to eat cereals to daily nutrient intake and breakfast quality in a Mediterranean setting. *J Am Coll Nutr* 2006;25:135-43.

- 659.** World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia [consultat al gener del 2011]. Disponible a: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
- 660.** Nguyen RH, Wilcox AJ. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Health* 2005;59:1019-21.
- 661.** Tablas españolas de pesos neonatales según edad gestacional. Santamaría R, Verdú LI, Martín C, García G. Laboratorios Menarini, S.A. 1998 [consultat al febrer del 2011]. Disponible a: <http://www.mashierro.com/pages/pesos-neonatales.php>
- 662.** Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996;18:188-204.
- 663.** Midttun Ø, Hustad S, Ueland PM. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:1371-9.
- 664.** Departament de Salut. Direcció General de Salut Pública. El Pla de salut a prop: Pla de Catalunya 1996-1998. [Consultat el gener 2011] disponible a: <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/pdf/pla19962.pdf>
- 665.** Ministerio de sanidad. Sanidad 2008. Prevención de los problemas derivados del alcohol. [Consultat el gener 2011] disponible a: <http://www.msps.es/alcoholJovenes/docs/prevencionProblemasAlcohol.pdf>
- 666.** Departament de Salut. Direcció General de Salut Pública. Hàbit de fumar. Prevalença per sexe i grups d'edat. [Consultat el gener 2011] disponible a: <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=820&t=1998&x=8&y=9>
- 667.** Subdirecció General de Drogodependències. Direcció General de Salut Pública. Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España 2005-2006. *Observatorio Español sobre Drogas. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.* [Consultat el gener 2011] disponible a: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/Domiciliaria2005-2006.pdf>
- 668.** Varela-Moreiras G, Escudero JM, Alonso-Apperte E. Homocysteine related vitamins and lifestyles in teh elderly people: The SENECA study. *Nutr Hosp* 2007;22:363-70.
- 669.** García Closas R, Serra Majem L, Sabater Sales G, Olmos Castellvell M, Ribas Baraba L, Salleras Sanmartí L. Distribution of the serum concentration of vitamin C, folic acid and vitamin B12 in a representatives ample of the adult population of Catalonia (Spain). *Med Clin (Barc)* 2002;118:135-41.
- 670.** 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;53:781-4.
- 671.** Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60:618-26.
- 672.** Haller J, Löwik MR, Ferry M, Ferro-Luzzi A. Nutritional status: blood vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotene, Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:63-82.

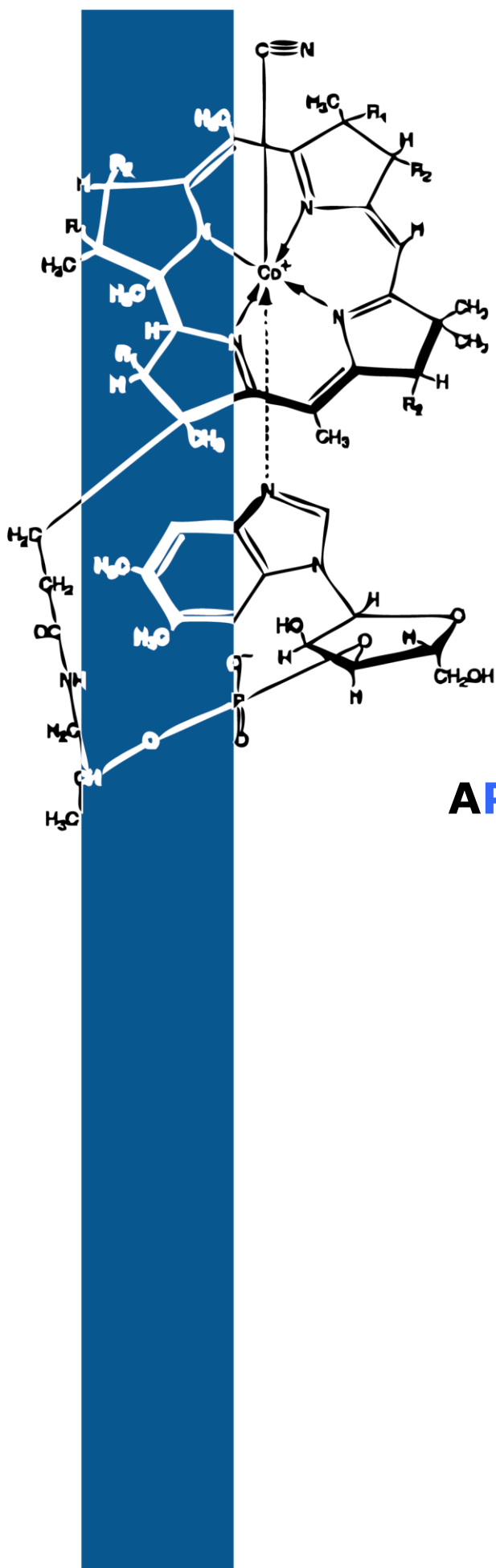
- 673.** Planells E, Sánchez C, Montellano MA, Mataix J, Llopis J. Vitamins B6 and B12 and folate status in an adult Mediterranean population. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:777-85.
- 674.** Henríquez Sánchez P, Díaz Romero C, Rodríguez Rodríguez E, López Blanco F, Álvarez León E, Serra Majem L et al. Evaluación bioquímica del estado nutricional de la población canaria (1998). *Arch Latinoam nutr* 2000;50:43-54.
- 675.** Guillén M, Corella D, Portolés O, González JI, Mulet F, Sáiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17:255-61.
- 676.** Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-7.
- 677.** Eussen SJ, Vollset SE, Hustad, Midttun Ø, Meyer K, Fredriksen A et al. Plasma vitamins B2, B6, and B12, and related genetic variants as predictors of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2549-61.
- 678.** 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;6:359-65.
- 679.** McNulty H, McKinley MC, Wilson B, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG et al. Impaired functioning of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status: implications for riboflavin requirements. *Am J Clin Nutr* 2002;76:436-41.
- 680.** Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjørke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000;46:1065-71.
- 681.** Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, Russo GT, Rogers G, Wilson PW et al. The relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2002;132:283-8.
- 682.** McNulty H, Pentieva K, Hoey L, Ward M. Homocysteine, B-vitamins and CVD. *Proc Nutr Soc* 2008;67:232-7.
- 683.** Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, Zampelas A, Papademetriou L et al. The associations between smoking, physical activity, dietary habits and plasma homocysteine levels in cardiovascular disease-free people: the "ATTICA" study. *Vasc Med* 2004;9:117-23.
- 684.** Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palmér M, Rymo L, Blennow K et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. *Int J Mol Med* 2004;13:811-5.
- 685.** De Jong-Van den Berg LT, Hernandez-Diaz S, Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Trends and predictors of folic acid awareness and periconceptional use in pregnant women. *Am J Obstet Gynaecol* 2005;192:121-8.

- 686.** Idescat. Anuari estadístic de Catalunya. Moviment natural de la població. Padrns municipals d'habitants i censos de població. Taxa de fecunditat 2006-2010. [Consultat al gener 2011] disponible a: <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=288>
- 687.** Ray JG, Singh G, Burrows RF. Evidence for suboptimal use of periconceptional folic acid supplements globally. *BJOG* 2004;111:399-408.
- 688.** Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. Embaràs sense fum 2006-2008. [Consultat el gener 2011] disponible a: <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/pdf/protembaras2007fum.pdf>
- 689.** Ubeda N, Reyes L, González-Medina A, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: a longitudinal study in Spain. *Nutrition* 2011;27:925-30.
- 690.** 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;76:614-9.
- 691.** Lloyd-Wright Z, Hvas AM, Møller J, Sanders TA, Nexø E. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2003;49:2076-8.
- 692.** Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:S47-51.
- 693.** Elliott JA. The effect of pregnancy on the control of lipolysis in fat cells isolated from human adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 1975;5:159-63.
- 694.** Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer to 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *J Lab Clin Med* 1995;126:184-203.
- 695.** Landon MJ, Oxley A. Relation between maternal and infant blood folate activities. *Arch Dis Child* 1971;46:810-4.
- 696.** Infante-Rivard C, Rivard GE, Yotov WV, Théoret Y. Perinatal reference intervals for plasma homocysteine and factors influencing its concentration. *Clin Chem* 2002;48:1100-2.
- 697.** Raijmakers MTM, Roes EM, Steegers EAP, van der Wildt B, Peters WHM. Umbilical cord and maternal plasma thiol concentrations in normal pregnancy. *Clin Chem* 2001;47:749-51.
- 698.** Hay WW Jr. Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res* 1994;42:215-22.
- 699.** Herrera E, Bonet B, Lasunción MA. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: Polin RA, Fox WW. *Fetal and neonatal physiology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998.p.447-458.
- 700.** Coleman RA. The role of the placenta in lipid metabolism and transport. *Semin Perinatol* 1989;13:180-91.
- 701.** Hambræus L. Proprietary milk versus human breast milk in infant feeding. A critical appraisal from the nutritional point of view. *Pediatr Clin North Am* 1977;24:17-36.

- 702.** Barbas C, Herrera E. Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk. *J Physiol Biochem* 1998;54:167-73.
- 703.** Campbell CD, Ganesh J, Ficicioglu C. Two newborns with nutritional vitamin B12 deficiency: challenges in newborn screening for vitamin B12 deficiency. *Haematologica* 2005;90:ECR45.
- 704.** Ayar A, Celik H, Ozcelik O, Kelestimur H. Homocysteine-induced enhancement of spontaneous contractions of myometrium isolated from pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:789-93.
- 705.** Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, Morkbak AL, Hvas AM, Nexø E. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1877-82.
- 706.** Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Scala I, Andria G, Botto L. Frequency of the mutation 677C-T of methylenetetrahydrofolate reductase gene on a sample of 652 Spanish liveborn infants. *Med Clin (Barc)* 2004;122:361-4.
- 707.** Kim KN, Kim YJ, Chang N. Effects of the interaction between the C677T 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and serum B vitamins on homocysteine levels in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:10-6.
- 708.** Mosquera Tenreiro C, Ariza Hevia F, Rodríguez Dehli C, Fernández Toral J, García López E, Riaño Galán I. Prevalence and secular trend of Down syndrome in Asturias (Spain), 1999-2004. *Med Clin (Barc)* 2009;132:580-4.
- 709.** López-Quesada E, Antònia Vilaseca M, Gómez E, Laila JM. Are plasma total homocysteine and other amino acids associated with glucose intolerance in uncomplicated pregnancies and preeclampsia?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;119:36-41.
- 710.** Martínez-Frías ML, Bermejo E, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F et al. Analysis of the frequencies of genotype combinations of 4 polymorphisms of genes acting on the folate cycle in the Spanish population. *Med Clin (Barc)* 2008;131:81-8.
- 711.** Powers RW, Dunbar MS, Gallaher MJ, Roberts JM. The 677 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003;101:762-6.
- 712.** Stewart CP, Christian P, Schulze KJ, Arguello M, Leclercg SC, Khattri SK et al. Low maternal vitamin B-12 status is associated with offspring insulin resistance regardless of antenatal micronutrient supplementation in rural Nepal. *J Nutr* 2011;141:1912-7.
- 713.** Dodds L, Fell DB, Dooley KC, Armson BA, Allen AC, Nassar BA et al. Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem* 2008;54:326-64.
- 714.** Andres RL, Day MC. Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Semin Neonatol* 2000;5:231-41.
- 715.** Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009;3:332-6.
- 716.** Voigt M, Briese V, Jorch G, Henrich W, Schneider KT, Straube S. The influence of smoking during pregnancy and fetal growth. Considering daily cigarette consumption and the SGA rate according to length of gestation. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2009;213:194-200.

717. Huarte Ciganda M, Modroño A, Larrañaga C. Management of hypertension in pregnancy. *An Sist Sanit Navar* 2009;32:91-103.

718. Figueras F, Eixarch E, Gratacos E, Gardosi J. Predictiveness of antenatal umbilical artery Doppler for adverse pregnancy outcome in small-for-gestational-age babies according to customised birthweight centiles: population-based study. *BJOG* 2008;115:590-4.



A PORTACIONS CIENTÍFIQUES

APORTACIONS CIENTÍFIQUES

Participacions a congressos internacionals i nacionals en forma de pòster:

Murphy MM, Scott JM, Molloy AM, Arija V, Ceruelo S, Berrocal M, **Salat J**, Fernández-Ballart J. Determinants of total fasting plasma homocysteine (tHcy) in a randomly selected representative sample of a population unexposed to B-vitamin fortification or supplementation. FASEB Summer Research Conferences. Folic Acid, Vitamin B12 and One Carbon Metabolism. Indian Wells, California (United States) 2006.

Salat-Batlle J, Murphy MM, Cavalle-Busquets P, Berrocal MI, Vila J, Iranzo R, Fernández-Ballart JD. Associations between maternal homocysteine during pregnancy and cord lipid parameters. 6th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2007; 45 (5): A58. Saabruecken (Germany).

Berrocal-Zaragoza MI, Fernández-Ballart J, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, **Salat-Batlle J**, Albaiges-Baiget G, Sequeira JM, Quadros EV. Association between blocking folate receptors autoantibodies and subfertility. FASEB Summer Research Conferences. Folic Acid, Vitamin B12 & One Carbon Metabolism. FASEB Summer Research Conferences, Lucca, Italy August 2008, Book of abstracts: #7. Lucca (Italy).

J Salat-Batlle, MM Murphy, P Cavallé-Busquets, G Albaigès, MI Berrocal-Zaragoza, S Fernández-Roig, PM Ueland, O Midttun, JD Fernández-Ballart. Fluctuation in cobalamin status indicators during pregnancy and cord cobalamin status. 7th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Prague (Czech Republic) 2009.

MI Berrocal-Zaragoza, MM Murphy, P Cavallé-Busquets, **J Salat-Batlle**, S Fernández-Roig, PM Ueland, O Midttun, EV Quadros, JM Sequeira, JD Fernández-Ballart. Maternal and cord blood folate status are not impaired by folate receptor autoantibody presence during pregnancy. 7th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Prague (Czech Republic) 2009.

MM Murphy, S Ceruelo, **J Salat-Batlle**, JM Scott, AM Molloy, J Simó, E Valente, JD Fernández-Ballart. Cobalamin status in a Spanish population unexposed to mandatory folic acid fortification and B vitamin supplementation. 7th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Prague (Czech Republic) 2009.

S Fernández-Roig, MM Murphy, P Cavallé-Busquets, M Ballesteros, MI Berrocal-Zaragoza, **J Salat-Batlle**, PM Ueland, JD Fernández-Ballart. Comparison of two methods of measuring maternal-foetal exposition to tobacco during pregnancy and its relationship with birth weight. III Symposium Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Abstract Book. La Toja; 25-28 de noviembre de 2009; p. 108. ISBN: 978-84-92764-35-8. Isla de la Toja (Espanya) 2009.

MM Murphy, MI Berrocal-Zaragoza, P Cavallé-Busquets, **J Salat-Batlle**, S Fernández-Roig, EV Quadros, JM Sequeira, JD Fernández-Ballart. Investigation of the association between folate receptor autoantibody presence during pregnancy and in the cord with maternal and cord folate status. III Symposium Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Abstract Book. La Toja; 25-28 de noviembre de 2009; p. 109. ISBN: 978-84-92764-35-8. Isla de la Toja (Espanya) 2009.

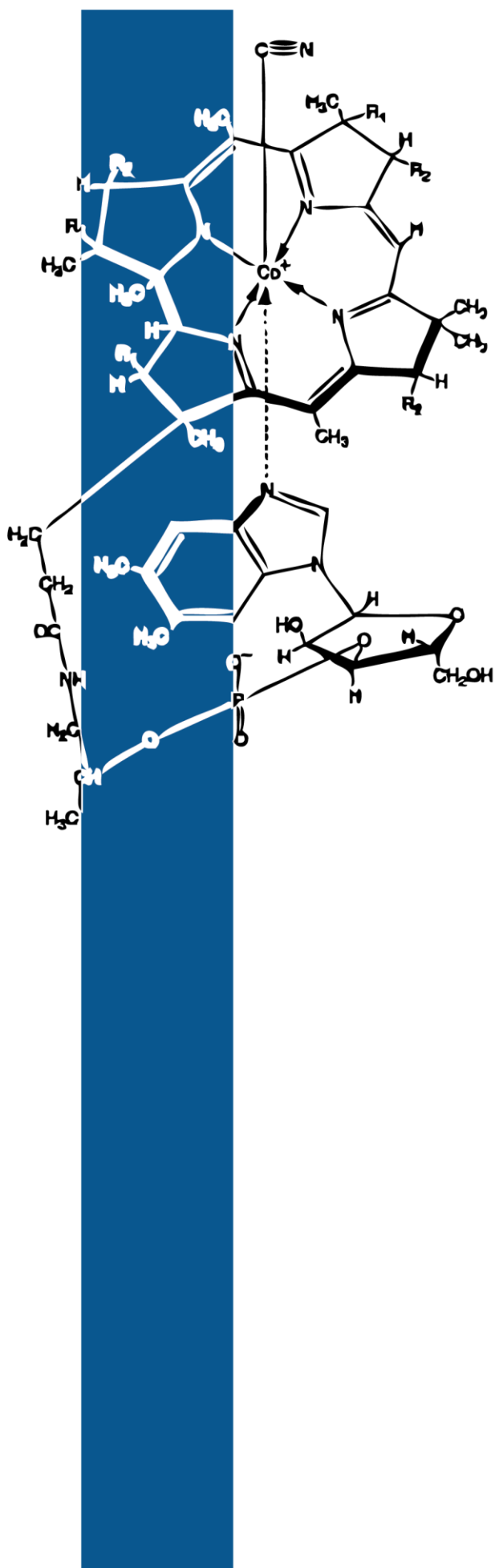
Murphy MM, **Salat-Batlle J**, Cavallé-Busquets P, Fernandez-Roig S, Berrocal-Zaragoza MI, Ueland PM, Bjorke Monsen AL, Ballesteros M, Fernández-Ballart J. Nutritional, genetic and lifestyle factors have different effects on fluctuations in plasma total cobalamin and holotranscobalamin (holoTC) concentrations during pregnancy. FASEB Summer Research Conferences. Folic Acid, Vitamin B12 and One Carbon Metabolism. Carefree, Arizona (United States) 2010.

MM Murphy, MI Berrocal-Zaragoza, P Cavallé-Busquets, **J Salat-Batlle**, S Fernández-Roig, PM Ueland, O Midttun, EV Quadros, JM Sequeira, JD Fernández-Ballart. Autoanticuerpos contra los receptores de folatos (AuAc-FOL): su relación con el estado nutricional en folatos de la gestante y del recién nacido. Congreso FESNAD. Nutrición Hospitalaria 2010; 25(suplemento 1):142-143. Barcelona (Espanya) 2010.

JD Fernández-Ballart, S Ceruelo Caro, **J Salat-Batlle**, JM Scott, AM Molloy, JM Simo, E Valente. Posible riesgo del enriquecimiento obligatorio de alimentos con ácido fólico en España. Congreso FESNAD. Nutrición Hospitalaria 2010; 25(suplemento 1):40-41. Barcelona (Espanya) 2010.

J Salat-Batlle, P Cavallé-Busquets, M Ballesteros, JD Fernández-Ballart, O Bueno, S Fernández-Roig, PM Ueland, K Meyer, A Fredriksen, O Midttun, MM Murphy. Pregnancy cobalamin status is impaired in the presence of the MTRR524C>T polymorphism but not the TCII776C>G polymorphism. 8th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Lisbon (Portugal) 2011.

P Cavallé-Busquets, M Ballesteros, JD Fernández-Ballart, **J Salat-Batlle**, CJ García-Minguillán, S Fernández-Roig, PM Ueland, K Meyer, A Fredriksen, O Midttun, MM Murphy. Elevated tHcy during early pregnancy increases the risk of impaired placental vascular function and of intrauterine growth retardation. 8th Conference on Homocysteine Metabolism. World Congress on Hyperhomocysteinemia. Lisbon (Portugal) 2011.



ANNEXES

ANNEX 1. ENQUESTES DE FREQUÈNCIA D'ALIMENTS

Estudi NUTCIR 1

15 setmanes de gestació

Nom.....

Data

QÜESTIONARI DE FREQUÈNCIA DE CONSUM ALIMENTARI

INSTRUCCIONS PER OMLIR-LO

Procuri contestar tranquil·lament aquest qüestionari. Prengui el temps que consideri necessari.

Aquest qüestionari li pregunta la freqüència amb la que vostè consumeix de forma **habitual** determinats aliments.

La freqüència de consum s'ha d'especificar als requadres de la dreta del llistat d'aliments d'aquest qüestionari. Per a cada aliment del llistat ha d'apuntar el **número de vegades** que el consumeix.

- Si el consumeix **tots els dies de la setmana**, posi un 7 en la columna **A LA SETMANA**.
- Si el consumeix **alguna vegada a la setmana**, posi les vegades: 1-2-3-4-5 o 6 en la columna **LA SETMANA**.

Pensi sempre en sumar el consum de totes les menjades del dia (esmorzar, dinar, berenar, sopar, altres..). Per exemple, si pren tots els dies llet per esmorzar i alguna vegada a la setmana per sopar: $7 + 4 = 11$ vegades a la setmana.

- Si consumeix l'aliment **alguna vegada al mes**, posi les vegades: 1-2-3 etc... en la columna: **AL MES**
- Si no el consumeix **mai** o gairebé mai, deixi la casella en blanc, sense posar res.

Exemple: Una dona esmorza habitualment un got de llet (7 vegades) amb magdalenes(7 vegades), i per sopar a vegades pren llet (4vegades) i a vegades pren iogurt (3 vegades) de postres. A més, pren peix algunes vegades a la setmana per dinar (2 vegades) i altres vegades per sopar (4 vegades). El llegums en consumeix alguna vegada al mes (aproximadament 4 vegades) . Si no menja mai un aliment deixeu en blanc, sense contestar res.

Aquest consum l'apuntaria de la següent manera:

LLISTAT D'ALIMENTS	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Llet	11	
Iogurt	3	
Coc ràpid, magdalenes..	7	
...		
Peix	6	
...		
Llegum		4
Formatge de règim		

QÜESTIONARI DE FREQUÈNCIA DE CONSUM ALIMENTARI

LLISTAT D'ALIMENTS	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Llet		
Iogurt		
Xocolata: tauleta, bombons, “Kit-Kat” “Mars”...		
Cereals inflats d’esmorzar (“Corn-Flakes” “Kellog’s”)		
Galetes tipus “maria”		
Galetes amb xocolata, crema...		
Magdalenes, coc ràpid,...		
Ensaïmada, Donut, croissant...		

	A LA SETMANA	AL MES
Amanida: Enciam, tomàquet, escarola...		
Mongetes verdes, bledes, o espinacs		
Verdures de guarnició: albergínia, carbassó, xampinyons...		
Patates al forn, fregides o bullides		
Llegums: llenties, cigrons, fesols ...		
Arròs blanc, paella		
Pasta: fideus, macarrons, espaguetis...		
Sopes i cremes		

	A LA SETMANA	AL MES
Ous		
Pollastre o gall d’indi		
Vedella, porc, corder (bistec, empanada...)		
Carn picada: llonganissa, hamburguesa		
Peix blanc: lluç, mero...		
Peix blau: sardines, tonyina, salmó...		
Marisc: musclos, gambes, llagostins, pop, calamars...		
Croquetes, empanadilles, pizza		
Pa (en entrepans, a les menjades...)		

	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Pernil salat, dolç, embotits		
Formatge fresc (Burgos,...) o baix en calories		
Formatges: curats o semicurats, cremosos		

QÜESTIONARI DE PREFERÈNCIES I HÀBITS ALIMENTARIS

	A LA SETMANA	AL MES
Fruites cítriques: Taronja, mandarina		
Altres fruites: Poma, pera, préssec, albercoc, plàtan		
Fruites en conserva (en almívar...)		
Sucs de fruita natural		
Sucs de fruita comercial		
Fruits secs: cacauets, avellanes, ametlles		
Postres làctics: natilles, flam, mató		
Pastels de crema o xocolata		
Bosses d'apetitius ("chips", "cheetos", "fritos"...)		
Llaminadures: gominoles, caramels...		
Gelats		

	A LA SETMANA	AL MES
Begudes ensucrades ("coca-cola", "Fanta"...)		
Begudes baixes en calories (coca-cola light...)		
Vi, sangria		
Cervesa		
Cervesa sense alcohol		
Begudes destil·lades: (Whisky, ginebra, conyac,...)		

Indiqui amb una X la resposta que vostè vulgui assenyalar:

1.- A taula, s'afegeix sal a les menjades?

Mai__ / Alguna vegada__ / Freqüentment __/ Gairebé sempre __

2.- Com definiríeu la vostra gana? Molta __ Força __ Normal __ Poca __ Gens__

3.- Quin tipus de llet prens habitualment?: Sencera __ Semidescremada __ Descremada __

4.- Quin tipus de iogurt prens habitualment?

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Natural __ | b) Natural descremat __ |
| c) De sabors __ | d) De sabors descremat __ |
| e) Amb trossets de fruita __ | f) Amb trossets de fruites descremat __ |

5.- Quin tipus de pa prens habitualment?: Blanc __ Integral __

6.- Et poses tomàquet i oli en els entrepans?: Sempre__ Habitualment__ Alguna vegada__ Gairebé mai__

Després del part

Estudi NUTCIR 2

Nom.....

Data

QÜESTIONARI DE FREQUÈNCIA DE CONSUM ALIMENTARI

INSTRUCCIONS PER OMLIR-LO

Procuri contestar tranquil·lament aquest qüestionari. Prengui el temps que consideri necessari.

Aquest qüestionari li pregunta la freqüència amb la que vostè consumeix de forma **habitual** determinats aliments durant l'embaràs.

La freqüència de consum s'ha d'especificar als requadres de la dreta del llistat d'aliments d'aquest qüestionari. Per a cada aliment del llistat ha d'apuntar el **número de vegades** que el consumeix.

- Si el consumeix **tots els dies de la setmana**, posi un 7 en la columna **A LA SETMANA**.
- Si el consumeix **alguna vegada a la setmana**, posi les vegades: 1-2-3-4-5 o 6 en la columna **A LA SETMANA**.

Pensi sempre en sumar el consum de totes les menjades del dia (esmorzar, dinar, berenar, sopar, altres...). Per exemple, si pren tots els dies llet per esmorzar i alguna vegada a la setmana per sopar: $7 + 4 = 11$ vegades a la setmana.

- Si consumeix l'aliment **alguna vegada al mes**, posi les vegades: 1-2-3 etc... en la columna: **AL MES**
- Si no el consumeix **mai** o gairebé mai, deixi la casella en blanc, sense posar res.

Exemple: Una dona esmorza habitualment un got de llet (7 vegades) amb magdalenes(7 vegades), i per sopar a vegades pren llet (4vegades) i a vegades pren iogurt (3 vegades) de postres. A més, pren peix algunes vegades a la setmana per dinar (2 vegades) i altres vegades per sopar (4 vegades). El llegums en consumeix alguna vegada al mes (aproximadament 4 vegades) . Si no menja mai un aliment deixeu en blanc, sense contestar res.

Aquest consum l'apuntaria de la següent manera:

LLISTAT D'ALIMENTS	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Llet	11	
Iogurt	3	
Coc ràpid, magdalenes..	7	
...		
Peix	6	
...		
Llegum		4
Formatge de règim		

QÜESTIONARI DE FREQUÈNCIA DE CONSUM ALIMENTARI

LLISTAT D'ALIMENTS	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Llet		
Iogurt		
Xocolata: tauleta, bombons, "Kit-Kat" "Mars"...		
Cereals inflats d'esmorzar ("Corn-Flakes" "Kellog's")		
Galetes tipus "maria"		
Galetes amb xocolata, crema...		
Magdalenes, coc ràpid,...		
Ensaïmada, Donut, croissant...		

	A LA SETMANA	AL MES
Amanida: Enciam, tomaca, escarola...		
Mongetes verdes, bledes, o espinacs		
Verdures de guarnició: albergínia, carbassó, xampinyons...		
Patates al forn, fregides o bullides		
Llegums: lenties, cigrons, fesols ...		
Arròs blanc, paella		
Pasta: fideus, macarrons, espaguetis...		
Sopes i cremes		

	A LA SETMANA	AL MES
Ous		
Pollastre o gall d'indi		
Vedella, porc, corder (bistec, empanada...)		
Carn picada: llonganissa, hamburguesa		
Peix blanc: lluç, mero...		
Peix blau: sardines, tonyina, salmó...		
Marisc: musclos, gambes, llagostins, pop, calamars...		
Croquetes, empanadilles, pizza		
Pa (en entrepans, a les menjades...)		

	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SETMANA	AL MES
Pernil salat, dolç, embotits		
Formatge frec (Burgos,...) o baix en calories		
Formatges: curats o semicurats, cremosos		

QÜESTIONARI DE FREQUÈNCIA DE CONSUM ALIMENTARI

	A LA SETMANA	AL MES
Fruïtes cítriques: Taronja, mandarina		
Altres fruïtes: Poma, pera, préssec, albercoc, plàtan		
Fruïtes en conserva (en almívar...)		
Sucs de fruita natural		
Sucs de fruita comercial		
Fruïts secs: cacauets, avellanes, ametlles		
Postres làctics: natilles, flam, mató		
Pastels de crema o xocolata		
Bosses d'apetitius ("chips", "chettos", "fritos"...) 		
Llaminadures: gominoles, caramels...		
Gelats		

	A LA SETMANA	AL MES
Begudes ensucrades ("coca-cola", "Fanta"...) 		
Begudes baixes en calories (coca-cola light...)		
Vi, sangria		
Cervesa		
Cervesa sense alcohol		
Begudes destilades: (Whisky, ginebra, conyac,...)		

Indiqui amb una X la resposta que vostè vulgui assenyalar:

1.- A taula, s'afegeix sal a les menjades?

Mai__ / Alguna vegada__ / Freqüentment __/ Gairebé sempre __

2.- Com definiríeu la vostra gana? Molta __ Força __ Normal __ Poca __ Gens__

3.- Quin tipus de llet prens habitualment?: Sencera __ Semidescremada __ Descremada __

4.- Quin tipus de iogurt prens habitualment?

- | | |
|--------------------------------|---|
| a) Natural ____ | b) Natural descremat ____ |
| c) De sabors ____ | d) De sabors descremat ____ |
| e) Amb trossets de fruita ____ | f) Amb trossets de fruites descremat ____ |

5.- Quin tipus de pa prens habitualment?: Blanc __ Integral __

6.- Et poses tomàquet i oli en els entrepans?:

Sempre__ Habitualment__ Alguna vegada__ Gaire be mai__

7.- Com s'ha acostumat a prendre el suplement de ferro durant aquest embaràs? (*marqui amb una x*)

- No l'he pres mai
- Amb aigua
- Amb suc de taronja
- Amb llet
- Altres (especificar)_____

8.- Durant l'embaràs ha tingut nàusees? Si No I vòmits? Si No

En cas que sí hagi tingut vòmits durant l'embaràs, especifiqui en quins mesos:

- 1-3 4 5 6 7 8

Amb quina freqüència ha tingut aquests vòmits?

- Regularment
- De tant en tant
- Molt poques vegades

ANNEX 2. ENQUESTES D'HÀBITS I ESTIL DE VIDA

ENQUESTA 1 SOBRE HÀBITS I ESTIL DE VIDA (20 setmanes de gestació)

ANOTI LES RESPOSTES EN ELS ESPAIS CORRESPONENTS A CADA PREGUNTA.

Aquestes dades serviran a la Universitat Rovira i Virgili per fer un estudi comparatiu entre diferents poblacions. En els resultats mai apareixerà el seu nom.

ÚS DE SUPLEMENTS DE VITAMINES / MINERALS

Per diferents motius, els suplementes de vitamines i minerals recomanats no es prenen sempre: per oblit, per sentiment de que no són necessaris, per no trobar-se bé, perquè donen molèsties, etc. Si us plau, contesti sincerament aquestes preguntes per ajudar-nos a valorar la realitat de l'ús dels suplementes.

- Ha pres per iniciativa pròpia o receptat per un metge algun tipus de suplement vitamínic / mineral?

Mai n'he pres Si n'he pres

En el cas que sí, escrigui el nom del preparat i indiqui les vegades a la setmana que ho ha pres marcant el quadrat. Marqui el quadrat corresponent als mesos que ho ha pres.

Exemple, una dona que ha pres cada dia FOLIDOCE durant els primers 3 mesos, escriuria...

Nom del preparat	¿Quantes vegades a la setmana?	Mesos de l'embaràs				
		1	2	3	4	5
ÀCID FÒLIC Quin? : FOLIDOCE	<input checked="" type="checkbox"/> Cada dia	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nom del preparat	Quantes vegades a la setmana?	Mesos de l'embaràs				
		1	2	3	4	5
ÀCID FÒLIC Quin?: _____	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FERRO Quin?: _____	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MULTI-VITAMINES Quin?: _____	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Va prendre àcid fòlic en els 3 mesos abans de quedar-se embarassada? Sí No
- Va prendre ferro en els 3 mesos abans de quedar-se embarassada? Sí No

ESMORZAR (durant l'embaràs)

	Sí	No
Té el costum d'esmorzar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Esmorza cereals inflats habitualment (p.ex. tipus Kelloggs / Nestlé etc) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pren cafè amb cafeïna?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pren cafè descafeïnat ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TABAC

- És fumadora passiva (exposada al fum de tabac habitualment a casa o a la feina)? Sí No
- És fumadora activa? Sí No

Només per fumadores en els últims 5 anys

	0 cigs/dia	1-5 cigs/dia	6-10 cigs/dia	> 10 cigs/dia
Actualment fumo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fumava durant els 12 mesos abans de l'embaràs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
He deixat de fumar durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ALCOHOL

	Mai / ocasionalment	< 3 copes / setmana	Cada dia com aperitiu i/o amb els àpats	> 7 copes / setmana
Actualment bec alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En els 12 mesos abans de l'embaràs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
He deixat de beure alcohol durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Ha pres algun altre tipus de substància tòxica (p.ex. marihuana, cocaïna, heroïna, etc...) en els últims 5 anys?

Sí No

En el cas de que sí hagi pres alguna substància tòxica, especifiqui quines:

	Ocasionalment	Regularment
Actualment prenc substàncies tòxiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En els 12 mesos abans de l'embaràs prenia subst. tòxiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
Ho he deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ACTIVITAT FÍSICA (durant l'embaràs)

- Quina activitat física fa en el treball, estudi o feina de casa?
 - El meu treball és bàsicament d'estar asseguda i caminar poc (estudiant, docent, conductora de vehicles, dependenta, administrativa)
 - Al meu treball camino força però no faig cap esforç vigorós (mestressa de casa, fàbrica, venedora, cartera....)
 - El meu treball és bàsicament de molta activitat física (esportista.)

- Quina activitat feu en el temps de lleure?
Si varia amb l'estació, escollir el grup més representatiu (només 1 grup).
 - Lectura, televisió i activitats que no requereixin activitat física important.....
 - Caminar, anar amb bicicleta, jardineria (no s'inclou el transport d'anar i tornar del treball).....
 - Córrer, esquiar, gimnàstica, jocs de pilota o esports vigorosos regularment.....
 - Entrenament esportiu regular per competició

- Quants cops per setmana realitza les activitats referides en la pregunta anterior? _____

- Durant els últims 12 mesos

	Mai	Esporàdicament	Habitualment
Ha tingut el costum de prendre el Sol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

PLANIFICACIÓ DE L'EMBARÀS

- Ha buscat / planificat aquest embaràs? Sí No

- Durant els 6 mesos abans de l'embaràs

	Cap	DIU	Anticonceptius orals	Pegat anticonceptiu	Anell vaginal	Preservatiu
Quin mètode d'anticonceptiu ha fet servir?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Cicles sense prendre anticonceptius abans de l'embaràs? _____
 (Número de regles des de que va deixar de prendre anticonceptius fins que va quedar embarassada)

DADES SOCIODEMOGRÀFIQUES

- Quina és la seva feina en l'actualitat i quin nivell d'estudis ha completat

	Mare	Pare
Feina actual	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nivell d'estudis	Primaris sense finalitzar <input type="checkbox"/> Primaris (ESO, EGB, ...) <input type="checkbox"/> Secundaris (BUP, Batxillerat, FP, ...) <input type="checkbox"/> Superiors (Universitaris) <input type="checkbox"/>	Primaris sense finalitzar <input type="checkbox"/> Primaris (ESO, EGB, ...) <input type="checkbox"/> Secundaris (BUP, Batxillerat, FP, ...) <input type="checkbox"/> Superiors (Universitaris) <input type="checkbox"/> No aplicable (Família monoparental) <input type="checkbox"/>

- Nombre de persones que formen la unitat familiar _____
- Ingressos nets anuals totals a la llar

Exemple, si la dona té un sou de 20000 €, l'home un de 18000€ i hi ha un avi que viu amb la família i rep una pensió de 6000 €

Menys de 9000 €	>9000 € - 19000 €	>19000 € - 25000 €	>25000 € - 35000 €	Més de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Menys de 9000 €	>9000 € - 19000 €	>19000 € - 25000 €	>25000 € - 35000 €	Més de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anoti qualsevol dubte relacionat amb aquesta enquesta:

ENQUESTA 2 SOBRE HÀBITS I ESTIL DE VIDA (32 setmanes de gestació)

ANOTI LES RESPOSTES EN ELS ESPAIS CORRESPONENTS A CADA PREGUNTA.

Aquestes dades serviran a la Universitat Rovira i Virgili per fer un estudi comparatiu entre diferents poblacions. En els resultats mai apareixerà el seu nom.

ÚS DE SUPLEMENTS DE VITAMINES / MINERALS

Per diferents motius, els suplementes de vitamines i minerals recomanats no es prenen sempre: per oblit, per sentiment de que no són necessaris, per no trobar-se bé, perquè donen molèsties, etc. Si us plau, contesti sincerament aquestes preguntes per ajudar-nos a valorar la realitat de l'ús dels suplementes.

- Ha pres per iniciativa pròpia o receptat per un metge algun tipus de suplement vitamínic / mineral?

Mai n'he pres Si n'he pres

En el cas que sí, escriu el nom del preparat i indiqui les vegades a la setmana que ho ha pres marcant el quadrat. Marqui el quadrat corresponent als mesos que ho ha pres.

Exemple, una dona que ha pres la majoria dels dies FERPLEX durant els mesos 6, 7, 8 i 9:

Nom del preparat	Quantes vegades a la setmana?	Mesos de l'embaràs			
		6	7	8	9
FERRO	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Quin?: FERPLEX	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nom del preparat	Quantes vegades a la setmana?	Mesos de l'embaràs			
		6	7	8	9
FERRO	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quin?: _____	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ÀCID FÒLIC	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quin?: _____	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MULTI-VITAMINES	<input type="checkbox"/> Cada dia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quin?: _____	<input type="checkbox"/> La majoria dels dies (4-6 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Alguns dies (1-3 vegades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Si ha deixat de prendre el ferro, per quin motiu o motius ha estat?

Oblit Li causava molèsties
 No el considerava molt important per la salut Altres (especificar) _____

ESMORZAR (durant l'embaràs)

	Sí	No
Té el costum d'esmorzar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Esmorza cereals inflats habitualment (p.ex. tipus Kelloggs / Nestlé etc) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pren cafè amb cafeïna ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pren cafè descafeïnat ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TABAC

- És fumadora passiva (exposada al fum de tabac habitualment (a casa o a la feina)? Sí No
- És fumadora activa? Sí No

Només per fumadores en els últims 5 anys

	0 cigs/dia	1-5 cigs/dia	6-10 cigs/dia	> 10 cigs/dia
Actualment fumo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fumava durant els 12 mesos abans de l'embaràs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
He deixat de fumar durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ALCOHOL

	Mai / ocasionalment	< 3 copes / setmana	Cada dia com aperitiu i/o amb els àpats	> 7 copes / setmana
Actualment bec alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En els 12 mesos abans de l'embaràs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
He deixat de beure alcohol durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Ha pres algun altre tipus de substància tòxica (p.ex. marihuana, cocaïna, heroïna, etc...) en els últims 5 anys?
 Sí No

En el cas de que sí hagi pres alguna substància tòxica, especifiqui quines:

	Ocasionalment	Regularment
Actualment prenc substàncies tòxiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En els 12 mesos abans de l'embaràs prenia subst. tòxiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Abans dels 3 mesos	Entre els 3 i els 6 mesos	Després dels 6 mesos
Ho ha deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ACTIVITAT FÍSICA (durant l'embaràs)

- Quina activitat física fa en el treball, estudi o feina de casa?

- El meu treball és bàsicament d'estar asseguda i caminar poc (estudiant, docent, conductora de vehicles, dependenta, administrativa)

- Al meu treball camino força però no faig cap esforç vigorós (mestressa de casa, fàbrica, venedora, cartera....)

- El meu treball és bàsicament de molta activitat física (esportista.)

- Quina activitat feu en el temps de lleure?

Si varia amb l'estació, escollir el grup més representatiu (només 1 grup).

- Lectura, televisió i activitats que no requereixin activitat física important.....

- Caminar, anar amb bicicleta, jardineria (no s'inclou el transport d'anar i tornar del treball).....

- Córrer, esquiar, gimnàstica, jocs de pilota o esports vigorosos regularment.....

- Entrenament esportiu regular per competició

- Quants cops per setmana realitza les activitats referides en la pregunta anterior? _____

- Durant els últims 12 mesos

	Mai	Esporàdicament	Habitualment
Ha tingut el costum de prendre el Sol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DADES SOCIODEMOGRÀFIQUES (NOMÉS SI NO HA CONTESTAT L'ENQUESTA 1)

- Quina és la seva feina en l'actualitat i quin nivell d'estudis ha completat

	Mare	Pare
Feina actual	<input style="width: 40px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 40px; height: 20px;" type="text"/>
Nivell d'estudis	Primaris sense finalitzar <input type="checkbox"/> Primaris (ESO, EGB, ...) <input type="checkbox"/> Secundaris (BUP, Batxillerat, FP, ...) <input type="checkbox"/> Superiors (Universitaris) <input type="checkbox"/>	Primaris sense finalitzar <input type="checkbox"/> Primaris (ESO, EGB, ...) <input type="checkbox"/> Secundaris (BUP, Batxillerat, FP, ...) <input type="checkbox"/> Superiors (Universitaris) <input type="checkbox"/> No aplicable (Família monoparental) <input type="checkbox"/>

- Nombre de persones que formen la unitat familiar _____
- Ingressos nets anuals totals a la llar

Exemple, si la dona té un sou de 20000 €, l'home un de 18000€ i hi ha un avi que viu amb la família i rep una pensió de 6000 €

Menys de 9000 €	9000 € - 19000 €	19000 € - 25000 €	25000 € - 35000 €	Més de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Menys de 9000 €	>9000 € - 19000 €	>19000 € - 25000 €	>25000 € - 35000 €	Més de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anoti qualsevol dubte relacionat amb aquesta enquesta:

ANNEX 3. PROTOCOLS PER A LA PREPARACIÓ DE REACTIUS

Protocols per a la preparació de les solucions necessàries per a l'obtenció de leucòcits.

Protocol 3.1. Sèrum fisiològic

Reactius:

- NaCl (Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA)

Preparació:

En un matràs aforat de 200 mL es dispensen 1,8 g de NaCl. Enrasar amb aigua Milli-Q fins a 200 mL.

Protocol 3.2. PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Reactius:

- NaCl (Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA)
- KCl (Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA)
- Na₂HPO₄ (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland)
- KH₂PO₄ (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland)

Preparació:

En un matràs aforat d'1 L, es dispensen 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ i 0,24 g de KH₂PO₄. Enrasar amb aigua Milli-Q fins a 1 L.

Protocol 3.3. Solució d'hemòlisi

Reactius:

- NH₄Cl (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) 131 mM
- CH₅NO₃ (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) 0,9 mM

Preparació:

En un matràs aforat d'1 L es dispensen 7,007 g de CINH₄ i 0,071 g de CH₅NO₃. Enrasar amb aigua Milli-Q fins a 1 L.