



## CONTRIBUCIÓN DE LA COLINA Y LA BETAÍNA AL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA DURANTE LA GESTACIÓN

**Sílvia Fernández Roig**

Dipòsit Legal: T. 1431-2012

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

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

**Sílvia Fernàndez Roig**

**CONTRIBUCIÓN DE LA COLINA Y LA BETAÍNA AL  
METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA DURANTE  
LA GESTACIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

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

**Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques.**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Reus 2012**





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Facultat de Medicina i Ciències de la Salut**  
**Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques**  
**Carrer Sant Llorenç, 21**  
**43201 Reus - Tel. 977759306**

Joan Fernández-Ballart, catedrático del departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili,

#### **HACE CONSTAR**

Que este trabajo titulado “Contribución de la colina y la betaína al metabolismo de la homocisteína durante la gestación” que presenta Sílvia Fernández Roig para la obtención del título de Doctor, ha estado realizado bajo su dirección, en el departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de esta universidad y cumple con los requisitos para poder optar a este título.

Reus, 13 de julio de 2012





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Facultat de Medicina i Ciències de la Salut**  
**Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques**  
**Carrer Sant Llorenç, 21**  
**43201 Reus - Tel. 977759306**

Michelle Murphy, profesora agregada del departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili,

**HACE CONSTAR:**

Que este trabajo titulado “Contribución de la colina y la betaína al metabolismo de la homocisteína durante la gestación” que presenta Sílvia Fernàndez Roig para la obtención del título de Doctor, ha estado realizado bajo su dirección, en el departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de esta universidad y cumple con los requisitos para poder optar a este título.

Reus, 13 de julio de 2012



***Al meu avi.***





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer conjuntamente al Prof. Joan Fernández-Ballart y a la Dra. Michelle Murphy por dirigir esta tesis doctoral en la unidad de *Medicina Preventiva i Salut Pública* y abrirme las puertas al campo de la epidemiología. Pero muy especialmente por ofrecerme la oportunidad de realizar una estancia predoctoral en la *State University of New York*.

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

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

A todas las mujeres embarazadas que han participado altruistamente en el estudio NUTCIR ya que sin ellas este trabajo no hubiera sido posible.

Al financiamiento de:

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

Al Prof. Edward Quadros, profesor de la *State University of New York (SUNY) – Downstate Medical Center*, por aceptarme en su laboratorio de biología molecular que dirige en Nueva York y darme sus sabios consejos tanto de ciencia como de esta gran ciudad.

Però també m'agradaria agrair a la gent que m'ha acompanyat durant aquests anys:

Al Joan, per explicar-me tot el que sé ara mateix sobre l'anàlisi estadístic, per ensenyar-me a escriure detallada i minuciosament la sintaxi del programa SPSS i sobretot per transmetre'm aquesta petita addicció al tractament de dades clíniques.

A la Michelle, per endinsar-me en el món de la recerca i per transmetre'm valors com l'exigència, la constància i la tenacitat tant importants en aquest àmbit però també per a la resta de la vida. I per donar-me una àmplia visió del complex món del metabolisme monocarbonat.

A les ja doctores Maribel i Judith, per ensenyar-me com funcionava l'estudi NUTCIR en el moment en què jo vaig començar en aquest projecte. I també al Carlos i la Olalla, actuals companys a qui he intentat explicar la dinàmica de l'estudi i amb qui he compartit aquest treball de camp durant els últims anys.

Als amics que he fet en aquesta facultat, l'Andrés, la Marta, la Núria, el Martí i la Olalla, per distreure'ns junts durant les estones lliures. En concret al Martí per la seva infinita paciència. Però amb una menció especial a la Olalla, per haver estat la meva assessora personal de llengua castellana durant els últims mesos, amb qui vaig començar a compartir el despatx des del primer dia que va arribar i que ara s'ha convertit amb una gran amiga.

Al Gerard, per donar-me tot el suport necessari per viure l'experiència personal que va suposar marxar quatre mesos a NYC.

Finalment, un agraïment especial als meus pares, que m'han donat suport en totes les decisions que he anat prenent al llarg d'aquests quatre anys.

**A tots vosaltres, moltes gràcies.**

## RESUMEN

La colina es un nutriente esencial, imprescindible para la estructura y la señalización celular, el transporte de lípidos, la neurotransmisión y el metabolismo monocarbonado. Asimismo interviene en el desarrollo cognitivo fetal y el cierre del tubo neural. Es el principal dador de grupos metilo de la dieta y la Ingesta Adeuada para una mujer embarazada es de 450 mg/día. Al oxidarse se convierte en betaína, molécula que mediante la enzima BHMT, remetila la homocisteína y como productos resultan la dimetilglicina (DMG) y la metionina. Dado que la colina comparte vías metabólicas con el folato, el estado de éste podría modificar el papel de la colina. Un biomarcador de la relación entre la colina y el folato es la homocisteína. Por otro lado, la colina se puede sintetizar de forma endógena mediante la enzima PEMT cuyo dador de grupos metilo es SAM. Esta síntesis es mayor en presencia de estrógenos, una hormona que aumenta a lo largo de la gestación. La relación entre la colina y el folato también podría verse afectada por la presencia de polimorfismos como *BHMT 742G→A*. El único efecto observado en población adulta debido a la presencia del polimorfismo *BHMT 742 G→A* ha sido una disminución de DMG. El objetivo de esta tesis es investigar la contribución de la colina y la betaína a la regulación de la homocisteína y el efecto del polimorfismo *BHMT 742G→A* sobre la vía de la colina y sobre la concentración de homocisteína, durante el embarazo y en el feto, en función del estado en folato.

El estudio NUTCIR es un estudio longitudinal del embarazo con 546 gestantes, 497 de las cuáles terminaron el embarazo con un hijo vivo. De todas ellas se obtuvieron seis muestras sanguíneas: antes de las 12 semanas de gestación (SG), a las 15 SG, entre las 24-27 SG, a las 34 SG, en el momento del parto y de la vena del cordón umbilical. De todas las muestras se obtuvieron el plasma para determinar la colina y sus productos (la betaína y la DMG), el folato, la homocisteína, la cobalamina, la metionina, la creatinina y la cotinina, y los leucocitos para extraer el ADN y determinar los polimorfismos: *BHMT 742G→A*, *MTRR 66A→G* y *BHMT 742G→A*. Todas las participantes realizaron dos encuestas de hábitos y estilo de vida (a las 20 SG y a las 32 SG) que permitieron obtener información como el uso de suplementación con ácido fólico, el consumo de café, el hábito tabáquico y el nivel socioeconómico. A partir de la historia clínica se recogió información referente a: edad e IMC de la gestante; sexo, fecha de nacimiento y peso del recién nacido y SG en el momento del parto.

La colina plasmática aumenta linealmente a partir de las 15 SG. La betaína plasmática, tras una disminución inicial, a las 24-27 SG se mantiene constante y su estado es entre un 6% y un 11%

inferior en un bajo estado en folato. La DMG plasmática disminuye inicialmente, pero aumenta a partir de las semanas 24-27 y su estado es entre un 13% y un 20% superior en un bajo estado en folato. Estos resultados indican que la baja concentración de folato comporta una mayor actividad de la vía metabólica de la colina.

El 10% de las gestantes son homocigotas para el polimorfismo *BHMT* 742G→A. La colina y la betaína plasmáticas no varían en función de este polimorfismo durante la gestación ni tampoco en el cordón. La DMG plasmática es inferior al final de la gestación (2.25 vs 2.98;  $p<0.01$ ) y en el cordón (3.02 vs 3.71;  $p<0.01$ ) en la variante homocigota materna respecto a la salvaje. La presencia de este polimorfismo en el feto no tiene repercusión sobre la vía fetal de la colina, es posible que esté más influenciada por la actividad de la enzima *BHMT* materna que por la enzima *BHMT* fetal. No se observa relación entre la homocisteína plasmática y el polimorfismo *BHMT* 742G→A ni durante la gestación ni en el feto.

El principal determinante de la concentración de los metabolitos de la vía fetal de la colina es la concentración del mismo metabolito en la madre. La correlación materno-fetal de la colina es baja ( $r=0.15$ ;  $p<0.01$ ;  $n=394$ ). La buena correlación materno-fetal de la betaína ( $r=0.43$ ;  $p<0.001$ ;  $n=394$ ) y la DMG ( $r=0.77$ ;  $p<0.001$ ;  $n=394$ ) sugiere la existencia de un sistema de transporte para estos nutrientes entre ambos compartimentos. El perfil bioquímico indicativo de una alta actividad de la vía metabólica de la colina (bajo estado en betaína y elevado estado en DMG) no se observó en el plasma de cordón cuyas gestantes tenían un bajo estado en folato. Probablemente la vía fetal de la colina no responda igual que la vía materna al estado en folato.

La colina plasmática se asocia positivamente con la homocisteína plasmática durante toda la gestación y significativamente en el momento del parto. La betaína plasmática se asocia negativamente con la homocisteína plasmática a partir del segundo trimestre, coincidiendo con el inicio del deterioro del estado en folato. La colina plasmática fetal se asocia positivamente con la homocisteína plasmática fetal únicamente en las gestantes con un elevado estado en folato. La betaína plasmática fetal se asocia positivamente con la homocisteína plasmática fetal, cuando el estado en folato es bajo.

En conclusión, la vía metabólica de la colina contribuye a la remetilación de la homocisteína de manera distinta en función del estado en folato durante la gestación

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>13</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>18</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>20</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>21</b>
<b>Nomenclatura de enzimas</b>	<b>22</b>

### **INTRODUCCIÓN** **23**

1. La vía metabólica de la colina y la betaína	25
1.1 La colina	25
1.1.1 Historia de un nutriente esencial	25
1.1.2 La estructura de la colina	26
1.1.3 Colina en los alimentos	28
1.1.4 Necesidades e ingesta adecuada de colina	28
1.1.5 Absorción, transporte y asimilación	33
1.1.6 Metabolismo: Oxidación de la colina	34
1.1.7 Síntesis endógena	35
1.1.8 Funciones bioquímicas	38
1.1.9 Estado en colina	40
1.1.10 Efecto de la deficiencia de colina sobre la homocisteína y las reacciones de metilación	42
1.2 La Betaína	43
1.2.1 La estructura	43
1.2.2. Betaína en los alimentos e ingesta diaria	43
1.2.3 Absorción, transporte, asimilación y metabolismo	45
1.2.4 Funciones bioquímicas	45
1.2.5 Estado en betaína	46
1.2.6 Suplementación con betaína	47
1.3 Técnicas para determinar la colina y la betaína	48
1.3.1 Artefactos de procesamiento	49
2. El ciclo de la metionina	50
2.1 El paso de metionina a homocisteína	50

2.2 El metabolismo de la homocisteína	51
2.2.1 La transulfuración de la homocisteína	53
2.2.2 La remetilación de la homocisteína	53
2.3 La relación de la colina y la betaína con la homocisteína en función del estado en folato	60
3. La colina y la homocisteína durante la gestación	62
3.1 La colina y la betaína durante la gestación	62
3.2 La homocisteína durante la gestación	65
3.3 Contribución de la colina a la regulación de la homocisteína durante la gestación	68

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

**73**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**77**

1. Estudio NUTCIR	79
1.1 Muestras biológicas	80
1.2 Encuesta de hábitos y estilos de vida	82
1.3 Historia clínica	84
2. Determinaciones bioquímicas y genéticas	84
2.1 Determinaciones bioquímicas en plasma	85
2.2 Determinaciones genéticas	86
3. Análisis estadístico	86

## **RESULTADOS**

**89**

1. Características generales del estudio NUTCIR	91
2. Fluctuación de los metabolitos del ciclo de la metionina durante la gestación y en el cordón umbilical	93
3. Fluctuación de la colina, la betaína y la DMG en función del estado en folato durante la gestación y en el cordón umbilical	95
4. Relación del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G→A y la vía metabólica de la colina durante la gestación y en el cordón umbilical	101
5. Efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G→A y del estado en folato sobre la vía metabólica de la colina durante la gestación	104

6. Relación del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G→A y la tHcy durante la gestación y en el cordón umbilical	108
7. Efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G→A y del estado en folato sobre la tHcy durante la gestación	109
8. Relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG	112
9. Efecto de la colina sobre la tHcy durante la gestación y en cordón umbilical	117
10. Efecto de la betaína sobre la tHcy durante la gestación y en cordón umbilical	121
11. Efecto de la colina y la betaína maternas sobre el peso al nacer	126

## **DISCUSIÓN**

**129**

1. Participantes del estudio NUTCIR	131
2. La vía metabólica de la colina	131
3. La vía metabólica de la colina en función del estado en folato	134
4. El polimorfismo <i>BHMT</i> 742G→A durante la gestación	136
5. La relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG	138
6. Contribución de la colina y la betaína a la tHcy durante la gestación	142
7. Contribución de la colina y la betaína a la tHcy fetal	144
8. Efecto de la colina y la betaína sobre el peso al nacer	146

## **CONCLUSIONES**

**147**

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

**151**

## **APORTACIONES CIENTÍFICAS**

**173**

## **ANEXOS**

**179**



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ingesta adecuada de colina según <i>The Institute of Medicine</i>	29
<b>Tabla 2.</b> Ingesta de colina diaria según los grandes estudios epidemiológicos americanos y europeos	31
<b>Tabla 3.</b> Ingesta de betaína diaria en los grandes estudios epidemiológicos americanos y europeos	44
<b>Tabla 4.</b> Rango de betaína plasmática ( $\mu\text{mol/L}$ ) en ayunas en adultos (hombres y mujeres)	46
<b>Tabla 5:</b> Cuestiones pendientes de resolver acerca de la contribución de la vía de la colina a la regulación de la homocisteína durante la gestación	71
<b>Tabla 6:</b> Rango de los terciles de folato plasmático durante la gestación	88
<b>Tabla 7.</b> Hábitos y estilo de vida y características obstétricas de las participantes del estudio NUTCIR	92
<b>Tabla 8.</b> Fluctuación de colina, betaína, DMG, folato, cobalamina, tHcy y metionina a lo largo de la gestación y en cordón umbilical	94
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias genotípicas de los polimorfismos <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A, <i>MTHFR</i> 677C $\rightarrow$ T y <i>MTRR</i> 66A $\rightarrow$ G en las gestantes y en los recién nacidos	101
<b>Tabla 10.</b> Colina, betaína y DMG plasmáticas en función del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A durante la gestación y en cordón umbilical.	103
<b>Tabla 11:</b> El efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A y del estado en folato sobre la vía de la colina durante el primer trimestre de la gestación	106
<b>Tabla 12:</b> El efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A y del estado en folato sobre la vía de la colina durante el segundo y tercer trimestre de la gestación	107
<b>Tabla 13:</b> tHcy fetal ( $\mu\text{mol/L}$ ) en función del polimorfismo <i>BHMT</i> 742 G $\rightarrow$ A materno o fetal	109
<b>Tabla 14.</b> El efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A y del estado en folato sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación	110
<b>Tabla 15.</b> El efecto del polimorfismo <i>BHMT</i> 742G $\rightarrow$ A y del estado en folato sobre la tHcy en el segundo y tercer trimestre de gestación	111
<b>Tabla 16:</b> Relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG en función del estado en folato	112
<b>Tabla 17:</b> Factores explicativos de la colina, la betaína y la DMG fetales	113
<b>Tabla 18.</b> Factores explicativos de la colina, la betaína y la DMG fetales, en función del estado en folato	115

<b>Tabla 19:</b> Relación entre los metabolitos de la vía de la colina en la gestante y en el feto	116
<b>Tabla 20:</b> Relación entre los metabolitos de la vía de la colina en la gestante y en el feto en función del estado de folato	116
<b>Tabla 21.</b> Efecto de la colina plasmática sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación, en función del estado en folato	118
<b>Tabla 22.</b> Efecto de la colina sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre de la gestación	118
<b>Tabla 23.</b> Relación entre la colina (materna o fetal) y la tHcy fetal en función del estado en folato	120
<b>Tabla 24.</b> Colina como factor explicativo de la tHcy fetal en función del estado en folato.	120
<b>Tabla 25.</b> Efecto de la betaína y del polimorfismo <i>BHMT</i> 742 G→A sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación en función del estado en folato	123
<b>Tabla 26.</b> Efecto de la betaína y del polimorfismo <i>BHMT</i> 742 G→A sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre de gestación en función del estado en folato	124
<b>Tabla 27.</b> Relación entre la betaína (materna o fetal) y la tHcy fetal en función del estado en folato	125
<b>Tabla 28.</b> Betaína como factor explicativo de la tHcy fetal	125
<b>Tabla 29.</b> Betaína como factor explicativo de la tHcy fetal en función del estado en folato	126
<b>Tabla 30.</b> Efecto del estado materno en colina y en betaína sobre el peso al nacer	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

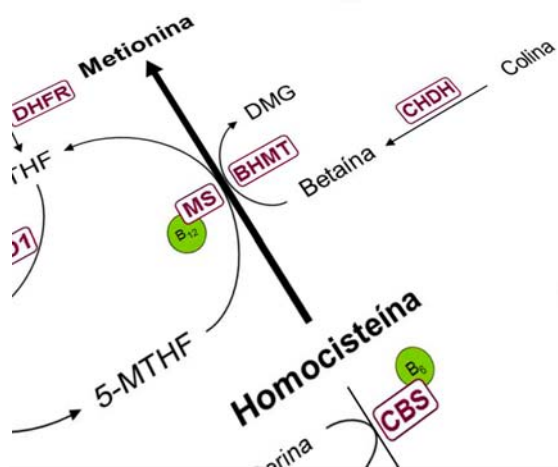
<b>Figura 1.</b> Estructura de la colina	27
<b>Figura 2.</b> Derivados de la colina	27
<b>Figura 3.</b> Oxidación de la colina	35
<b>Figura 4.</b> Síntesis de la fosfatidilcolina	36
<b>Figura 5.</b> Estructura de la betaína	43
<b>Figura 6.</b> Metabolismo de la metionina	51
<b>Figura 7.</b> Metabolismo de la homocisteína	52
<b>Figura 8.</b> La cobalamina como cofactor de la enzima MS	55
<b>Figura 9.</b> Diseño del estudio NUTCIR	80
<b>Figura 10:</b> Diagrama de flujo del estudio NUTCIR	91
<b>Figura 11:</b> Fluctuación de la colina, la betaína, la DMG y la metionina plasmáticas durante la gestación en función del estado en folato	96
<b>Figura 12:</b> Fluctuación de la colina, la betaína, la DMG y la metionina plasmáticas durante el segundo y tercer trimestre de la gestación en función de la suplementación con ácido fólico entre los meses 4 y 7	98
<b>Figura 13:</b> Colina, betaína y DMG maternas y fetales según estado en folato	100
<b>Figura 14:</b> Fluctuación de la tHcy en función del polimorfismo <i>BHMT</i> 742 G→A a lo largo de la gestación	108

## ABREVIATURAS

Acrónimo	Significado
CIR	Crecimiento intrauterino retardado
DMG	Dimetilglicina
DTN	Defectos del tubo neural
GS-MS/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem
Hcy	Homocisteína
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IA	Ingesta Adecuada
IC95%	Intervalo de confianza al 95 %
IMC	Índice de masa corporal
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
NUTCIR	Nutrición y crecimiento intrauterino retardado
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SG	Semanas de gestación
tHcy	Homocisteína total plasmática en ayunas

## NOMENCLATURA DE ENZIMAS

Siglas	Nomenclatura internacional <sup>1</sup>	Nombre de la enzima
BADH	EC 1.1.1.8.	Betaína aldehído deshidrogenasa
BHMT	EC 2.1.1.5.	Betaína-homocisteína metiltransferasa
CBS	EC 4.2.1.22.	Cistationina $\beta$ -sintasa
CGL	EC 4.4.1.1.	Cistationina $\gamma$ -liasa
ChAT	EC 2.3.1.6.	Acetilcolintransferasa
CHDH	EC 1.1.99.1.	Colina deshidrogenasa
DDH	EC 1.5.99.2.	Dimetilglicina deshidrogenasa
DHFR	EC 1.5.1.3.	Dihidrofolato reductasa
DNMT1	EC 2.1.1.37.	ADN(citosina-5-)-metiltransferasa
GAMT	EC 2.1.1.2.	Guanidinoacetato N-metiltransferasa
GNMT	EC 2.1.1.20.	glicina N-metiltransferasa
SAH hidrolasa	EC 3.3.1.11.	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
MAT	EC 2.5.1.6.	Metionina adenosiltransferasa
MS	EC 2.1.1.13.	Metionina sintasa
MT	EC 2.1.1.	Metiltransferasa
MTHFR	EC 1.5.1.20.	Metiltenterahidrofolato reductasa
MTHFD1	EC 1.5.1.5.	Metilen tetrahidrofolato deshidrogenasa 1
MTRR	EC 1.16.1.8.	Metionina sintasa reductasa
PEMT	EC 2.1.1.17.	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
SDH	EC 1.5.99.1.	Sarcosina deshidrogenasa
SHMT	EC 2.1.2.1.	Serina hidroximetiltransferasa



# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## 1. La vía metabólica de la colina i la betaína

### 1.1. La colina

#### 1.1.1. Historia de un nutriente esencial

La colina es un micronutriente descubierto en 1862 por Adolph Strecker, que lo clasificó como una base amoniaca<sup>2</sup>. Fue sintetizada químicamente por primera vez en 1866 por el científico francés Charles Adolph Wurtz<sup>3</sup>. En 1868, se demostró que la colina formaba parte de la lecitina de la yema del huevo<sup>4</sup> y más adelante se observó que era un componente de la esfingomielinina<sup>5,6</sup>. En la historia de la colina cabe destacar que: en 1906 Hunt y Taveau descubrieron la potente acción de la acetilcolina como neurotransmisor<sup>7</sup>, en 1941 Du Vigneaud y colaboradores descubrieron la ruta de la biosíntesis de la colina<sup>8</sup> y en 1956 Kennedy y Weiss describieron la ruta de su incorporación a la fosfatidilcolina<sup>9</sup>.

En los siguientes años se llevaron a cabo varios estudios con modelos animales para comprender el rol fisiológico de la colina. Mamíferos tratados con dietas deficientes en colina desarrollaban disfunción renal y hepática. Bligh exploró las diferencias metabólicas que presentaba un grupo de ratas sometido a una dieta deficiente en colina durante cuatro meses respecto a un grupo control. Observó una acumulación de grasas en el hígado además de una reducción de la concentración de colina en plasma<sup>10</sup>. Estos resultados concordaron con los que publicaron posteriormente Yao y colaboradores, que administraron una dieta deficiente en colina durante 3 días a ratas machos y observaron una reducción de la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)<sup>11</sup>. Además de las consecuencias observadas principalmente en el hígado, se describió que la deficiencia de colina en un grupo de ratas es capaz de reducir las reservas de folato hepático entre un 25-50% respecto a un grupo control<sup>12</sup>. En crías de cobaya tratadas con una dieta carente de colina durante 4 semanas se observó una reducción significativa de glucógeno y de derivados de colina en el hígado, de lípidos de membrana y una marcada disminución de su crecimiento<sup>13</sup>. Todos estos efectos se vieron revertidos al inyectar colina a los animales deficientes, demostrando así que las alteraciones observadas fueron causadas por esta deficiencia.

No obstante, no se tenía constancia de ningún síndrome relacionado con la deficiencia de colina en humanos, probablemente porque una dieta omnívora suele aportar suficiente colina. Al haberse descrito una ruta de biosíntesis endógena de colina<sup>14</sup> no se creía necesario



considerarla un nutriente esencial. No fue hasta 1991 cuando Zeisel y colaboradores publicaron un estudio donde se exploraron los efectos de una ingesta inadecuada de colina en hombres voluntarios adultos y sanos. Se suprimió la colina de su dieta durante tres semanas manteniendo una ingesta adecuada de metionina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>. Tras este periodo, se observó una disminución de la colina plasmática, aunque después de una semana, su concentración no se redujo más del 50%. Es probable se active el catabolismo de la fosfatidilcolina de tejidos periféricos para evitar un descenso más importante<sup>15</sup>. También se observó un aumento de la concentración de alanina aminotransferasa (ALT), un marcador bioquímico de daño hepático<sup>16</sup>.

Otros estudios realizados con distintos grupos de individuos alimentados exclusivamente con nutrición parenteral, carente de colina pero con un contenido adecuado de metionina y folato, aportaron conclusiones concordantes. En todos los casos, los individuos estudiados desarrollaron hígado graso y daño hepático y presentaron una concentración elevada de ALT. Estas alteraciones se resolvieron añadiendo colina a su dieta<sup>17-21</sup>. Las consecuencias más graves de la deficiencia de colina en humanos son la aparición de una disfunción orgánica, principalmente hepática (hígado graso o esteatosis) pero también renal o muscular<sup>22-24</sup>.

La evidencia de la aparición de daño hepático provocado por una deficiencia extrema en colina fue la justificación necesaria para que en 1998 la *National Academy of Science (United States)* la declarara un nutriente esencial para los humanos<sup>25</sup>.

### 1.1.2. La estructura de la colina

La molécula de la colina es una amina cuaternaria rica en grupos metilo, cargada positivamente (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>NO<sup>+</sup>) que tiene un peso molecular de 104.17 g/mol (**Figura 1**). La colina libre es una base orgánica muy higroscópica. La colina puede ser acetilada, fosforilada, oxidada o hidrolizada. Es el precursor de distintos compuestos tales como la fosfocolina, la fosfatidilcolina, la esfingomielina, la glicerofosfocolina y la acetilcolina (**Figura 2**). El catabolismo de estas moléculas genera metabolitos fundamentales para el correcto funcionamiento celular como son la lisofosfatidilcolina, la lisoesfingomielina, el diacilglicerol, la ceramida o la esfingosina<sup>26</sup>.

Figura 1. Estructura de la colina.

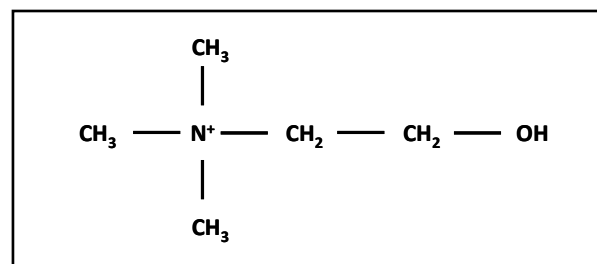
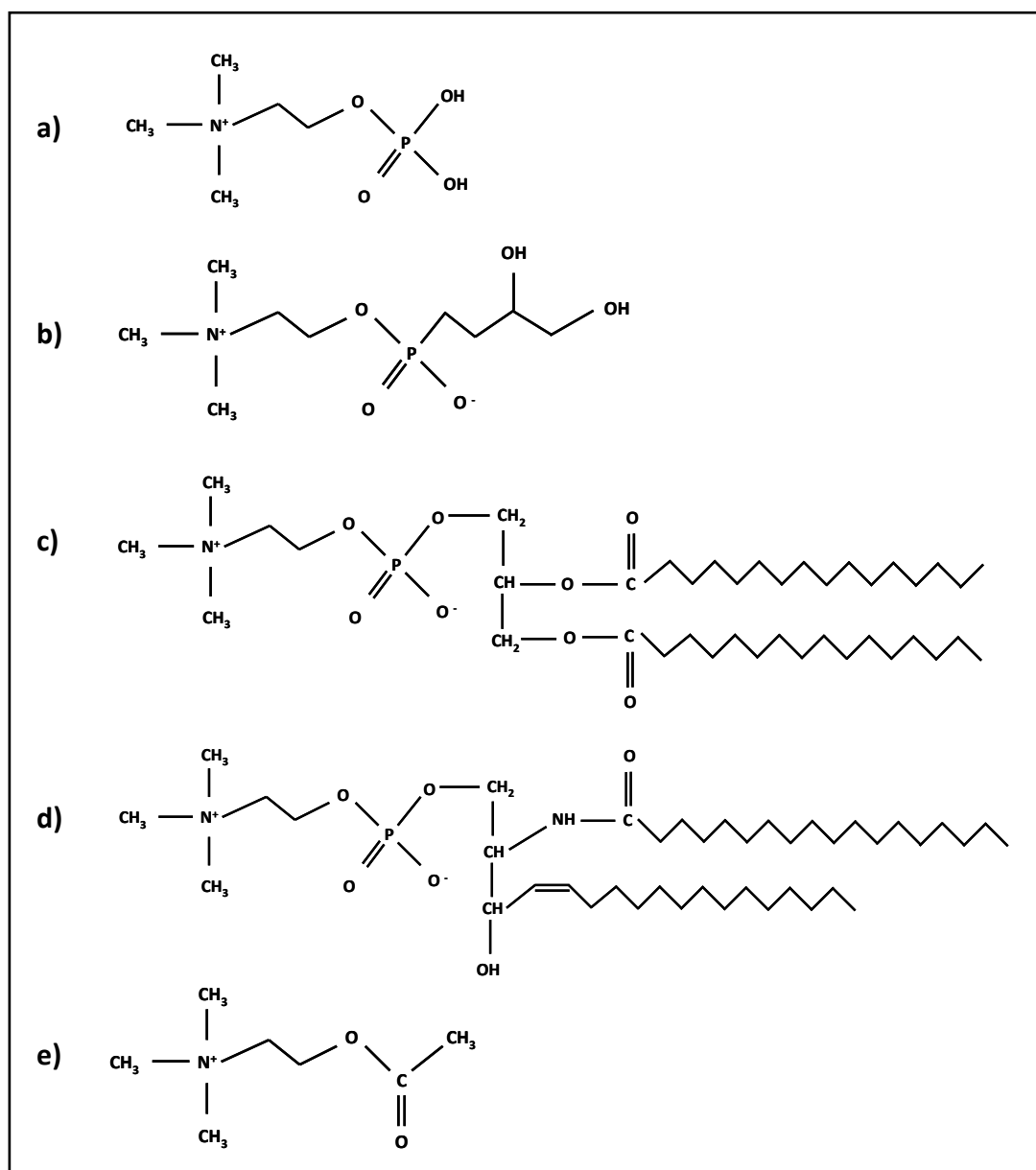


Figura 2. Derivados de la colina.



a) Fosfocolina; b) Glicerofosfocolina; c) Fosfatidilcolina; d) Esfingomielina; e) Acetilcolina.

### 1.1.3. Colina en los alimentos

La colina es el principal dador de grupos metilo de la dieta. Se ha observado que su ingesta puede variar ampliamente entre individuos. La mayor parte de la colina dietética se encuentra en forma de fosfatidilcolina, pero también como fosfocolina, glicerofosfocolina y esfingomielina. Los alimentos más ricos en colina son el hígado de ternera (418 mg/100g), los huevos (251 mg/100g), el germen de trigo (125 mg/100g), la soja (116 mg/100g) y el cerdo (103 mg/100g)<sup>27</sup>. Únicamente la ingesta de huevos se ha asociado positivamente con el estado en colina<sup>28</sup>.

El contenido de colina total en alimentos cocidos es similar al de los alimentos crudos. No obstante, la concentración de colina libre disminuye con la cocción, mientras que la de fosfatidilcolina es proporcionalmente más elevada<sup>27</sup>.

La información referente al contenido exacto de colina en los alimentos fue muy limitada hasta principios del siglo XXI. Zeisel y colaboradores, analizaron el contenido de colina y betaína de los alimentos más comunes utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. La información obtenida se incorporó al *The Nutrient Data Laboratory of the US Department of Agriculture*<sup>27</sup>. Más recientemente, el mismo organismo desarrolló una base de datos de colina más completa. Se analizaron cinco formas distintas de colina (colina libre, glicerofosfocolina, fosfocolina, fosfatidilcolina y esfingomielina) y su metabolito principal, la betaína, de 630 alimentos. Los resultados se expresaron como mg de colina por cada 100 g de alimento. Esta base de datos sustituyó a la que se había creado en marzo de 2004. Se diseñó un nuevo software de *USDA Nutrient Data Bank* con el objetivo de disponer de un sistema para la adquisición, recopilación y distribución de esta información<sup>29</sup>.

### 1.1.4. Necesidades e ingesta adecuada de colina

En 1998 *The Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine (U.S. National Academy of Science)* publicó *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* donde se describieron los valores de referencia de ingesta dietética de las vitaminas del grupo B y de la colina. Los datos experimentales no fueron suficientes para establecer los Requerimientos Medios Estimados (EAR) para la colina, por esto motivo se calculó la Ingesta Adecuada (IA)<sup>25</sup>. Los valores de IA se basaron en evidencias que identificaban la ingesta diaria de colina que prevenía el daño hepático y el hígado graso asociado a la deficiencia de colina<sup>16</sup>. En la **Tabla 1** se muestra la IA

para cada grupo de la población ya que ésta puede estar influenciada por el género, la edad y situación fisiológica.

**Tabla 1.** Ingesta adecuada de colina según *The Institute of Medicine*<sup>25</sup>

Grupo	Edad	IA, mg/día
Bebés	0-6 meses	125
	7-12 meses	150
Niños	1-3 años	200
	4-8 años	250
	9-13 años	375
Hombres	14-18 años	550
	≥ 19 años	550
Mujeres	14-18 años	400
	≥ 19 años	425
Embarazo	Todas las edades	450
Lactancia	Todas las edades	550

La recomendación de IA de colina para bebés hasta los 6 meses se basó en la cantidad contenida en la leche humana producida por madres correctamente nutridas practicando lactancia materna exclusiva. La leche humana contiene 160–210 mg/L de colina y derivados<sup>30</sup>. Para esta franja de edad se fijó una IA de 125 mg/día. La ausencia de información que permitiese generar EAR o IA para bebés de entre 7 y 12 meses, niños y adolescentes obligó a extrapolar los valores a partir de los definidos para adultos, considerando la diferencia de peso y altura<sup>25</sup>.

La cantidad indicada como IA para hombres adultos fue la suficiente para prevenir el incremento de ALT en un hombre sano, aproximadamente 7 mg/Kg/día o 550 mg/día, utilizando como referencia un hombre de 76 kg<sup>16</sup>. Al no disponer de evidencia científica en mujeres, se utilizaron los conocimientos procedentes de estudios en animales. En ratas hembras se determinó una mayor capacidad de síntesis *de novo* de colina que en ratas machos<sup>31</sup>, posiblemente debido a una mayor actividad de la enzima hepática fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT), encargada de la síntesis endógena (*ver apartado 1.1.7. Síntesis endógena*). Por este motivo, se asumió que las mujeres utilizan la

colina de manera más eficiente y se les definió una IA ligeramente inferior, 425 mg/día. No se indicó una IA diferente para ancianos aunque posiblemente los requerimientos sean mayores. Las necesidades de colina de una mujer embarazada son mayores, ya que aportan grandes cantidades al feto, llegando a agotar sus propias reservas. Por este motivo, la IA durante el embarazo se estableció a 450 mg/día. Durante la lactancia, cantidades sustanciales de colina se secretan a la leche humana, lo que incrementa aún más los requerimientos de colina de la mujer<sup>32</sup>. La IA para mujeres que amamantan a sus hijos se fijó en 550 mg/día<sup>25</sup>.

*The Institute of Medicine* informó que existen distintos factores que pueden alterar la IA de colina. Uno de ellos es la interacción de la colina con otros nutrientes que forman parte del metabolismo monocarbonado. Por este motivo hay que tener en cuenta la disponibilidad de folato, vitamina B<sub>12</sub> y metionina de la dieta cuando se recomienda la IA de colina. También se debe considerar la práctica de ejercicio físico intenso, ya que en atletas entrenados se ha observado que la concentración de colina plasmática se reduce aproximadamente un 40%<sup>33,34</sup>.

Otro aspecto a valorar son las distintas formas de colina, ya que los derivados hidrosolubles presentan una biodisponibilidad superior que los liposolubles (*ver apartado 1.1.5 Absorción, transporte y asimilación*). En crías de rata se observó que el 85% de la colina y la fosfocolina, ambas hidrosolubles, se había convertido en betaína después de 24 horas de haber sido administradas. En cambio, tan solo el 13% de la fosfatidilcolina, derivado liposoluble, lo había hecho en el mismo periodo de tiempo<sup>35</sup>.

La reciente publicación de la base de datos con el contenido de colina de los alimentos más comunes ha permitido examinar la ingesta diaria de este nutriente en la población general. Varios estudios epidemiológicos importantes, tanto de Estados Unidos como europeos, han analizado la ingesta diaria de colina recogida mediante cuestionarios de frecuencia de consumo alimentario<sup>36-41</sup>. Se ha observado que la ingesta difiere entre hombres y mujeres, y que puede variar con la edad. En la **Tabla 2** se observa que las medias de ingesta diaria de colina en los hombres oscilan entre 291 y 378 mg/día, mientras que en las mujeres lo hacen entre 285 y 326 mg/día. Estos resultados sugieren que gran parte de la población realiza ingestas inferiores a la IA establecida en 1998. Tan solo en el *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004* se analizó la ingesta de los ancianos mayores de 70 años al margen del resto de población. Observaron que éstos tenían una ingesta de colina inferior al grupo de entre 50 y 70 años<sup>37</sup>.

**Tabla 2.** Ingesta de colina diaria según los grandes estudios epidemiológicos americanos y europeos.

Referencia	Estudio	N			Rango de edad (años)	Media de ingesta de colina <sup>1,2</sup> (mg/día)	
		Total	Hombres	Mujeres		Hombres	Mujeres
Cho E, 2006 <sup>36</sup>	Framingham Offspring Study	1.960	920	1040	28 - 82	312	314
Chiuve SE, 2007 <sup>38</sup>	NHS	1.477	-	867	30 - 55	-	323*
	NHS 2		-	510	25 - 42	-	
Bidulescu A, 2007 <sup>39</sup>	ARIC	14.430	-	-	45 - 64	332 (125)	294 (112)
Keast DR, 2007 <sup>37</sup>	NHANES 1999-2004	6.243	-	-	51 - 70	378	326
					> 70	311	241
Dalmeijer GW, 2008 <sup>40</sup>	PROSPECT-EPIC Cohort	16.165	-	16.165	49 - 70	-	300 (51)
Detopoulou P, 2008 <sup>41</sup>	ATTICA study	3.042	1.514	1.528	18 - 89	291 (79)	285 (75)

**NHS:** Nurse's Health Study; **NHS2:** Nurse's Health Study 2; **ARIC:** Atherosclerosis Risk in Communities; **NHANES:** National Health and Nutrition Examination Survey; **EPIC:** European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; **ATTICA:** región griega que da nombre al estudio. En todos los estudios, la ingesta dietética fue recogida con cuestionarios de frecuencia de consumo alimentario semicuantitativos. <sup>1</sup> Media (SD); <sup>2</sup> Mediana cuando se indica con \*.

La descripción de polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo monocarbonado ha hecho plantearse de nuevo la IA de colina. Un porcentaje considerable de la población puede tener algún polimorfismo que incremente los requerimientos dietéticos de grupos metilo y que por lo tanto aumente las necesidades diarias de colina<sup>42</sup>. En un grupo de hombres con un pobre estado en folato, aquellos que tenían el genotipo *MTHFR* 677TT presentaron una concentración de fosfatidilcolina en plasma inferior a los que tenían el genotipo *MTHFR* 677CC<sup>43</sup>. Por otro lado, individuos portadores del alelo 5,10-Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa-1958A (*MTHFD1* 1958A) sometidos a una dieta carente de colina y sin suplementación con ácido fólico presentaron 7 veces más probabilidad de desarrollar signos de deficiencia de colina que los no portadores de este alelo<sup>44</sup>. El gen *PEMT*, directamente relacionado con el estado en colina del organismo, es altamente polimórfico. Fisher y colaboradores describieron la influencia del polimorfismo *PEMT* -744 G→C sobre la susceptibilidad de desarrollar disfunción hepática en mujeres postmenopáusicas alimentadas con una dieta deficitaria en colina. El tratamiento de estas mujeres con estrógenos disminuyó el riesgo de desarrollar hígado graso a pesar de la presencia del polimorfismo<sup>45</sup>. Asimismo, el 78% de portadores del alelo *PEMT* -744C desarrollaron disfunciones hepáticas cuando se alimentaron con una dieta baja en colina<sup>46</sup>. La identificación de polimorfismos que afectan a los requerimientos dietéticos de colina permitiría calcular con mayor precisión la IA de colina de los individuos.

Se ha propuesto promover el consumo de alimentos ricos en colina por distintos motivos: (1) la colina está involucrada en muchas funciones cruciales de nuestro organismo, (2) hay una parte de la población que no cumple con la IA, (3) la amplia presencia de polimorfismos en la población puede incrementar sus requerimientos dietéticos y (4) determinadas situaciones fisiológicas, como el embarazo, aumentan también los requerimientos de colina. Sin embargo, el contenido de colina de los alimentos está altamente relacionado con el de colesterol, cuyas recomendaciones dietéticas actuales limitan su ingesta como prevención de enfermedades cardiovasculares. Uno de los alimentos cuya ingesta se recomienda consumir con moderación es el huevo, que a su vez es una de las fuentes principales de colina. Por este motivo la implementación de una recomendación sobre el consumo de alimentos ricos en colina es una decisión compleja<sup>47</sup>.

### 1.1.5. Absorción, transporte y asimilación

La colina no esterificada es absorbida en el intestino delgado mediante transporte facilitado o difusión pasiva. Existen tres sistemas de transporte que permiten la entrada de colina al interior de la célula, clasificados según su afinidad:

- a) El transportador con alta afinidad por la colina (*High-affinity Choline Transporter*; CHT1), dependiente de sodio y altamente sensible a la inhibición por parte de hemicolinium-3, análogo de la colina. Proporciona colina a las neuronas colinérgicas del cerebro, tronco encefálico y médula espinal para la síntesis de acetilcolina<sup>48</sup>.
- b) El transportador específico de colina con afinidad intermedia (*Choline-specific Transporter-Like protein*; CTL), dependiente débilmente de sodio, expresado en cerebro y tejidos periféricos<sup>49</sup>.
- c) El transportador con baja afinidad por la colina (*Organic Cation Transporters*; OTC), independiente de sodio, multiespecífico y presente en muchos tejidos. Se encarga de transportar cationes orgánicas endógenas, cationes tóxicas exógenas y fármacos<sup>50</sup>.

Sus derivados hidrosolubles (fosfocolina y glicerofosfocolina) son distribuidos por la circulación portal mientras que sus derivados liposolubles (fosfatidilcolina y esfingomielina) lo hacen a través de la linfa<sup>35</sup>. La fosfatidilcolina es hidrolizada en el lumen intestinal por fosfolipasas A<sub>2</sub> pancreáticas e intestinales para formar lisofosfatidilcolina<sup>51</sup>. Los enterocitos absorben este producto mediante difusión pasiva, una parte importante del cual es reaclada para formar nuevamente fosfatidilcolina y posteriormente ser secretada a la linfa como partículas de quilomicrones. Otra parte de la lisofosfatidilcolina absorbida es deacilada por una fosfolipasa B intestinal, convirtiéndola en glicerofosfocolina y ácido graso<sup>51</sup>. La esfingomielina es hidrolizada por la esfingomielinasa alcalina intestinal para producir ceramida y fosfocolina. La fosfocolina a su vez es hidrolizada por fosfatasas intestinales para formar colina libre que se absorbe de la misma manera que la colina dietética<sup>52</sup>.

Todos los tejidos disponen de colina pero su asimilación es más importante en hígado, cerebro, riñón, glándula mamaria y placenta. No existe un sistema de almacenamiento de colina en las células, de modo que su homeostasis se consigue regulando la tasa de adquisición (ingesta dietética y síntesis endógena) y de depleción (oxidación y secreción biliar)<sup>53</sup>.

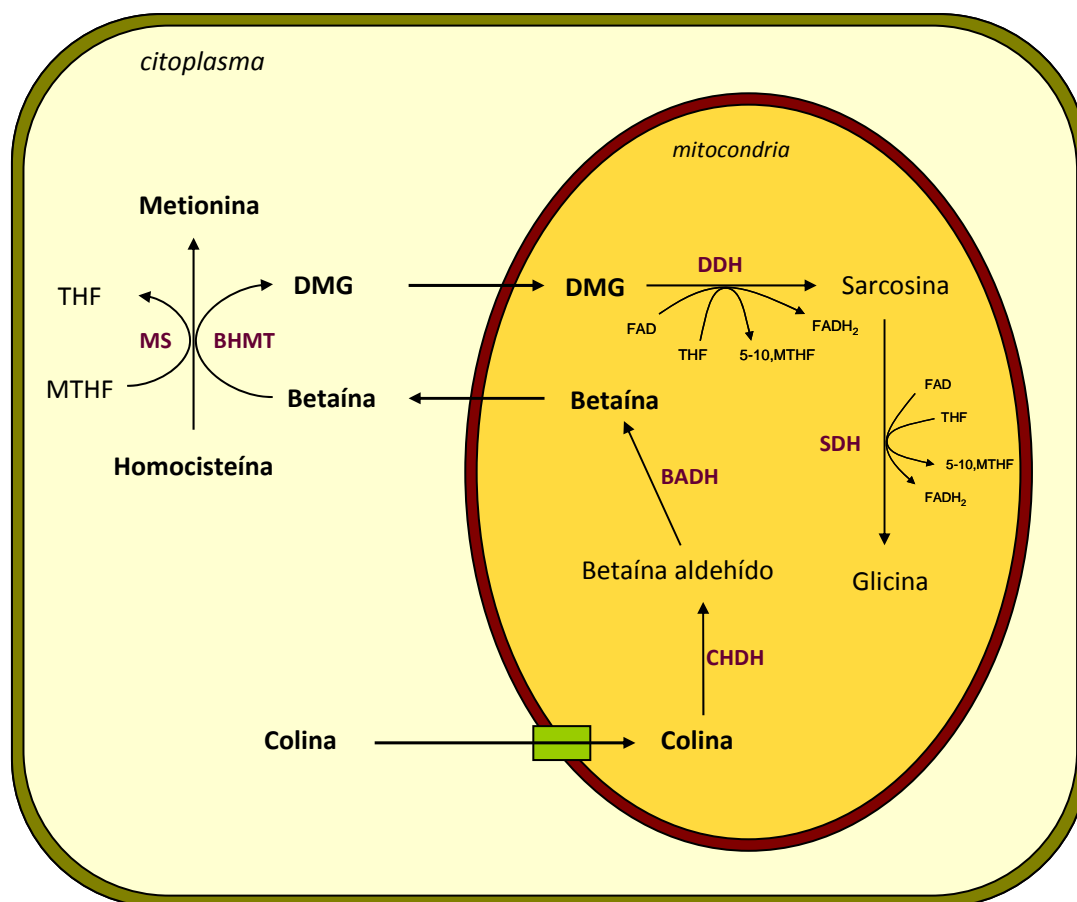


### 1.1.6. *Metabolismo: oxidación de la colina*

La oxidación de la colina a glicina es un proceso energéticamente rentable y anaplerótico. Debido a que la mayor parte del metabolismo monocarbonado tiene lugar en el hígado, la oxidación de la colina se realiza principalmente en dicho órgano.

El proceso de oxidación empieza con el transporte de la colina al interior de la mitocondria (**Figura 3**). Un transportador de colina en la membrana interna de ésta permite su entrada<sup>54</sup> y actúa como factor limitante de su oxidación<sup>55,56</sup>. Una vez en su interior, la colina es oxidada a betaína aldehído mediante la enzima colina deshidrogenasa (CHDH). CHDH es una enzima de la familia de las GMS-oxidoreductasas con un dominio de unión a FAD, localizada en la membrana interna de la mitocondria<sup>57,58</sup>. Rápidamente, la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza la conversión NAD-dependiente de la betaína aldehído a betaína. Aunque el 95% de la actividad enzimática de BADH es citosólica, la betaína se produce en la matriz mitocondrial y posteriormente se dirige al citoplasma<sup>59,60</sup>. A continuación, tiene lugar la transformación de betaína a dimetilglicina (DMG), reacción irreversible catalizada por la enzima citosólica betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT)<sup>61,62</sup>. Ésta transfiere un grupo metilo de la betaína a la homocisteína (Hcy) y como producto resulta la DMG y la metionina<sup>63</sup>. Los dos últimos pasos se tratan de dos reacciones de oxidación. La DMG se transfiere de nuevo al interior de la mitocondria y se convierte en sarcosina gracias a la dimetilglicina deshidrogenasa (DDH). La sarcosina, finalmente, se transforma en glicina, reacción catalizada por la enzima sarcosina deshidrogenasa (SDH). Tanto DDH como SDH son enzimas que requieren FAD y tetrahidrofolato (THF) para producir FADH<sub>2</sub> y 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF), respectivamente<sup>64</sup>.

Figura 3. Oxidación de la colina



**THF:** Tetrahidrofolato; **MTHF:** Metiltetrahidrofolato; **Hcy:** Homocisteína; **DMG:** Dimetilglicina; **MS:** Metionina Sintasa; **BHMT:** Betaína-homocisteína metiltransferasa; **CHDH:** colina deshidrogenasa; **BADH:** Betaína aldehído deshidrogenasa; **DDH:** Dimetilglicinadeshidrogenasa; **SDH:** Sarcosina deshidrogenasa. *Adaptación de Ueland y colaboradores, 2005<sup>65</sup>.*

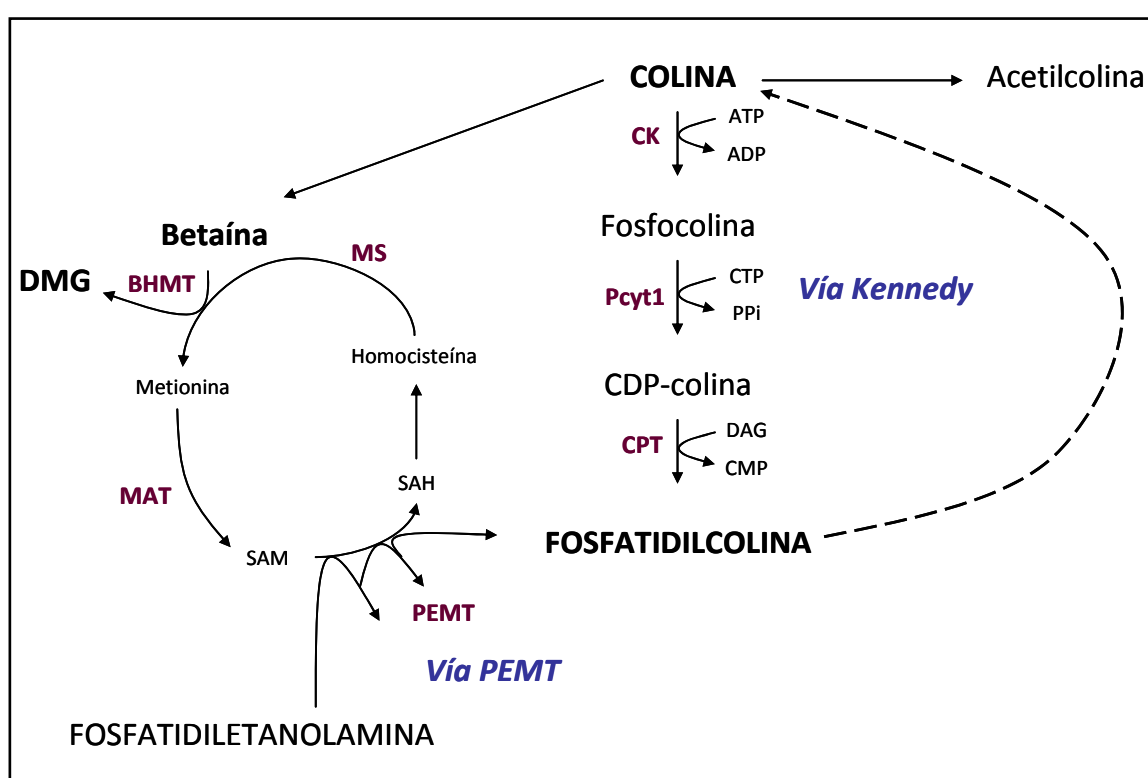
### 1.1.7. Síntesis endógena

La colina, sea ingerida mediante la dieta o bien procedente de producción endógena, se utiliza principalmente para la síntesis de fosfatidilcolina, que representa alrededor del 95% de la colina total del organismo. El 5% restante se encuentra en forma de colina libre, fosfocolina, glicerofosfocolina, CDP-colina y acetilcolina<sup>53</sup>.

Existen dos rutas para la síntesis de fosfatidilcolina. La primera utiliza la colina dietética y tiene lugar a través de la *ruta Kennedy*<sup>9</sup> (**Figura 4**). La segunda utiliza fosfatidiletanolamina que experimenta tres metilaciones secuenciales por parte de la enzima PEMT convirtiéndose así en fosfatidilcolina. La S-adenosilmetionina (SAM) es el dador de grupos metilo de estas reacciones de metilación<sup>14,66</sup> (**Figura 4**). La ruta PEMT se encuentra principalmente en el hígado aunque

también se ha detectado en cerebro bovino<sup>67</sup>. Su activación protege la integridad de la membrana celular y asegura el correcto funcionamiento de la neurotransmisión colinérgica<sup>68</sup>. La actividad PEMT es imprescindible cuando la ingesta de colina es limitada o nula pero no es suficiente para cubrir los requerimientos de nuestro organismo. Al administrar una dieta deficiente en colina a ratones *PEMT*<sup>-/-</sup> se observó una disminución del 50% de la cantidad de fosfatidilcolina hepática y el desarrollo de un fallo hepático irreversible<sup>69</sup>.

Figura 4: Síntesis de la fosfatidilcolina



**CK:** Colina quinasa; **ATP:** Adenosina trifosfato; **ADP:** Adenosina difosfato; **Pcyt1:** CTP: fosfocolina citidil transferasa 1; **CTP:** Citidina trifosfato; **PPi:** Pirofosfat; **CDP:** Citidina difosfocolina; **CPT:** CDP-colina:DAG colinafosfotransferasa; **DAG:** Diacilglicerol; **CMP:** Citidina monofosfato; **BHMT:** Betaína-homocisteína metiltransferasa; **MS:** Metionina sintasa; **MAT:** Metionina adenosiltransferasa; **SAM:** S-adenosilmetionina; **SAH:** S-adenosilhomocisteína; **PEMT:** Fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa; **DMG:** Dimetilglicina. *Adaptación de Michel y colaboradores, 2006*<sup>70</sup>.

Un 70% de toda la síntesis de fosfatidilcolina se realiza a través de la *ruta Kennedy* mientras que el 30% restante se da a través de la metilación secuencial de PEMT<sup>71</sup>. No obstante, los patrones bioquímicos del metabolismo de la fosfatidilcolina difieren entre ambos sexos y pueden hacer variar estos porcentajes. Mientras que los machos de algunas especies utilizan principalmente la *ruta Kennedy*, las hembras priorizan la utilización de la vía PEMT. Estudios con ratas demuestran que las hembras son menos sensibles a la deficiencia de colina<sup>72</sup> y producen más fosfatidilcolina vía PEMT que los machos<sup>73</sup>. Chew y colaboradores detectaron también diferencias entre ratones de ambos sexos. Bajo una restricción de folato dietético, las hembras presentaron un mayor uso de la colina dietética como dador de grupos metilo, una mayor utilización de la vía PEMT para sintetizar fosfatidilcolina comparado con la *ruta Kennedy* y un índice de degradación de la fosfatidilcolina más elevado en comparación con los machos. Estos últimos duplicaron la expresión de CHDH y aumentaron la oxidación de colina pero la homeostasis de colina se mantuvo constante<sup>74</sup>.

De manera análoga se ha observado en humanos que, ante una deficiencia de colina, los hombres y las mujeres postmenopáusicas desarrollan hígado graso en el 77% y 80% de los casos respectivamente. En cambio, entre las mujeres premenopáusicas, tan solo el 44% presentan alguna disfunción hepática<sup>24</sup>. La concentración de estrógeno es lo que difiere entre ambos grupos. Ressieguie y colaboradores, observaron un aumento de la expresión de mRNA de PEMT y de su actividad enzimática en respuesta a estrógeno en hepatocitos humanos. Esto sugirió que las mujeres premenopáusicas tienen una mayor capacidad de síntesis de colina endógena gracias a una concentración más elevada de estrógeno<sup>75</sup>. Recientemente, se ha determinado el mecanismo mediante el cual el estrógeno regula la transcripción del gen PEMT, que tiene varios elementos de respuesta a estrógeno en su región promotora<sup>76</sup>.

Durante la gestación y la lactancia la demanda de colina es especialmente elevada de modo que las reservas maternas pueden agotarse<sup>77,78</sup>. La concentración de estradiol aumenta a lo largo del embarazo especialmente durante el primer trimestre, aunque durante el segundo y tercero esta concentración puede llegar a ser hasta 5 veces mayor<sup>79</sup>. Éste incremento permite a su vez aumentar la síntesis endógena de colina para conseguir la concentración óptima necesaria en esta situación fisiológica<sup>80</sup>.

### 1.1.8. Funciones bioquímicas

El papel de la colina en el organismo es complejo. Es una molécula necesaria para la estructura de la membrana y la señalización celular (fosfolípidos), el transporte de lípidos (lipoproteínas), la síntesis de neurotransmisores y el desarrollo cerebral (acetilcolina) y el metabolismo monocarbonado (dador de grupos metilo y metilación del ADN). Además, se trata de una molécula esencial para la vida celular ya que su ausencia provoca apoptosis en células hepáticas y cerebrales<sup>81,82</sup>.

#### Estructura de la membrana y señalización celular

La fosfatidilcolina es el fosfolípido predominante en la parte externa de la membrana celular eucariota junto con la esfingomielina, aunque en menor medida. El aparato de Golgi y las membranas lisosomales son particularmente ricas en esfingomielina. Las pequeñas moléculas bioactivas producidas por la fosfatidilcolina y la esfingomielina activan o finalizan diversas cascadas de señalización<sup>83</sup>.

#### Transporte de lípidos

Los triacilgliceroles producidos por el hígado se distribuyen a los tejidos periféricos utilizando las VLDL. La fosfatidilcolina es un componente necesario para formar estas partículas. Por este motivo, ante una deficiencia de colina se reduce la síntesis de fosfatidilcolina en las células hepáticas y la formación de VLDL. La consecuencia principal es una acumulación de triacilgliceroles en el hígado, que desemboca en hígado graso<sup>73</sup>.

La fosfatidilcolina sintetizada en el hígado también se secreta en la bilis donde actúa como surfactante para facilitar la digestión lipídica. Parte de esta fosfatidilcolina es reabsorbida por el intestino delgado y retorna al hígado<sup>84</sup>.

#### La neurotransmisión y el desarrollo cerebral

Una pequeña fracción de la colina dietética es acetilada en el citoplasma de las neuronas colinérgicas mediante la enzima acetilcolintransferasa (ChAT) para formar acetilcolina<sup>85</sup>. Su síntesis puede estar afectada por la disponibilidad de su precursor, una inhibición retroactiva del propio producto, la actividad del transportador que permite la entrada de colina al interior de las neuronas y por la cinética de la reacción<sup>86</sup>.

La acetilcolina es un neurotransmisor presente en el sistema nervioso central y periférico, relacionado con la memoria. También tiene un papel crucial en los estadios tempranos de la

gestación, momento en que se produce el cierre del tubo neural<sup>87</sup>. Una dieta periconcepcional con una elevada ingesta de colina o bien una elevada concentración sérica de colina total (superior a 3,21 mmol/L) a media gestación se asocia con una reducción del riesgo de tener un embarazo afectado por defectos del tubo neural (DTN)<sup>88,89</sup>.

Un estado óptimo en colina también es particularmente importante durante la parte final del embarazo y el período neonatal, momento de desarrollo del hipocampo, órgano responsable de la memoria<sup>90</sup>. La suplementación con colina prenatal en ratas incrementa la capacidad de las neuronas del hipocampo de transmitir señales entre neuronas de forma duradera (*Long Term Potentiation*; LTP) y mejora la memoria espacial<sup>91,92</sup>. La LTP se considera uno de los mecanismos principales subyacente al aprendizaje y la memoria<sup>93</sup>. La deficiencia prenatal de colina, en contraposición, incrementa el umbral de LTP ralentizando el procesamiento temporal<sup>94,95</sup>. El mecanismo mediante el cual la concentración de colina durante el embarazo influye sobre la memoria de la descendencia todavía se desconoce. Una hipótesis sostiene que la colina induce cambios en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la diferenciación de las células nerviosas, hecho que podría repercutir sobre la memoria<sup>96</sup>.

#### Metabolismo monocarbonado

El *metabolismo monocarbonado* hace referencia a las reacciones que utilizan el THF como coenzima y a aquellas que transfieren un grupo metilo. La transferencia de unidades de un carbono por parte de folato tiene lugar en reacciones como la síntesis de purinas, la interconversión de serina y glicina y la remetilación de la Hcy. La serina y la glicina, junto con la colina, son fuentes de grupos metilo que complementan los producidos en el metabolismo del folato.

La colina en concreto, una vez oxidada en la mitocondria de las células hepáticas y renales, se convierte en betaína y entra en el ciclo monocarbonado como dador de grupos metilo en la remetilación de la Hcy a metionina<sup>97</sup>. Seguidamente, la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT) convierte la metionina en SAM<sup>98</sup>, un dador de grupos metilo universal y agente de metilación para muchas reacciones enzimáticas, incluyendo la metilación de la fosfatidiletanolamina para formar fosfatidilcolina<sup>14</sup>.

No obstante, dado que la vía metabólica de la colina se encuentra exclusivamente en el hígado y los riñones, aún se desconoce la contribución exacta de la colina al conjunto del metabolismo monocarbonado en determinados estados nutricionales y fisiológicos.

### 1.1.9. Estado en colina

En ayunas, la concentración de colina plasmática varía entre 7 y 20  $\mu\text{mol/L}$ , aunque para la mayoría de individuos se mantiene en 10  $\mu\text{mol/L}$ <sup>16,99,100</sup>. La ingesta de alimentos comunes que contienen grandes cantidades de colina hace aumentar significativamente la concentración de colina plasmática durante las 3-7 horas posteriores. La respuesta es la misma independientemente de cuál sea el origen alimentario de la colina. En contraposición, una dieta baja en colina no genera cambios significativos en la concentración de colina plasmática en las 24 horas posteriores<sup>100</sup>.

El estado en colina es distinto en adultos que en recién nacidos o lactantes. Ozarda y colaboradores observaron en un grupo de recién nacidos, independientemente del tipo de parto (cesárea o vía vaginal), un descenso brusco de colina plasmática justo después de nacer. Sin embargo, 24 horas después volvieron a recuperar la concentración basal<sup>101</sup>. Un estudio realizado en Turquía describió que durante los primeros 28 días tiene lugar un descenso sustancial de la colina plasmática, pasando de una concentración media de 35.1  $\mu\text{mol/L}$  a 24.2  $\mu\text{mol/L}$ . A partir de este momento empieza un descenso paulatino que dura 2 años hasta llegar a 14.3  $\mu\text{mol/L}$ . No es hasta el principio de la adolescencia cuando se alcanza la concentración habitual de los adultos<sup>78</sup>.

Existen varios factores nutricionales, biológicos y genéticos que pueden influir sobre el estado de colina. En cuanto a la dieta, los huevos y el café fueron los alimentos que generaron un mayor incremento y reducción, respectivamente, en la concentración plasmática de colina en una población adulta de ambos sexos<sup>28</sup>. Asimismo, en un estudio exclusivamente de hombres, un incremento en la ingesta diaria de colina total se tradujo en un aumento de la colina libre y de la fosfatidilcolina en plasma y en una elevación de la tasa de excreción urinaria<sup>43</sup>.

Por otro lado, ratas machos tratadas con una dieta suplementada con vitaminas del tipo B presentaron una colina plasmática más elevada que aquellas tratadas con una dieta pobre en éstas vitaminas. La vitamina B<sub>6</sub> y la B<sub>12</sub> podrían contribuir a la disponibilidad de colina, por un lado incrementando la síntesis endógena de colina vía PEMT y por otro, reduciendo su utilización vía BHMT<sup>102</sup>.

El estrógeno, que interviene en la síntesis de colina vía PEMT, también influye en la colina plasmática<sup>75</sup>. Por este motivo se han llevado a cabo varios estudios únicamente con mujeres premenopáusicas. En uno de ellos se encontró una falta de asociación entre cambios

moderados en la ingesta de colina y su concentración en plasma, con un correcto estado en folato<sup>103</sup>. Es probable que la elevada actividad enzimática de PEMT en mujeres premenopáusicas sea capaz de compensar pequeños cambios en la colina dietética. De todas formas, después de un periodo de restricción de folato, se observó una reducción de la fosfatidilcolina y esfingomiélinina en plasma, sugiriendo así que una ingesta inadecuada de folato sí es capaz de alterar la homeostasis de la colina<sup>103</sup>. Es posible que, en ausencia de metiltetrahidrofolato (MTHF), haya una reducción de la disponibilidad de grupos metilo procedentes del ciclo del folato y se produzca un incremento de la utilización de la colina en las reacciones de metilación. Otra posibilidad es la reducción de la síntesis de fosfatidilcolina vía PEMT<sup>103,104</sup>.

Fisher y colaboradores confirmaron el efecto del estrógeno sobre el desarrollo de disfunción hepática debido a una deficiencia de colina, con 22 mujeres postmenopáusicas aleatorizadas en dos grupos, uno placebo y otro tratado con estrógeno. Se les administró una dieta deficiente en colina hasta que desarrollaron indicios de disfunción hepática (alteración de los marcadores ALT, AST, CPK o bien incremento del porcentaje de grasa en el hígado). Si no aparecían estos síntomas, la dieta se administró durante 42 días. El grupo que recibía placebo presentó 4 veces más de probabilidad de desarrollar disfunción hepática que el que recibía estrógeno. Sin embargo, en este último grupo no se observó incremento de colina o de sus metabolitos en plasma<sup>45</sup>. En contraposición, Wallace y colaboradores describieron que la mediana de colina libre plasmática de un grupo de mujeres postmenopáusicas tratadas con terapia hormonal sustitutiva era superior al grupo que no se sometía a este tratamiento (7.4 nmol/L vs 6.9 nmol/L;  $p=0.057$ )<sup>105</sup>.

El origen étnico de las mujeres también puede repercutir sobre el estado en colina. La respuesta a una intervención con ácido fólico fue inferior tanto en el estado en folatos como en colina en mujeres afroamericanas respecto a mujeres caucásicas y mejicanas<sup>106</sup>.

El estado en colina puede verse modificado por la presencia de determinados polimorfismos en enzimas involucradas en las reacciones de transferencia de grupos metilo, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.4. *Necesidades e Ingesta Adecuada de colina*.



### *1.1.10. Efecto de la deficiencia de colina sobre la homocisteína y las reacciones de metilación.*

Una consecuencia de la deficiencia de colina es el incremento de la concentración plasmática de Hcy total en ayunas (tHcy). En un estudio observacional con un subgrupo de mujeres del *Nurse's Health Study* y *Nurse's Health Study 2* se registró su ingesta con cuestionarios de frecuencia de consumo alimentario semicuantitativos y se determinó la tHcy. Se observó que las mujeres que se hallaban en el quintil más alto de ingesta de colina y betaína presentaban una tHcy un 8% inferior que las del quintil más bajo, incluso ajustando por ingesta de folato<sup>38</sup>.

Los resultados obtenidos de estudios de intervención aportan datos coincidentes. Un estudio administró a ocho hombres voluntarios sanos una dieta deficiente en colina (<50 mg/día) durante 42 días, o bien hasta que mostrasen signos de deficiencia. Los participantes presentaron una tHcy superior que al empezar el estudio, incluso consumiendo las cantidades adecuadas de folato y otras vitaminas del tipo B<sup>107</sup>. Cuando el estado en folato no es óptimo, la tHcy se incrementa aun más<sup>24</sup>.

Debido a que la hiperhomocitemia es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares<sup>108</sup>, se ha propuesto la suplementación con colina para intentar reducir la tHcy. Olthof y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico cruzado, a doble ciego, controlado con placebo, con 26 hombres de entre 50 y 71 años que presentaban una elevada tHcy (rango: 11.0-23.1  $\mu\text{mol/L}$ ). Los participantes fueron estratificados según su tHcy y su hábito tabáquico. A continuación se les asignó aleatoriamente al grupo de suplementación con fosfatidilcolina o al grupo placebo. Al finalizar el periodo de suplementación, la tHcy fue un 18% inferior comparado con el periodo de placebo. El efecto de la suplementación con fosfatidilcolina sobre la tHcy fue la misma independientemente del orden de los tratamientos<sup>109</sup>.

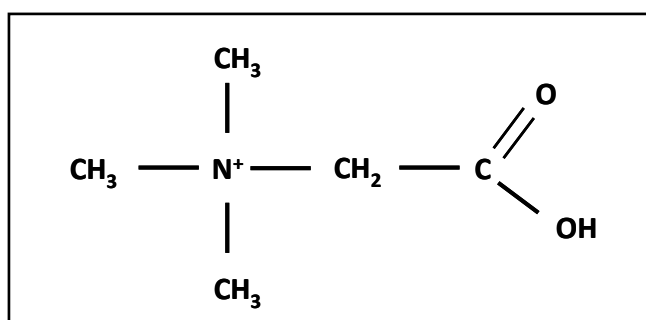
La deficiencia en colina también se ha relacionado con alteraciones del ADN: daño oxidativo en las bases nitrogenadas, reducción de la formación de timidina, aumento de la incorporación de uracilo durante la replicación, reducción de la metilación e inestabilidad genómica<sup>110</sup>.

## 1.2. La betaína

### 1.2.1. La estructura

La betaína, también conocida como glicina-betaína (N,N,N-trimetilglicina), se descubrió en el siglo XIX en la savia de la remolacha azucarera<sup>111</sup>. Es un aminoácido trimetilado (**Figura 5**) que a pH neutro se encuentra en su forma zwitteriónica. Su fórmula es  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$  y su peso molecular es de 117.2 g/mol<sup>112</sup>.

Figura 5: Estructura de la betaína



### 1.2.2. Betaína en los alimentos e ingesta diaria

Los humanos obtienen la betaína mediante la dieta, ya que está presente en los alimentos en cantidades variables. El *US Department of Agriculture* desarrolló una base de datos con el contenido de colina y betaína de los alimentos. Los alimentos con mayor concentración de betaína son: salvado de trigo (1339 mg/100 g), germen de trigo (1241 mg/100 g), espinacas (645 mg/100 g), gamba (218 mg/100 g) y pan de trigo (201 mg/100 g). En general, las frutas y las verduras contienen cantidades muy bajas de betaína (<10 mg/100 g), a excepción de las espinacas y la remolacha<sup>27</sup>. No obstante, existen moléculas análogas a la betaína que sí se encuentran en las plantas. Tal es el caso de la prolina betaína, que se encuentra en algunas variedades de cítricos<sup>113</sup> y legumbres<sup>114</sup>, y la trigonelina, presente en el grano de café<sup>115</sup>, la avena<sup>114</sup> o los tomates<sup>116</sup>.

El contenido de betaína de un mismo alimento puede ser variable debido a su función osmoprotectora y crioprotectora, ya que el nivel de estrés osmótico del cultivo provoca cambios en la concentración de betaína de determinados alimentos<sup>117</sup>. Otros factores que modifican la cantidad de betaína de los alimentos son el procesado (fresco o en conserva) y la cocción. Ya sean cocidos al horno, al microondas, a la sartén o al vapor, los alimentos no

presentan grandes diferencias en cuanto al contenido de betaína. En cambio, los alimentos hervidos pierden un 60-80% de su contenido<sup>114</sup>.

El rango de ingesta diaria de betaína es de 0.1-1 g, aunque puede llegar hasta 2.5, en función de la cantidad de trigo integral y marisco<sup>118</sup>. En una población de 4636 hombres y mujeres de Nueva Zelanda se describió una ingesta diaria media de 298 mg. Los hombres presentaron una ingesta más elevada que las mujeres y un descenso con la edad<sup>117</sup>. Posteriormente, se analizó la ingesta de betaína (mediante cuestionarios de frecuencia de consumo alimentario semicuantitativos) en grandes estudios epidemiológicos<sup>36-41</sup>. Los resultados son más variables que en el caso de la ingesta de colina, aunque similares entre sexos. La población griega del estudio ATTICA presenta una ingesta de betaína superior comparada con las poblaciones americanas. En la **Tabla 3** se observa que en dichos estudios las medias de ingesta de betaína oscilan entre 102 y 314 mg/día.

**Tabla 3.** Ingesta de betaína diaria en los grandes estudios epidemiológicos americanos y europeos.

Referencia	Estudio	N			Rango de edad (años)	Ingesta de betaína <sup>1,2</sup> (mg/día)	
		Total	Hombres	Mujeres		Hombres	Mujeres
Cho E, 2006 <sup>36</sup>	Framingham	1.960	920	1040	28 - 82	200	216
	Offspring Study.						
Chiuve SE, 2007 <sup>38</sup>	NHS	1.477	-	867	30 - 55	-	189*
	NHS2		-	510	25 - 42		
Bidulescu A, 2007 <sup>39</sup>	ARIC	14.430			45 - 64	118 (55)	102 (47)
Dalmeijer GW, 2008 <sup>40</sup>	PROSPECT-EPIC Cohort	16.165	-	16.165	49 - 70	-	214(74)
Detopoulou P, 2008 <sup>41</sup>	ATTICA Study	3.042	1.514	1.528	18 - 89	306(118)	314(105)
Xu, 2009 <sup>119</sup>	LIBCSP	1.508	-	1.508	-	-	127

**NHS:** Nurse's Health Study; **NHS2:** Nurse's Health Study 2; **ARIC:** Atherosclerosis Risk in Communities; **EPIC:** European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; **ATTICA:** región griega que da nombre al estudio; **LIBCSP:** Study Long Island Breast Cancer Study Project. En todos los estudios la ingesta dietética fue recogida con cuestionarios de frecuencia de consumo alimentario semicuantitativos. <sup>1</sup> Media (SD); <sup>2</sup> Mediana cuando se indica con \*.

### 1.2.3. Absorción, transporte, asimilación y metabolismo

La betaína es absorbida en el íleon mediante transportadores IMINO<sup>120</sup> junto con otras betaínas dietéticas (prolina-betaína y trigonelina). Su absorción y distribución celular es rápida. Entre 1 y 2 horas después de la ingesta se observa un incremento de su concentración sérica. La ingesta de suplementos orales de betaína presenta una biodisponibilidad próxima al 100%<sup>121</sup>. La incorporación a la célula tiene lugar a través de sistemas de transporte de aminoácidos, principalmente con el transportador de betaína/ácido  $\gamma$ -aminobutírico (BGT1)<sup>122</sup>.

La oxidación de la colina, localizada principalmente en las mitocondrias de las células hepáticas y renales, produce la betaína. Su metabolismo genera secuencialmente DMG, sarcosina y glicina (reacciones descritas en el apartado 1.1.6. *Metabolismo: oxidación de la colina*) (**Figura 3**). La betaína se elimina principalmente a través de su catabolismo, ya que su excreción urinaria es ínfima<sup>121</sup>. En un estudio a cuyos participantes se les administraron altas dosis de betaína, sea a través de la dieta o como suplemento oral, no se observaron cambios en su excreción urinaria de betaína<sup>123</sup>.

### 1.2.4. Funciones bioquímicas

La betaína tiene tres funciones principales en los mamíferos. En primer lugar, cuando la betaína no es catabolizada, se utiliza como osmolito orgánico. La célula regula su volumen ajustando la concentración de osmolitos intracelulares. Los osmolitos pueden ser inorgánicos, como el sodio, el potasio y los iones clorados, o bien orgánicos como la betaína, la glicerofosfocolina, el *myo*-inositol, el sorbitol y los aminoácidos<sup>124</sup>. No obstante, el incremento de la concentración intracelular de iones inorgánicos es limitado porque modifican las estructuras proteicas y las funciones enzimáticas. En cambio, la betaína no altera el metabolismo celular y estabiliza sus funciones bajo diferentes tipos de estrés<sup>112,125</sup>. El transportador de betaína osmoregulador *BGT-1* se identificó en la médula del riñón<sup>126</sup>, donde las concentraciones de betaína son excepcionalmente elevadas (>100mM)<sup>127</sup>. En segundo lugar, la betaína intracelular actúa como chaperona para estabilizar las estructuras de las proteínas cuando la célula se halla bajo condiciones de desnaturalización<sup>122</sup>. Finalmente, la betaína también sirve como dador de grupos metilo en la reacción que convierte la Hcy a metionina. En esta reacción, catalizada por la enzima BHMT, la betaína se transforma en DMG<sup>128</sup>. Por su participación en esta reacción, la betaína, junto con la colina, está directamente implicada en el metabolismo monocarbonado.

### 1.2.5. Estado en betaína

Hasta la fecha, aún no se ha publicado un rango de referencia para la concentración plasmática de betaína en humanos. Sin embargo, los estudios realizados son coincidentes, incluso utilizando métodos de detección distintos. En general, la concentración plasmática de betaína en adultos se encuentra entre 20 y 70  $\mu\text{mol/L}$ <sup>127</sup>. Una dieta rica en betaína se traduce en un aumento de su concentración en plasma<sup>129</sup>. No obstante, este incremento es más rápido tras la toma de un suplemento oral que tras la ingesta de una comida con alto contenido en betaína. Esto refleja una rápida absorción por parte del suplemento oral. En cambio la betaína de la comida, que requiere de una ruptura mecánica previa de los alimentos para ser absorbidos, llega a la circulación portal más lentamente<sup>123</sup>. La concentración de betaína en plasma o suero tiende a ser alrededor de un 15% superior en hombres que en mujeres. En la **Tabla 4** se presentan las concentraciones plasmáticas obtenidas en distintas poblaciones de voluntarios sanos<sup>130-137</sup>.

**Tabla 4:** Rango de betaína plasmática ( $\mu\text{mol/L}$ ) en ayunas en adultos (hombres y mujeres).

Referencia	N			Edad <sup>a</sup> (años)	Betaína plasmática ( $\mu\text{mol/L}$ )		
	Total	Hombres	Mujeres		Total	Hombres	Mujeres
Allen RH, 1993 <sup>130</sup>	60	30	30	18-65	18-73 <sup>b</sup>	-	-
Holm PI, 2003 <sup>131</sup>	60	22	38	20-65	27-41 <sup>c</sup>	-	-
Melse-Boonstra A, 2005 <sup>132</sup>	308	182	126	50-75	25-45 <sup>d</sup>	26-47 <sup>d</sup>	24-44 <sup>d</sup>
Holm PI, 2005 <sup>137</sup>	500	208	292	31-69	19-45 <sup>d</sup>	26-51 <sup>d</sup>	16-39 <sup>d</sup>
Shwab U, 2006 <sup>133</sup>	10	3	7	41(12) <sup>e</sup>	27-67 <sup>b</sup>	-	-
Holm PI, 2007 <sup>134</sup>	10.601	5.221	5.381	50-64	-	23-71 <sup>b</sup>	15-57 <sup>b</sup>
Konstantinova SV, 2008 <sup>135</sup>	7.045	1.657	2.062	47-49	39(12) <sup>e</sup>	26-72 <sup>b</sup>	17-56 <sup>b</sup>
		1.466	1.860	41-74		26-74 <sup>b</sup>	20-62 <sup>b</sup>
Lever M, 2009 <sup>136</sup>	16	16	-	19-40	-	38(5) <sup>e</sup>	-

<sup>a</sup> Rango estadístico; <sup>b</sup> Rango 95%; <sup>c</sup> Rango intercuartil; <sup>d</sup> Rango 90%; <sup>e</sup> Media (DE)

La concentración plasmática de betaína presenta una variabilidad inter-individual sustancial<sup>136,138</sup>, mientras que su variabilidad intra-individual a lo largo del tiempo es muy pequeña, probablemente debido a un estricto control metabólico<sup>139</sup>.

Las diferencias observadas entre sexos en las concentración de betaína plasmática puede deberse a una diferente regulación hormonal. En una población adulta (43-63 años) con alteraciones lipídicas se encontraron distintos predictores de betaína plasmática en función del sexo. Mientras que en los hombres la insulina y la apolipoproteína B fueron los predictores más fuertes, en las mujeres lo fueron la carnitina plasmática y urinaria<sup>138</sup>.

#### 1.2.6. Suplementación con betaína

Se han utilizado distintas estrategias nutricionales para disminuir la tHcy. Está ampliamente aceptado que la suplementación con ácido fólico reduce la tHcy. Un metanálisis que incluyó 27 ensayos clínicos concluyó que dosis diarias de 0.2 o 0.8 mg de ácido fólico se asocian con una reducción del 13% o 23 % de tHcy, respectivamente. Al añadir la suplementación con vitamina B<sub>12</sub> se consiguió una reducción aún mayor<sup>140</sup>. Asimismo, en pacientes con enfermedades vasculares se observó una reducción de la tHcy al combinar la suplementación con ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub><sup>141</sup>.

La suplementación oral con betaína se ha utilizado como tratamiento para la homocistinuria desde medianos del siglo XIX<sup>142,143</sup>. Se han llevado a cabo varios estudios de intervención para demostrar este efecto, tanto en poblaciones sanas como en individuos que presentaban una elevada tHcy. Uno de ellos, realizado con 15 sujetos sanos, demostró que la suplementación con 6 g/día de betaína durante 3 semanas reducía ligeramente la tHcy<sup>144</sup>. Posteriormente, se realizó un estudio a doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo en una población de 46 obesos sin disfunciones hepáticas ni renales. La suplementación con 6 g/día durante 12 semanas, que se tradujo en una concentración de betaína plasmática 10 veces superior a la inicial, resultó en una reducción del 9% de la Hcy sérica<sup>145</sup>. La dosis de 6 g/día representa la dosis máxima efectiva. El máximo efecto de la betaína sobre la tHcy tiene lugar entre la primera y la segunda semana de tratamiento<sup>146</sup>.

La misma dosis de suplementos de betaína fue también efectiva para reducir la tHcy en personas con hiperhomocisteinemia, tanto en ayunas como después de una sobrecarga de metionina<sup>147</sup>. Se ha contrastado el efecto de diferentes cantidades de suplementación diaria de betaína sobre la reducción de la tHcy<sup>146,148,149</sup>. Olthof y colaboradores administraron tres cantidades de betaína distintas, 1.5 g/día, 3 g/día y 6 g/día, a sujetos que presentaban elevada tHcy durante 6 semanas. Demostraron una relación dosis-respuesta entre la suplementación de betaína y la tHcy, de modo que a mayor dosis de betaína más disminuía la tHcy. Destacaron que incluso la dosis más baja ejercía efecto sobre la tHcy tanto en ayunas como después de la

sobrecarga de metionina<sup>148</sup>. La dosis de 1.5 g/día se encuentra dentro del rango diario de ingesta de betaína dietética, lo que sugiere que una dieta rica en betaína podría reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares disminuyendo la tHcy. De hecho, se demostró que tanto una dieta rica en betaína como en colina era capaz de aumentar la concentración de betaína plasmática, provocar una pequeña reducción de la tHcy y atenuar el aumento de la concentración de Hcy que aparece como respuesta a una sobrecarga de metionina<sup>123</sup>.

La suplementación con ácido fólico combinado con betaína produce una disminución de tHcy ligeramente superior a la betaína por sí sola<sup>146</sup>. Así, en sujetos con una respuesta limitada al ácido fólico, se podría aumentar la efectividad del tratamiento mediante la combinación de ambos suplementos ya que estos se metabolizan en órganos distintos.

### **1.3. Técnicas para determinar la colina y la betaína**

A lo largo de la historia se han utilizado varios métodos analíticos que han permitido determinar la colina, la betaína y sus derivados con distintos grados de complejidad y efectividad. El avance sustancial de la tecnología ha permitido que actualmente se disponga de técnicas analíticas altamente eficaces. Sin embargo, se trata de técnicas complejas con un alto coste económico, factibles para estudios epidemiológicos pero poco accesibles para su uso en el diagnóstico clínico.

Holm y colaboradores desarrollaron un método muy sensible basado en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas un tándem (LC-MS/MS) que permitió la determinación de colina, betaína y DMG simultáneamente en plasma y suero humano. El procesamiento previo de la muestra consistía en una precipitación de proteínas muy sencilla que se llevó a cabo mediante un sistema automatizado seguido de un proceso de *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Este método se calificó como muy apropiado para estudios epidemiológicos en muestras grandes<sup>131</sup>. La determinación de colina, betaína y DMG en las muestras sanguíneas utilizadas para esta tesis doctoral se llevó a cabo mediante este método analítico (*Ver apartado 2.1. Determinaciones bioquímicas, en Material y métodos*).

### *1.3.1. Artefactos de procesamiento*

La inestabilidad de las moléculas relacionadas con el metabolismo monocarbonado puede incrementar la variabilidad pre-analítica, lo que podría dificultar la detección de asociaciones entre los biomarcadores analizados. Por este motivo, la recogida, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento de las muestras son aspectos cruciales para conseguir una correcta determinación e interpretación de la concentración de colina.

Dos de los factores que podrían afectar a la estabilidad de la colina son la temperatura y el tipo de anticoagulante utilizado durante la recogida de la muestra. Un estudio realizado con dos tubos distintos de recogida de sangre, uno con heparina y otro con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), demostró que la concentración de colina en plasma era distinta entre ambos. Manteniendo ambas muestras a temperatura ambiente, determinaron que la concentración de colina de la muestra recogida en el tubo con heparina incrementaba linealmente con el tiempo. En cambio, utilizando el tubo con EDTA solo aumentó durante la primera hora y después se estabilizó. Aunque la heparina y el EDTA son ambos anticoagulantes, tienen mecanismos de acción distintos. La heparina inactiva la trombina y el EDTA es un quelante de calcio que interrumpe la cascada de coagulación. Las fosfolipasas que actúan sobre los ésteres de colina son dependientes de calcio, por este motivo están inhibidas en presencia de EDTA. Cuando la muestra se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la concentración de colina se mantuvo estable durante los posteriores 5 años<sup>150</sup>.

Estos resultados son importantes para optimizar el procesado y el almacenaje de las muestras biológicas en los laboratorios de análisis. Asimismo, hay que tener en cuenta estos factores en la interpretación de biomarcadores utilizados en los estudios epidemiológicos.



## 2. El ciclo de la metionina

### 2.1. El paso de metionina a homocisteína

La metionina y la cisteína son considerados los principales aminoácidos sulfurados que se incorporan a las proteínas. Además, tienen un papel muy importante en el metabolismo celular<sup>151</sup>.

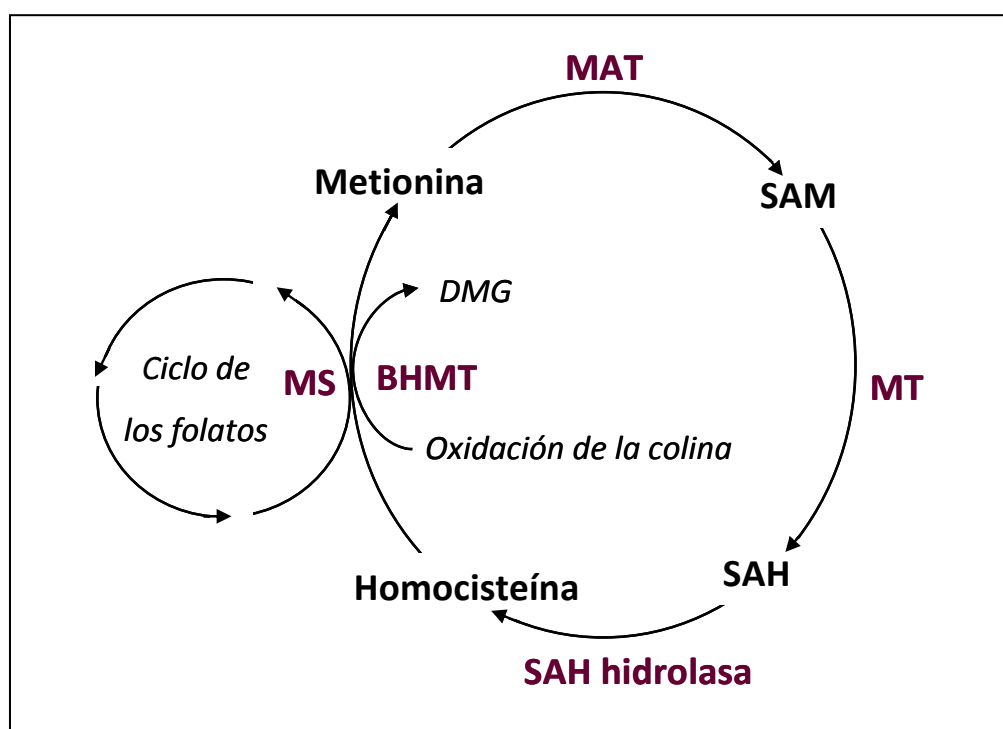
La metionina es un nutriente esencial en tres reacciones del organismo: (1) el reciclaje intracelular de folato, (2) el catabolismo de la colina y la betaína y (3) la vía de transulfuración, para la formación de cistationina, cisteína y glutatión entre otros metabolitos<sup>152</sup>.

En el metabolismo de la metionina se encuentran diversas reacciones de metilación (**Figura 6**). La primera es la activación de la MAT que convierte la metionina en SAM. Ésta dona su grupo metilo a un aceptor para producir S-adenosilhomocisteína (SAH), mediante una metiltransferasa (MT). SAH es hidrolizada a Hcy y adenosina por parte de la SAH hidrolasa. La Hcy es el intermediario esencial del metabolismo de la metionina. Esta secuencia de reacciones se conoce como *transmetilación* y está presente en todas las células del organismo<sup>128</sup>.

Hay varias MT que utilizan SAM como sustrato, pero tres de ellas juegan un papel importante en la regulación del metabolismo monocarbonado y en la generación de Hcy: la guanidinoacetato N-metiltransferasa (GAMT) responsable de la síntesis de creatinina, la glicina N-metiltransferasa (GNMT) que cataliza la metilación de glicina y genera sarcosina, y PEMT, encargada de la síntesis de la fosfatidilcolina<sup>153</sup>. Sin embargo, la ADN(citosina-5-)-metiltransferasa (DNMT1) tiene una función crucial en la estabilidad del ADN ya que es responsable de la metilación de la citosina<sup>154</sup>.

En los humanos, las principales fuentes dietéticas de grupos metilo para llevar a cabo todas las reacciones de metilación son la colina ( $\approx 30$  mmol metilo/día), la metionina ( $\approx 10$  mmol de metilo/día) y el MTHF ( $\approx 5-10$  mmol de metilo/día)<sup>155</sup>.

Figura 6: Metabolismo de la metionina

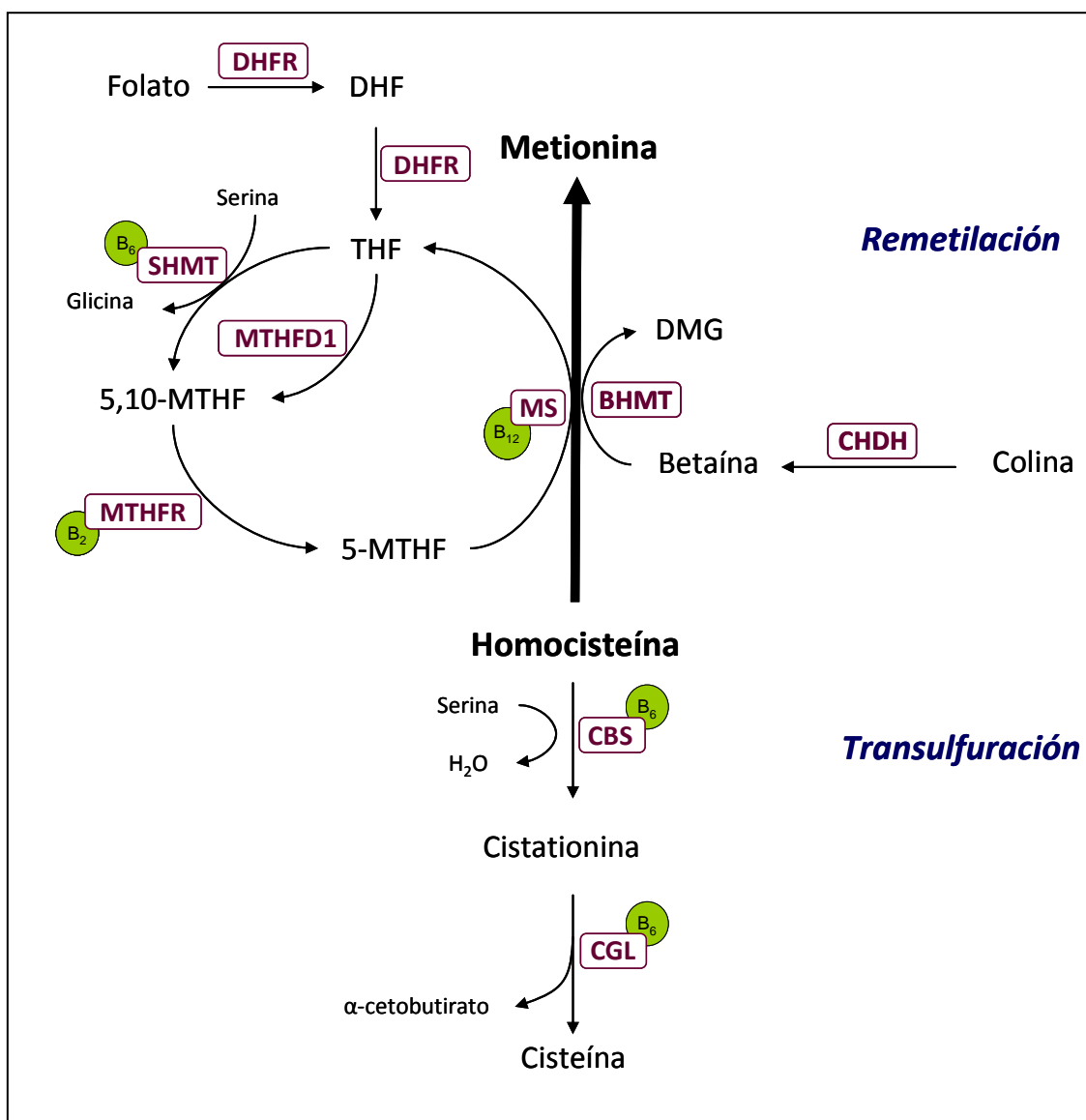


**MAT:** Metionina adenosiltransferasa; **MS:** Metionina Sintasa; **BHMT:** Betaína-homocisteína metiltransferasa; **MT:** Metiltransferasa; **SAH Hidrolasa:** S-adenilhomocisteína hidrolasa; **SAM:** S-adenosilmetionina; **SAH:** S-adenilhomocisteína; **DMG:** Dimetilglicina. Adaptación de Finkelstein JD, 1998<sup>152</sup>

## 2.2. El metabolismo de la homocisteína

La conversión de Hcy a metionina es una reacción esencial para el mantenimiento de la metionina, la eliminación de la Hcy y la producción de SAM. Existen tres enzimas que utilizan la Hcy como sustrato, la actividad relativa de las cuales depende del estado metabólico. Cuando el balance de metionina es positivo, la Hcy se convierte en cisteína de forma irreversible a través de la vía de la *transulfuración*. Cuando el balance es negativo, la Hcy se convierte a metionina, proceso conocido como *remetilación*, a través de dos vías distintas<sup>156</sup>. En la mayoría de tejidos la remetilación de la Hcy es catalizada por la enzima metionina sintasa (MS). En cambio, en el hígado y en el riñón, la enzima encargada de la mayor parte de esta reacción es la BHMT, cuyo dador de grupos metilo es la betaína (**Figura 7**). En adultos jóvenes, se ha descrito que alrededor de un 43% de la Hcy es remetilada y un 57% es metabolizada por la vía de la transulfuración<sup>157</sup>.

Figura 7. Metabolismo de la homocisteína



**DHFR:** Dihidrofolato reductasa; **SHMT:** Serina hidroximetiltransferasa; **MTHFD1:** metilen tetrahydrofolato deshidrogenasa 1; **MTHFR:** Metiltetrahydrofolato reductasa; **MS:** Metionina Sintasa; **CHDH:** Colina deshidrogenasa; **BHMT:** Betaína-homocisteína metiltransferasa; **CBS:** Cistatiónina β-sintasa; **CGL:** Cistatiónina γ-liasa; **DHF:** Dihidrofolato; **THF:** Tetrahydrofolato; **5,10-MTHF:** 5,10-metiltetrahydrofolato; **5-MTHF:** 5-metiltetrahydrofolato; **DMG:** Dimetilglicina. *Adaptación de Carmel R y Jacobsen DW, 2001<sup>158</sup>.*

Debido a la existencia de un mecanismo de salida de la Hcy celular, ésta se puede detectar en el plasma. La hiperhomocisteinemia indica una anomalía en el metabolismo de la Hcy ya sea debido a una alteración en la vía de la transulfuración o bien en la vía de la remetilación. La salida de la Hcy al exterior de la célula soluciona el problema de toxicidad intracelular pero provoca una elevada concentración de Hcy en plasma que a su vez podría alterar la función endotelial<sup>159</sup>.

### 2.2.1. La transulfuración de la homocisteína

La distribución de la vía de transulfuración en los tejidos es limitada, tan solo está presente en hígado, riñón, intestino delgado y páncreas. Los tipos celulares que no disponen de esta reacción requieren una fuente exógena de cisteína<sup>128</sup>.

En esta ruta metabólica se convierte la Hcy a cisteína de forma irreversible a través de dos reacciones consecutivas (**Figura 7**). La primera es la transformación de Hcy y serina a cistationina y agua, paso limitante de la vía de transulfuración<sup>128</sup>, catalizado por la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS), una hemoproteína dependiente de la vitamina B<sub>6</sub>. En la segunda reacción se utiliza la cistationina como sustrato y se produce cisteína y  $\alpha$ -cetobutirato. La enzima responsable es la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL), y también requiere de vitamina B<sub>6</sub> como cofactor<sup>160</sup>.

Se han descrito algunos polimorfismos en el gen de la CBS que podrían afectar a la vía de la transulfuración y a la tHcy. Sebastio y colaboradores identificaron el polimorfismo CBS<sub>c844\_845ins68</sub> en pacientes con homocistinuria<sup>161</sup>. Posteriormente, estudios realizados en individuos con elevado riesgo cardiovascular observaron que aquellos que tenían esta inserción en el gen de la CBS presentaban una tHcy inferior e incrementos menores de Hcy al aplicar una prueba de sobrecarga de metionina, en comparación con los que tenían el genotipo salvaje<sup>162,163</sup>. Esto indicaría que la inserción de 68 pares de bases podría ser un polimorfismo protector, aumentando la actividad de CBS y como consecuencia que la vía de la transulfuración fuera más eficaz<sup>164</sup>.

### 2.2.2. La remetilación de la homocisteína

En la conversión de Hcy a metionina intervienen dos enzimas de forma paralela. Por un lado la enzima MS, que se encuentra en todos los tipos celulares y esta íntimamente relacionada con el ciclo del folato. Por otro lado, la BHMT, limitada básicamente en hígado y riñón y directamente relacionada con la oxidación de la colina.

#### El ciclo del folato y sus polimorfismos

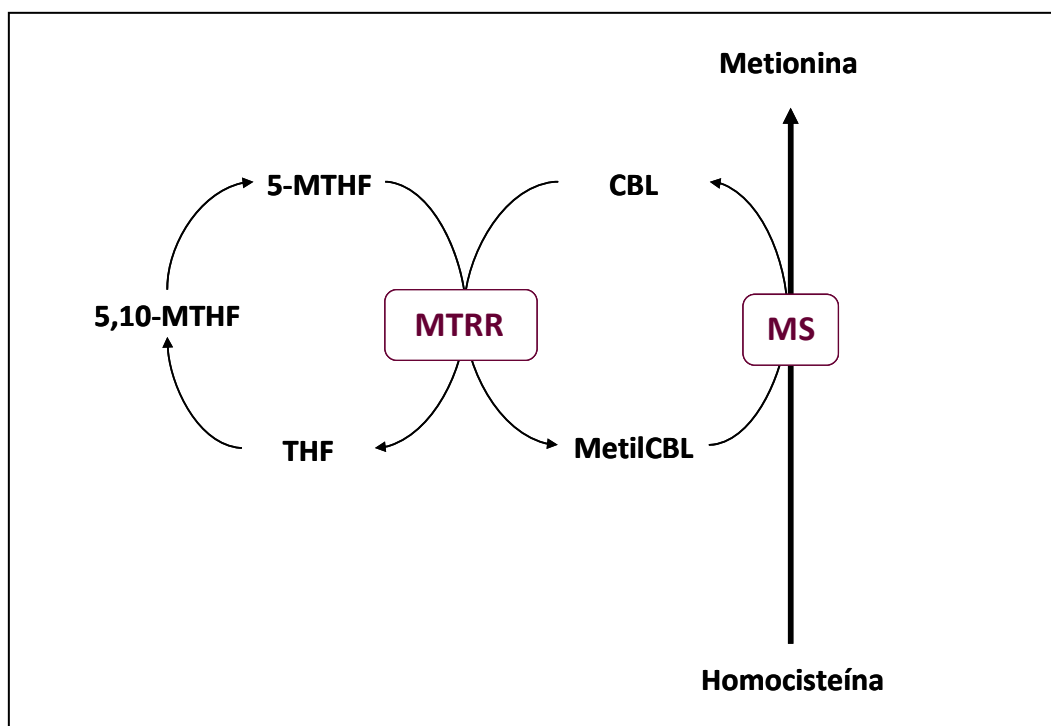
El ciclo del folato está directamente relacionado con la enzima MS en la remetilación de la Hcy. El folato se reduce a dihidrofolato (DHF) y seguidamente a THF gracias a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). A continuación, el THF y la serina se convierten en 5,10-MTHF y glicina, respectivamente, mediante la acción de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT)

cuya coenzima es la piridoxina o vitamina B<sub>6</sub>. Sin embargo, existe una reacción alternativa para su formación a través de la enzima trifuncional metilen tetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1). Por otro lado, el 5,10-MTHF, además de ser imprescindible para la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, es el sustrato de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que, utilizando la riboflavina o vitamina B<sub>2</sub> como cofactor, lo transforma en 5-MTHF irreversiblemente. Este último producto es el responsable de transferir los grupos metilo a la Hcy para que tenga lugar su conversión a metionina. El 5-MTHF se transforma en THF y empieza el ciclo de nuevo (**Figura 7**).

La enzima MS tiene como cofactor la vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina, que tiene un papel esencial como intermediaria en la transferencia del grupo metilo del 5-MTHF a la Hcy. El 5-MTHF cede su grupo metilo a la cobalamina, produciendo THF y metilcobalamina. El THF vuelve a empezar el ciclo del folato y la metilcobalamina cede el grupo metilo que acaba de incorporar a la Hcy, permitiendo su conversión a metionina. La enzima metionina sintasa reductasa (MTRR) es la encargada de la unión del grupo metilo a la cobalamina, de este modo la enzima MS se mantiene en su forma activa. La metilcobalamina, al liberarse del grupo metilo, se convierte de nuevo en cobalamina y vuelve a estar disponible para metilarse<sup>165</sup> (**Figura 8**).

La actividad de MS depende tanto de la disponibilidad de 5-MTHF, como de de la cobalamina. La deficiencia de cualquiera de las dos, ya sea por una ingesta inadecuada<sup>166</sup>, por malabsorción<sup>167</sup> o por baja disponibilidad debido a la presencia de algún polimorfismo, causa una menor la remetilación de la Hcy. La consecuencia principal es el incremento de la tHcy.

Figura 8. La cobalamina como cofactor de la enzima MS



**THF:** Tetrahidrofolato; **5,10-MTHF:** 5,10-metiltetrahidrofolato; **5-MTHF:** 5-metiltetrahidrofolato; **CBL:** Cobalamina; **MS:** Metionina sintasa; **MTRR:** Metionina sintasa reductasa. *Adaptación de Gaughan y colaboradores, 2001*<sup>180</sup>

La remetilación de la Hcy y consecuentemente su concentración plasmática, puede estar influenciada por la presencia de polimorfismos en los genes de las enzimas que intervienen en esta conversión. Se han descrito polimorfismos en la mayoría de enzimas del ciclo de los folatos. Sin embargo, algunas de sus variantes homocigóticas son más prevalentes que otras y no todas tienen un efecto claro sobre la Hcy. En esta tesis doctoral solo se describen aquellos que pueden tener relación con la vía metabólica de la colina. La relación entre colina y folato favorece que la presencia de un polimorfismo en el ciclo del folato repercuta sobre la bioeficacia de la colina.

El polimorfismo más ampliamente estudiado del ciclo del folato afecta a la enzima MTHFR, se define como *MTHFR 677C→T* y es capaz de modificar la bioeficacia de la colina especialmente en presencia de un estado subóptimo en folato<sup>168</sup>. Frosst y colaboradores, lo identificaron en el exón 4 que codifica para el dominio catalítico de esta enzima<sup>169</sup>. Su presencia causa un cambio de alanina por valina en el codón 222 (A222V). El resultado es una enzima termolábil con un 70% menos de actividad en homocigóticos<sup>169</sup>, debido a la disociación de su componente prostético FAD<sup>170</sup>. Esto provoca la reducción de la disponibilidad de 5-MTHF para la enzima MS

en situaciones de estado subóptimo de folatos<sup>171</sup>. La frecuencia de la variante homocigótica varía entre regiones y grupos étnicos, siendo más prevalente en caucásicos. En la población española, diferentes estudios han indicado que la frecuencia de homocigotos para este polimorfismo se sitúa entre el 12%<sup>172</sup> y 17 %<sup>173</sup>. La consecuencia principal de su presencia es el aumento de tHcy<sup>174,175</sup>. Diversos estudios han relacionado este polimorfismo con patologías derivadas de una elevada tHcy<sup>176</sup>. Asimismo, se ha observado una concentración de betaína plasmática un 10% inferior en los individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT<sup>164</sup>. La vía metabólica de la colina podría adquirir importancia ante una elevada tHcy derivada de la presencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en homocigosis.

La presencia de polimorfismos vinculados a la cobalamina también es capaz de alterar la conversión de la Hcy. Se han descrito polimorfismos tanto en el gen *MTR* que codifica para la enzima MS, como en el gen de la enzima MTRR. El polimorfismo más estudiado de la enzima MTRR es el *MTRR* 66A→G, que resulta en la sustitución de una isoleucina por una metionina en el codón 22 (I22M)<sup>177</sup>. Este cambio se localiza en el dominio de unión a FMN<sup>178</sup>, sugiriendo que podría afectar a dicha interacción, aunque no causa una pérdida severa de la función enzimática<sup>177</sup>. En distintas poblaciones americanas y europeas se ha encontrado una frecuencia del genotipo GG de entre 17.5% y 35%<sup>177,179-183</sup>. Hay trabajos que han relacionado el genotipo salvaje con un riesgo más elevado de hiperhomocisteinemia comparado con los otros genotipos<sup>180</sup>. En un estudio longitudinal del embarazo realizado en una población española se observó que la tHcy al inicio de la gestación es mayor en las mujeres con el genotipo *MTRR* 66GG que en el resto<sup>173</sup>. No obstante, en otras poblaciones no se ha encontrado asociación alguna entre el polimorfismo *MTRR* 66A→G y la tHcy<sup>173,177,182,184</sup>. El hecho de que la variante homocigótica del polimorfismo *MTRR* 66A→G, al igual que la del polimorfismo *MTHFR* 677C→T, pueda incrementar la tHcy, podría repercutir sobre la vía metabólica de la colina. Ante esta situación la contribución de la colina a la remetilación de la Hcy para reducir su concentración sería más importante.

#### La vía de la colina. La enzima BHMT y su polimorfismo.

La utilización de la betaína como dador de grupos metilo por parte de la enzima BHMT es el punto de conexión entre la oxidación de la colina y la remetilación de la Hcy. Cuando la betaína cede un grupo metilo a la Hcy se produce DMG y metionina, respectivamente (**Figura 7**).

El descubrimiento de la enzima BHMT tuvo lugar a principios de los años sesenta<sup>63</sup> pero no fue hasta 1996 que Timothy A Garrow clonó por primera vez esta proteína humana<sup>62</sup>. Se trata de

una enzima citoplasmática dependiente de zinc cuya estructura es un homotetrámero donde cada unidad monomérica tiene un peso molecular de 45 kDa<sup>185</sup>. Consta de 406 aminoácidos con un dominio catalítico que contiene tres cisteínas esenciales para la unión al ión de Zn<sup>+2</sup><sup>186</sup>. La oligomerización de esta proteína es necesaria para su actividad metiltransferasa<sup>187</sup>.

El gen de la enzima BHMT contiene 8 exones<sup>188</sup> y en los humanos se localiza en el cromosoma 5<sup>189</sup>. Existe un transcrito llamado BHMT2 que comparte con BHMT el 73% de la secuencia de aminoácidos. La diferencia principal entre ellos es la ausencia de 34 aminoácidos en la parte C-terminal de la proteína BHMT2<sup>190</sup>. Ésta se degrada rápidamente después de su expresión, posiblemente por un error en el plegamiento. Es por esta razón que se conoce muy poco sobre su funcionalidad. De todos modos, se ha demostrado que las dos formas pueden interactuar a nivel celular aunque se desconoce si esto tiene una implicación funcional *in vivo*<sup>191</sup>.

Estudios de actividad enzimática y expresión génica indican que el hígado y el riñón son los principales órganos donde se localiza de la enzima BHMT. En el hígado, esta enzima representa entre un 0.6 y 1.6% del total de la proteína<sup>62</sup>, motivo por el que se propuso el hígado como principal órgano regulador de la concentración de Hcy<sup>192</sup>. En contraposición, existen tipos celulares como los fibroblastos de la piel o los linfocitos de la sangre periférica en los que no se ha encontrado expresión de esta enzima<sup>193</sup>.

Experimentos *in vitro* con células de hígado de rata indican que tanto la enzima MS como la BHMT contribuyen equitativamente a la remetilación de la Hcy<sup>194</sup>. Sin embargo, estudios *in vivo* demuestran que la actividad de estas enzimas depende del estado nutricional y hormonal del organismo<sup>195</sup>.

La actividad de la enzima BHMT puede verse modificada por varios factores. Allen y colaboradores demostraron que una baja concentración de folato o de vitamina B<sub>12</sub> causa una disminución de la concentración de betaína en el hígado ya que bajo estas condiciones se incrementa la actividad de la enzima BHMT. En cambio, alteraciones hepáticas o renales causan un aumento de la concentración de betaína, debido a que la enzima BHMT no puede funcionar correctamente<sup>130</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la DMG, producto de la remetilación de Hcy<sup>62,130</sup>, y el SAM<sup>196</sup>, son inhibidores de la enzima BHMT, aunque se desconoce si tiene alguna función fisiológica. La consecuencia principal de la inhibición de la actividad BHMT es la hiperhomocisteinemia<sup>197</sup>.



Muy recientemente se ha creado por primera vez un modelo animal *knock out* para el gen BHMT. La delección de este gen produjo la pérdida total de la actividad BHMT en el hígado. Los animales BHMT<sup>-/-</sup> presentaron una concentración muy elevada de betaína y Hcy en varios tejidos comparado con los animales BHMT<sup>+/+</sup>. Ni la vía de transulfuración o la de remetilación mediante la enzima MS fueron capaces de eliminar el exceso de Hcy acumulado, indicando que la enzima BHMT tiene un papel crucial en la homeostasis de la Hcy. Además, los animales BHMT<sup>-/-</sup> presentaron una concentración de DMG inferior mientras que la concentración de metionina no se vio afectada. Probablemente, las reservas y la ingesta de este aminoácido fueron lo suficientemente importantes como para que su concentración no se viese alterada en la variante BHMT<sup>-/-</sup>. Sorprendentemente, esta delección no resultó en una acumulación de colina. En contra de lo esperado, se observó un incremento de la expresión y actividad de la enzima CHDH mediado por un mecanismo regulador actualmente desconocido<sup>198</sup>.

La suplementación o restricción del aporte de metionina, colina o betaína, es decir la disponibilidad de dadores de grupos metilo, puede incrementar o reducir respectivamente la actividad de BHMT<sup>188,195,199</sup>. En un modelo animal se ha demostrado que la ingesta de ácido fólico y de proteína durante la gestación podría influir en la expresión de las enzimas BHMT, CBS y PEMT en sus crías. Una dieta materna con una ingesta normal de proteína suplementada con 2 mg de ácido fólico por cada quilo de peso del animal resultó en aproximadamente un 50% de reducción de los niveles de mRNA de BHMT en la descendencia<sup>200</sup>.

Desde principios de los años sesenta se conoce el efecto que tiene el etanol sobre el metabolismo del folato<sup>201</sup>. La ingesta de etanol es capaz de secuestrar el folato en los hepatocitos impidiendo su utilización en el metabolismo monocarbonado<sup>202</sup>. Barak y colaboradores demostraron que la ingesta crónica de etanol en ratas producía un incremento de la actividad enzimática de BHMT y una disminución de la betaína. Esta adaptación metabólica permitió mantener las concentraciones de SAM sugiriendo que el etanol es capaz de dañar la producción de metionina pero promueve la actividad BHMT para compensarlo<sup>203</sup>.

El promotor del gen de la BHMT tiene elementos reguladores que son activados por varias hormonas. Por un lado, se ha descrito una disminución de la expresión de BHMT debido a los corticoesteroides<sup>204</sup> y a la insulina<sup>205</sup>. Y por otro lado, se ha asociado un aumento de dicha expresión con la presencia de hidrocortisona, cortisol<sup>188</sup> y estrógeno<sup>77</sup>.

La presencia de polimorfismos o mutaciones en la secuencia del gen BHMT podría causar una alteración en su funcionamiento y originar un incremento de la tHcy. De hecho, la sustitución de tres cisteínas altamente conservadas, por alaninas o serinas, en el dominio de unión a Hcy, resultó en una pérdida total de su actividad enzimática<sup>206</sup>.

Park y Garrow describieron en una población holandesa un polimorfismo en el exón 6 del gen de BHMT, conocido como *BHMT* 742 G→A, o también llamado *BHMT* 716 G→A. La diferencia en la numeración de los nucleótidos es debida a la contabilización o no de la secuencia inicial que no se traduce en la parte 5'. Este cambio provoca que se traduzca una arginina en lugar de una glutamina en la posición 239 de la secuencia de aminoácidos (R239Q)<sup>188</sup>.

La frecuencia de este polimorfismo en homocigosis se ha descrito en diversas poblaciones: en una población china fue del 7.5%<sup>207</sup>, en poblaciones americanas, entre un 8 y un 8.9%<sup>208,209</sup>, en poblaciones europeas, entre un 8.6 y un 11%<sup>164,210,211</sup> y en una población canadiense, entre 12 y 17 %<sup>212</sup>.

Los estudios epidemiológicos sugieren que el polimorfismo *BHMT* 742 G→A podría estar relacionado con la presencia de varias enfermedades. Se ha asociado con un incremento del riesgo de sufrir espina bífida<sup>212</sup>, desprendimiento previo de placenta<sup>209</sup>, cáncer colorrectal<sup>213</sup> y fisura labiopalatina no sindrómica<sup>207</sup>. No obstante, no se ha encontrado asociación con enfermedades cardiovasculares<sup>210</sup>.

Tampoco se han observado alteraciones destacables en el metabolismo monocarbonado como asociadas al polimorfismo *BHMT* 742 G→A. Se ha investigado el efecto del genotipo homocigoto en distintas poblaciones europeas y americanas, pero no se ha encontrado ninguna asociación con la tHcy<sup>164,208,210,212,214</sup>. El único efecto observado ha sido una disminución de DMG, sugiriendo que podría tener algún efecto sobre la conversión de la Hcy a metionina<sup>164</sup>.

Estudios *in vitro* con *E. coli* han demostrado que la presencia de este polimorfismo no hace variar la termoestabilidad de la proteína ni su unión a la betaína<sup>208</sup>. La comparación de la secuencia de aminoácidos de distintas especies muestra que en la posición 239 se puede encontrar indistintamente una arginina o una glutamina. Esto sugiere que el polimorfismo R239Q puede que no tenga un impacto importante en el plegamiento de la proteína y consecuentemente en su funcionalidad<sup>210</sup>.

De todas formas, es probable que el óptimo estado en colina y betaína de las poblaciones estudiadas enmascaren un posible efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A sobre la remetilación de la Hcy<sup>210</sup>. Sería necesario investigar la presencia de este polimorfismo en una situación en la que la concentración de colina o betaína fuese crítica. Por otro lado, es posible que el efecto de este polimorfismo tan solo se manifieste cuando la enzima BHMT tenga un papel crucial en la regulación de la Hcy.

### **2.3. La relación de la colina y la betaína con la homocisteína en función del estado en folato**

La interacción entre el folato y la vía metabólica de la colina se conoce desde hace más de 50 años en modelos animales de hígado graso. Su interrelación se encuentra en el metabolismo monocarbonado en el cual ambos nutrientes están involucrados. En hígado y riñón, tanto el folato como la betaína, principal metabolito de la oxidación de la colina, actúan como dadores de grupos metilo en la conversión de Hcy a metionina<sup>215</sup>.

Un incremento de la ingesta de colina o de betaína, ya sea en la dieta o como suplemento oral, conlleva una concentración plasmática de betaína más elevada y como consecuencia una reducción de la Hcy tanto en ayunas<sup>38</sup> como después de una sobrecarga de metionina<sup>38,123,216</sup>.

Holm y colaboradores definieron a la betaína como factor que coopera con el folato para regular la tHcy. Llevaron a cabo un estudio con 500 voluntarios sanos a los que se les extrajo una muestra sanguínea antes y después de administrarles una sobrecarga oral de metionina. La betaína, mediante la enzima BHMT, fue capaz de atenuar el incremento de tHcy durante el exceso de metionina, y en los sujetos con un estado en folato deficitario, se observó una asociación inversa especialmente pronunciada entre la betaína y la tHcy<sup>137,217</sup>.

Estos resultados fueron concordantes con trabajos realizados con otras poblaciones sanas<sup>132</sup> y poblaciones con alteraciones lipídicas<sup>218</sup>. Melse-Boonstra y colaboradores describieron también una asociación inversa entre la betaína y la tHcy, con una población sana de 308 hombres y mujeres. Les realizaron una intervención de 12 semanas administrando suplementos con distintas dosis de ácido fólico: 50, 100, 200, 400, 600 y 800 µg/día. Observaron un incremento de la betaína plasmática dependiente de la dosis de ácido fólico. Dosis de hasta 200 µg/día se acompañaron de un incremento de aproximadamente un 8% de betaína plasmática mientras que dosis de 400, 600 o 800 µg/día se asociaron con un aumento

de betaína de en torno a un 15%. Estas observaciones indican que en una población sana, al aumentar la concentración de folato del organismo, la remetilación de la Hcy tiene lugar principalmente a través de la enzima MS y como consecuencia disminuye la utilización de la betaína por parte de BHMT<sup>132</sup>. Esta tendencia se observó también en una población anciana, suplementada con 400 µg/día de ácido fólico y 1000 µg/día de vitamina B<sub>12</sub> durante 24 semanas. Como resultado, los participantes presentaron una disminución de tHcy y un incremento de betaína. Además, una de sus conclusiones fue que los individuos en el tercil superior de betaína experimentaron una mejoría en su memoria debido a una mayor síntesis de acetilcolina<sup>219</sup>.

Recientemente, se ha observado de nuevo la interacción de la colina y la betaína con el estado en folato sobre la tHcy en una población de 2.732 hombres y mujeres de la cohorte *Framingham Offspring Study*, examinada entre los años 1995 y 1998. En el transcurso de esta evaluación se promulgó, en EEUU, la ley que obliga a la fortificación con ácido fólico, de modo que el estudio incluyó los periodos previos y posteriores a esta fortificación. Los autores encontraron una asociación inversa entre la ingesta de colina y betaína y la concentración de Hcy, tanto en ayunas como después de la sobrecarga con metionina, durante el periodo previo a la fortificación. Dicha asociación fue más pronunciada entre los participantes con menores concentraciones de folato o vitamina B<sub>12</sub>, coincidiendo con los trabajos previamente publicados<sup>220</sup>. En contraposición, esta asociación desapareció durante el periodo posterior a la fortificación con ácido fólico, sugiriendo que una elevada concentración de folato plasmático es capaz de atenuar la relación entre la betaína y la tHcy<sup>216</sup>. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, la interrelación existente entre el estado en folato y en betaína como determinantes de la tHcy.

Por otro lado, la biosíntesis hepática de fosfatidilcolina a través de la vía PEMT utiliza grupos metilo<sup>153</sup>. El 5-MTHF es la fuente principal de grupos metilo de la enzima PEMT, por este motivo el ciclo del folatos esta involucrado con la síntesis endógena de la colina<sup>221</sup>. Además, uno de los productos indirectos de esta reacción es la Hcy.

Las evidencias actuales sugieren que el estado en folato del organismo podría alterar tanto la relación betaína-Hcy como la relación colina-Hcy<sup>208,209</sup>.

### 3. La colina y la homocisteína durante la gestación

El embarazo es un periodo de grandes cambios en la fisiología de la mujer, durante el cual es crucial disponer de un correcto estado en micronutrientes para asegurar el desarrollo óptimo del feto<sup>222</sup>. Una de las adaptaciones cardiovasculares que tiene lugar es el incremento del volumen plasmático, uno de los determinantes del flujo sanguíneo uterino. En un embarazo normal, esta adaptación empieza a partir de la semana seis de gestación y continúa hasta el final del embarazo. El aumento del volumen plasmático es proporcional al peso del feto, pudiendo variar entre el 25% y el 80%<sup>223,224</sup>.

El crecimiento del feto depende de la absorción de nutrientes a través de la placenta. La llegada de nutrientes maternos a la placenta está determinada por el metabolismo, la utilización y distribución de los nutrientes almacenados, la capacidad de transporte de proteínas y las adaptaciones cardiovasculares al embarazo<sup>225</sup>.

La interpretación del estado en micronutrientes durante el embarazo es compleja. Se deben tener en cuenta las adaptaciones maternas, placentarias y fetales que tienen lugar debido al propio embarazo<sup>222</sup>. Esto genera una falta de consenso para determinar los valores de referencia de los micronutrientes durante este periodo<sup>226</sup>. La mayoría de micronutrientes son altamente variables entre individuos y dependientes de la edad gestacional en que se haya realizado la determinación bioquímica.

#### 3.1. La colina y la betaína durante la gestación.

Durante el embarazo tiene lugar un incremento de los requerimientos de colina por parte de la madre. Ésta es transportada desde el compartimiento materno al fetal, en contra de gradiente, a través de la placenta<sup>227</sup>.

Mientras que otros nutrientes relacionados con el metabolismo monocarbonado, como el folato o la cobalamina, presentan una reducción de su concentración materna a medida que avanza el embarazo<sup>228,229</sup>, en el caso de la colina se observa un incremento progresivo de su concentración plasmática<sup>77</sup>. En una muestra de gestantes a término se observó que la colina plasmática era un 45% superior en comparación con un grupo de mujeres no embarazadas<sup>214</sup>. Posiblemente se trate de una adaptación que permita el mantenimiento de la colina materna y su transporte hacia el feto.

Un incremento de la ingesta de colina podría no ser suficiente para compensar esta demanda extra de colina. Muy recientemente se ha realizado un estudio de intervención aleatorizado con gestantes de tercer trimestre para determinar si la colina de la dieta puede modular los biomarcadores maternos y fetales del metabolismo monocarbonado. Se estudió un grupo de 21 mujeres no embarazadas y otro de 27 embarazadas de 27 semanas de gestación (SG). A las participantes de ambos grupos se les administró una dieta con 480 mg/día o 930 mg/día de colina (procedente de alimentos y suplementos) durante 12 semanas. Las gestantes tratadas con 930 mg/día de colina incrementaron su uso como dador de grupos metilo tanto en el compartimiento materno como en el fetal. Se concluyó que una ingesta de 450 mg de colina al día (establecida como IA durante la gestación) puede ser insuficiente para cubrir las necesidades de este nutriente durante el tercer trimestre de embarazo<sup>230</sup>.

Por otro lado, la concentración plasmática de colina libre<sup>214,231</sup> y también la unida a fosfolípidos<sup>101</sup> es superior en el feto que en la madre. Mientras que algunos autores han observado una buena correlación entre la colina plasmática materna y la fetal ( $r=0.35$ ;  $p<0.05$ )<sup>214</sup> otros han encontrado una correlación no significativa entre la colina de ambos compartimentos ( $r=0.06$ ;  $p>0.05$ )<sup>231</sup> o ( $r=0.33$ ;  $p>0.05$ )<sup>232</sup>. Esta falta de consistencia en los resultados de la correlación materno-fetal de la colina podría explicarse en parte por el estado en folato de la madre durante la gestación, un factor que no se ha tenido en cuenta hasta la actualidad al analizar esta relación.

Durante el periodo perinatal es crucial proporcionar la cantidad adecuada de colina al feto, especialmente para el cierre del tubo neural y el correcto desarrollo del cerebro y la médula espinal<sup>233</sup>. La relación entre el ácido fólico y el riesgo de sufrir un DTN está bien establecida. La ingesta de suplementos con ácido fólico durante el embarazo tiene un efecto protector sobre el riesgo de sufrir cualquier tipo de fisura orofacial<sup>234</sup>. Actualmente, más de una década después de la implantación de la fortificación obligatoria de los cereales con ácido fólico en Estados Unidos<sup>235</sup>, es posible que la etiología de los DTN que se observan sea distinta. Por este motivo, las investigaciones en este ámbito están dirigidas a encontrar otros agentes causantes. La colina está adquiriendo importancia en este campo, ya que se trata de un importante dador de grupos metilo del metabolismo monocarbonado.

Shaw y colaboradores realizaron un estudio de casos y controles en una población en la que incluyeron mujeres con embarazos afectados por DTN y mujeres control seleccionadas al azar. Sus resultados evidenciaron que una elevada ingesta de colina o de betaína periconcepcional

se asociaba con una reducción del riesgo de sufrir un embarazo afectado por DTN. Al ajustar esta ingesta por factores que podrían alterar la relación no alteró el resultado para la colina, y tan solo atenuó el efecto en el caso de la betaína. La disminución más considerable del riesgo se observó en mujeres que tenían simultáneamente una dieta rica en colina, betaína y metionina<sup>88,89</sup>. Algunos polimorfismos de genes involucrados en el metabolismo monocarbonado, especialmente en la enzima MTHFR, también se han relacionado con el riesgo de sufrir DTN<sup>236</sup>. Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio cuyo objetivo fue evaluar la asociación entre varios polimorfismos pertenecientes a la vía metabólica de la colina y el riesgo de sufrir hendiduras orofaciales. El polimorfismo *BHMT* 742 G→A en homocigosis se asoció con una reducción del riesgo del 80% de sufrir esta enfermedad congénita. Los portadores del alelo mutado del polimorfismo rs7639752 del gen *Pcyt1* (CTP: fosfocolina citidil transferasa 1), que está involucrado en la síntesis de fosfatidilcolina, presentaron un aumento del riesgo del 89% de sufrir hendiduras orofaciales. Resultados que permitieron a los autores concluir que el metabolismo de la colina desempeña un papel importante en la etiología de estas enfermedades congénitas<sup>237</sup>.

Por otro lado, resultados obtenidos en modelos animales sugieren que un elevado estado en colina materna se relaciona con mejora cognitiva de la descendencia<sup>92,238,239</sup>. Sin embargo, no se ha conseguido evidenciar esta relación en humanos. Un estudio realizado con 404 parejas de madres e hijos en Birmingham (Alabama) no halló asociación entre la colina materna de diferentes momentos de la gestación o cordón umbilical y el coeficiente intelectual de sus hijos a los 5 años<sup>240</sup>. Villamor y colaboradores tampoco encontraron relación entre la ingesta de colina de 1210 gestantes (en el primer y segundo trimestre) y las capacidades cognitivas de sus hijos a los 3 años<sup>241</sup>. La mejora cognitiva de la descendencia tampoco se ha asociado con la suplementación prenatal de 5-MTHFR<sup>242</sup>.

Después del nacimiento, la colina se transfiere desde la circulación materna hacia las células del epitelio mamario, en contra de gradiente<sup>243,244</sup>. Es importante mantener un estado óptimo en colina después del parto para garantizar un aporte adecuado de colina durante la lactancia materna.

La fuerte correlación positiva que se observó entre la colina, la betaína y la DMG en el trabajo de Molloy y colaboradores sugiere que la oxidación de la colina es esencial durante la gestación, como fuente de grupos metilo<sup>231</sup>.

La concentración de betaína también sufre cambios a lo largo del embarazo. En un estudio longitudinal en el que se determinó la betaína plasmática en siete momentos distintos del embarazo, se describió una reducción progresiva de su concentración<sup>77</sup>. Friesen y colaboradores observaron que un grupo de 46 gestantes de 37-41 SG presentaba una betaína plasmática un 63% inferior respecto a un grupo de 19 mujeres no embarazadas<sup>214</sup>. Al igual que la colina, la concentración de betaína también es más elevada en el plasma fetal que en el materno.

Se ha descrito una moderada correlación entre la betaína materna y la fetal (entre 0.40 y 0.46) y una elevada correlación entre la DMG materna y la fetal (entre 0.58 y 0.73)<sup>214,231</sup>. Esto evidencia una baja contribución de la oxidación de la colina a la remetilación de la Hcy en la circulación fetal, sugiriendo a su vez una baja actividad de BHMT. Consecuentemente, la colina, la betaína y la DMG presentes en plasma fetal serían el resultado de un transporte a través de la placenta.

Un estudio reciente que ha comprobado la presencia de varias enzimas involucradas en el ciclo de la metionina en placentas humanas apoya esta hipótesis. Han observado una coexpresión de la enzima MS y de MTHFR en la placenta. Esto demuestra que la remetilación de la Hcy en este tejido tiene lugar predominantemente a través de la enzima MS, íntimamente relacionada con el ciclo de los folatos. En contraposición, la expresión de CBS fue extremadamente baja y la de BHMT fue indetectable<sup>245</sup>. Estos resultados sugieren que la actividad de la vía metabólica de la colina es baja o inexistente en la placenta.

### **3.2. La homocisteína durante la gestación.**

Una elevada tHcy se ha relacionado con un incremento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares<sup>246</sup> y con complicaciones del embarazo como preeclampsia<sup>247,248</sup>, defectos congénitos<sup>220,249</sup>, bajo peso al nacer<sup>250</sup>, crecimiento intrauterino retardado (CIR)<sup>251-253</sup> y prematuridad idiopática<sup>254</sup>.

Al igual que otros metabolitos relacionados con el metabolismo monocarbonado, el estado en Hcy varía a lo largo de la gestación. Un estudio longitudinal durante el embarazo, en el que se obtuvieron muestras sanguíneas tanto preconcepcionales como durante la gestación, permitió describir cuáles son las variaciones de la tHcy que ocurren durante este periodo. Se observó que desde el inicio hasta mitad del embarazo tiene lugar un descenso fisiológico de la tHcy,



independientemente de la suplementación con ácido fólico y de la hemodilución<sup>255</sup>. Su determinación en el momento del parto permitió observar que la tHcy se recupera durante la parte final de la gestación, llegando a la concentración que las mismas mujeres presentaban durante la preconcepción<sup>250</sup>.

Por otro lado, se ha comprobado en mujeres embarazadas que la concentración de folato está inversamente relacionada con la tHcy<sup>228,256</sup>. La ingesta diaria de folato puede ser crucial durante el embarazo. Es posible que durante este periodo se dé una reducción del estado en folato hasta el punto que algunas mujeres sufren un deficiencia de este nutriente<sup>257</sup>. La disponibilidad de folato es decisiva para el correcto desarrollo del tubo neural. Por este motivo, en los EEUU es obligatoria la fortificación de los cereales con ácido fólico desde 1998<sup>235</sup>.

El Ministerio de Sanidad español recomienda la suplementación con 400 µg de ácido fólico al día a todas las mujeres que estén planificando un embarazo<sup>258</sup>. Una vez embarazadas, la recomendación del uso de este suplemento se mantiene hasta las 12 SG<sup>259</sup>.

Sin embargo, se ha observado que la suplementación con ácido fólico hasta el final de la gestación mejora el estado en folato y consecuentemente atenúa el ascenso de la tHcy durante el tercer trimestre<sup>256</sup>. Sería interesante poder esclarecer si realmente es necesario mantener esta suplementación para reducir la tHcy durante la parte final de la gestación o si bien el aumento de tHcy que tiene lugar durante este periodo se trata de una respuesta fisiológica del propio embarazo relacionada con otros procesos, como podría ser la síntesis endógena de colina.

### El peso al nacer

El bajo peso al nacer para su edad gestacional se ha asociado con una pobre función cognitiva<sup>260</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>261</sup>, hipertensión<sup>262</sup> y diabetes tipo 2<sup>263</sup> en el adulto.

Cuando el bajo peso al nacer tiene implicaciones clínicas más importantes para el desarrollo del recién nacido puede que se trate de un crecimiento intrauterino retardado (CIR). El CIR, que generalmente se define únicamente como: peso al nacer por debajo del percentil 10 según su género y edad gestacional<sup>264</sup>) es una patología que en la mayoría de los casos implica una alteración en el flujo de las arterias placentarias, de modo que el feto no recibe el aporte

nutricional adecuado. El CIR es un problema de salud pública global<sup>265</sup> ya que se asocia con un riesgo más elevado de morbilidad y mortalidad durante la infancia y en la vida adulta<sup>266</sup>. Existen varios factores que pueden incrementar el riesgo de tener un hijo con CIR, uno de ellos es la elevada tHcy durante el primer trimestre. Una tHcy  $\geq 7.2 \mu\text{mol/L}$  en gestantes de menos de 12 SG se ha asociado con un riesgo 12 veces superior de tener un hijo con CIR<sup>267</sup>.

De todos modos, es necesario conocer los factores que pueden reducir el peso al nacer sin que implícitamente signifique la presencia de un CIR. Se han realizado varios estudios explorando la posible asociación entre la tHcy materna durante la gestación y el peso al nacer<sup>248-250</sup>. Un estudio prospectivo español que incluyó 93 mujeres con la intención de quedarse embarazadas, investigó la relación entre la tHcy materna durante la preconcepción y el peso de sus hijos al nacer. Concluyeron que las gestantes con una tHcy  $>9.12 \mu\text{mol/L}$  en el periodo preconcepcional presentaban un incremento del riesgo del 70% de tener un hijo en el tercil bajo de peso al nacer ( $<3120 \text{ g}$ )<sup>250</sup>. Por otro lado, un estudio realizado con 2016 gestantes canadienses exploró la asociación entre la tHcy materna analizada cada 2 semanas (desde la 4 hasta las 20 SG) y el bajo peso al nacer (inferior al percentil 10 para su edad gestacional). El percentil 90 de tHcy a las 4-5 SG fue de  $7.05 \mu\text{mol/L}$  mientras que a las 18-20 SG fue de  $5.71 \mu\text{mol/L}$ , pero en ningún caso se asoció con el riesgo de tener un hijo con un bajo peso al nacer<sup>248</sup>.

Las conclusiones discordantes de ambos estudios pueden ser debidas a los diferentes diseños, los factores confusores utilizados en el ajuste, el tamaño de las muestras y el momento de la gestación en el que se determina la tHcy.

A principios de junio de 2012 se realizaron dos búsquedas en la base de datos PUBMED utilizando las siguientes combinaciones de palabras clave: (1) "choline" AND "birthweight" y (2) "betaine AND "birthweight". Actualmente, no existe ningún trabajo que haya investigado de forma longitudinal la asociación del estado en colina o en betaína durante la gestación y el peso al nacer. Sin embargo, se encontró un trabajo publicado en 2007 que, aunque su objetivo principal fue explorar la relación de la tHcy, la cisteína, la colina y la betaína con la preeclampsia, de forma secundaria, investigó la asociación entre estos mismos metabolitos y el peso al nacer<sup>232</sup>. La tHcy resultó predictora del peso al nacer tanto para todo el grupo entero como para los recién nacidos de madres con preeclampsia. Por otro lado, se observó que, de los hijos de madres con preeclampsia, aquellos que se situaron por debajo del percentil 10 según su edad gestacional presentaron una concentración de colina plasmática en el cordón

umbilical superior que los que se situaban por encima de este percentil (43.6  $\mu\text{mol/L}$  vs 29.4  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.006$ ). De todas formas, la determinación bioquímica de los metabolitos maternos se realizó únicamente en el momento del parto, de modo que no se pudo analizar el efecto de la colina o de la betaína sobre el peso al nacer de forma longitudinal.

### **3.3. Contribución de la colina a la regulación de la homocisteína durante la gestación.**

La investigación del papel que tiene la vía metabólica de la colina en la remetilación de la Hcy está adquiriendo importancia para explicar la fluctuación de la tHcy que tiene lugar durante la gestación.

Fue en 2005 cuando Molloy y colaboradores investigaron por primera vez la relación entre la colina y la Hcy durante el embarazo. Realizaron un estudio transversal con 201 gestantes de entre 37 y 41 SG a las cuales se les había recomendado el uso de suplementos con 400  $\mu\text{g/día}$  de ácido fólico. Extrajeron muestras sanguíneas de las madres y de su cordón umbilical justo después del parto. Los resultados del análisis multivariante identificaron a la colina de la madre como un fuerte predictor positivo de la tHcy materna ( $\beta=0.579$ ;  $p<0.0001$ ). Propusieron dos mecanismos para justificar esta asociación. El primero fue la liberación de colina hepática hacia la circulación para mantener su concentración en plasma y transferirla al feto. Una consecuencia de esta movilización sería la disminución de la colina en el hígado que a su vez resultaría en una reducción de la remetilación de la Hcy vía BHMT. El segundo mecanismo propuesto sería que el propio embarazo induciría una síntesis endógena de colina promoviendo una regulación al alza de la vía PEMT estimulada por el estradiol, cuya concentración también aumenta a lo largo del embarazo<sup>79</sup>. Como consecuencia de esta síntesis aumentaría de la concentración de Hcy ya que es un producto indirecto de esta reacción<sup>231</sup>. En este mismo estudio, al investigar los factores predictores de la tHcy fetal encontraron que la colina fetal fue un predictor positivo, aunque no se consiguió llegar a la significación estadística ( $\beta=0.099$ ;  $p=0.065$ ). En cambio, la concentración de colina materna fue un predictor negativo ( $\beta=-0.245$ ;  $p<0.009$ )<sup>231</sup>. De todas formas, se trata de un estudio transversal que permite describir la relación entre la colina y la tHcy materna y fetal tan solo al final de la gestación.

Actualmente, tan solo existen dos trabajos que hayan investigado la contribución que tienen la colina y la betaína al metabolismo de la Hcy, de forma longitudinal a lo largo del embarazo. De estos, solamente uno dispone además de una muestra de sangre de cordón umbilical. Sus

autores coinciden en afirmar que la betaína es un fuerte predictor negativo de la tHcy a medida que avanza la gestación.

Velzing-Aarts y colaboradores realizaron un estudio longitudinal con 50 mujeres embarazadas de Curaçao, una población predominantemente africana aunque con una sustancial frecuencia de caucásicos. La mayoría reportaron un uso irregular de suplementos de ácido fólico. Se obtuvieron muestras sanguíneas en las semanas 9, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 de gestación. Se observó un incremento de la concentración de colina a medida que avanzaba el embarazo y un descenso de la concentración de betaína hasta las 20 SG<sup>77</sup>.

Los mecanismos que propusieron para explicar el aumento gestacional de la colina son los mismos que sugirieron Molloy y colaboradores. Para justificar el descenso de betaína argumentan la posibilidad de un aumento del consumo de betaína debido a una alta actividad BHMT, una transferencia al compartimento fetal a través de la placenta o bien una reducción de la síntesis de colina. De sus resultados destaca la relación inversa encontrada entre la betaína plasmática y la tHcy a medida que avanza el embarazo y la atenuación de la relación entre el folato y la tHcy a medianos de la gestación<sup>77</sup>. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el estado en colina y betaína podrían tener un papel importante en la regulación de la tHcy durante la gestación.

Posteriormente, se llevó a cabo otro estudio longitudinal con 226 gestantes en la República de Seychelles. Su dieta incluía pocos alimentos fortificados con ácido fólico. Se obtuvieron muestras sanguíneas en la primera visita prenatal (a las 13 SG de media), a las 28 SG y en el momento del parto de todas las participantes. Además, se obtuvo también una muestra de sangre de cordón umbilical de 135 gestantes. Las mujeres que declararon ser usuarias de suplementos con ácido fólico no presentaron un mejor estado en folato plasmático, por lo que concluyeron que debía tratarse de un uso muy esporádico<sup>268</sup>. Los autores describieron el mismo comportamiento de la betaína durante la gestación que el descrito anteriormente en la literatura<sup>77</sup>. En cordón umbilical observaron concentraciones de cobalamina, betaína y folato superiores al plasma materno, coincidiendo con trabajos previos<sup>214,231</sup>. Se hace evidente que los requerimientos del feto son primordiales y se preservan aunque el estado materno sea bajo. Estas relaciones justifican la investigación de las correlaciones materno-fetales de los metabolitos de la vía de la colina durante la gestación.

Por otro lado, los autores identificaron un estado deficitario en folato en el 35% de las gestantes en el momento del parto y observaron medias de tHcy más elevadas que las descritas previamente en otros estudios<sup>77,231,250,256</sup>. Justificaron estas diferencias con el bajo estado en folato de la población estudiada. Identificaron al folato como el predictor más fuerte de la tHcy a las 28 SG y en el parto. Sin embargo, consideraron a la betaína como predictor negativo de la tHcy materna cuando la concentración de metionina era baja (<23.8 µmol/L)<sup>268</sup>.

El diseño longitudinal de este estudio hubiera permitido la investigación del papel que juega la colina sobre la regulación de la Hcy. Sin embargo, esta exploración no se pudo realizar ya que no disponían de la concentración de colina plasmática.

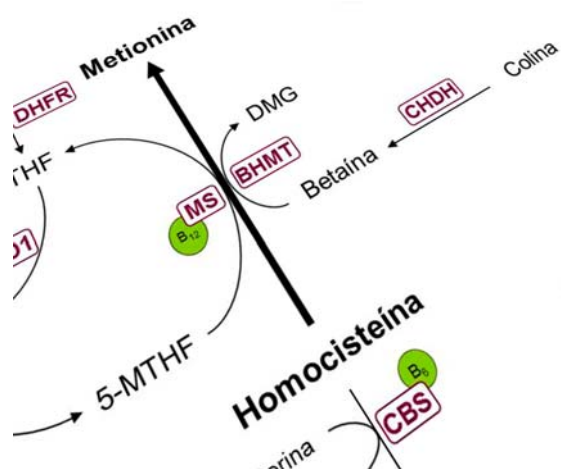
Actualmente, no tenemos evidencias científicas suficientes para describir con precisión cuál es la contribución de la colina y su metabolito, la betaína, a la regulación de la Hcy durante el embarazo. Parece que la relación entre la colina y la Hcy puede ser distinta en función de la situación fisiológica del organismo. La vía de la colina interviene en la remetilación de la Hcy a través de la enzima BHMT. Esto implicaría que la colina y la betaína se relacionasen inversamente con la Hcy. Sin embargo, ante una situación de síntesis endógena de colina, su relación con la Hcy sería positiva. Durante la gestación, tanto la remetilación de la Hcy como la síntesis endógena de colina son necesarias aunque se desconoce cuál de las dos es predominante en las diferentes etapas de la gestación y en el metabolismo fetal. Además, se desconoce también la importancia del estado en folato en la relación entre la colina, la betaína y la Hcy. El estado en folato es variable durante la gestación principalmente debido a dos motivos: el primero es el uso de suplementos con ácido fólico durante el primer trimestre en la mayoría de las gestantes, y el segundo, es su elevada demanda durante la parte final del embarazo debido al propio desarrollo fetal. Posiblemente, los distintos estados en folato a lo largo de la gestación podrían influir en la relación de la colina y la betaína con la Hcy durante la gestación.

En la **Tabla 5** se presentan algunas de las cuestiones que están pendientes de resolver acerca de la relación entre la colina y la Hcy durante la gestación. El diseño longitudinal del estudio “Nutrición y Crecimiento Intrauterino Retardado” (NUTCIR), que recoge muestras sanguíneas en cinco momentos distintos a lo largo de la gestación y una de cordón umbilical (*Ver apartado 1. Estudio NUTCIR, en Material y métodos*) ofrece la posibilidad de investigar el papel que tiene la vía de la colina en la regulación de la Hcy durante el embarazo y en el feto.

**Tabla 5:** Cuestiones pendientes de resolver acerca de la contribución de la vía de la colina a la regulación de la homocisteína durante la gestación.

<i>Conocimientos actuales</i>	<i>Conceptos desconocidos</i>
<p>La colina plasmática aumenta a lo largo del embarazo<sup>77</sup>, siendo un 45% mayor en gestantes de tercer trimestre que en mujeres no embarazadas<sup>214</sup>.</p> <p>La betaína disminuye hasta el segundo trimestre de gestación<sup>268</sup> siendo un 63% inferior en gestantes de tercer trimestre que en mujeres no embarazadas<sup>214</sup>.</p> <p>La DMG disminuye durante la primera parte de la gestación y después se mantiene constante<sup>77</sup>.</p>	<p>No se ha descrito el comportamiento de la colina, la betaína y la DMG simultáneamente y de forma longitudinal durante el embarazo y en el feto, en una muestra grande de gestantes, en un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico.</p> <p>Se desconoce si la fluctuación de la colina, la betaína y la DMG durante la gestación varía en función del estado en folato.</p>
<p>La colina libre<sup>214,231</sup> y unida a fosfolípidos<sup>101</sup>, la betaína y la DMG<sup>214,231</sup> son superiores en el feto que en la madre en el momento del parto.</p> <p>La correlación materno-fetal de la colina fue moderada en un estudio canadiense<sup>214</sup>, mientras que no fue significativa en un estudio irlandés<sup>231</sup>.</p> <p>La correlación materno-fetal de la betaína observada en dos estudios distintos varía entre 0.40 y 0.46, mientras que para la DMG varía entre 0.58 y 0.73<sup>214,231</sup>.</p>	<p>Hay controversia en cuanto a la existencia de una correlación materno-fetal de la colina. La correlación materno-fetal descrita para la DMG es variable entre los estudios realizados.</p> <p>Se desconoce si la colina, la betaína y la DMG fetales tienen un origen fetal o si provienen mayoritariamente de la madre.</p>
<p>Una ingesta elevada de colina y de betaína se asoció con una menor tHcy respecto a una ingesta baja en colina<sup>38</sup>. La suplementación con colina se asoció a una disminución de tHcy<sup>105,109</sup>. Una deficiencia de colina dietética se asoció con un aumento de tHcy respecto a una ingesta adecuada de colina<sup>107</sup>. Este incremento fue superior bajo un estado subóptimo de folato<sup>24</sup>.</p>	<p>Se desconoce la contribución que tiene la colina a la remetilación de la Hcy, durante el embarazo y en el feto.</p> <p>Se desconoce si el estado en folato puede influir en esta relación.</p>

<p>Una elevada ingesta de betaína<sup>123,216</sup> y una suplementación oral con betaína<sup>145,146,148,149</sup> se han relacionado con una disminución de la tHcy. La betaína es un predictor negativo de la tHcy.</p> <p>La asociación inversa entre la betaína y la tHcy es especialmente pronunciada en sujetos con un estado subóptimo de folato<sup>137</sup>.</p>	<p>Se desconoce el papel de la betaína en la regulación de la tHcy a lo largo de la gestación y en el feto.</p> <p>Se desconoce si el estado en folato puede influir en esta relación.</p>
<p>No se ha descrito un efecto de la presencia del polimorfismo <i>BHMT742G</i>→<i>A</i> en homocigosis sobre la tHcy en poblaciones sanas<sup>164</sup>, ni en poblaciones con hiperhomocisteinemia<sup>210</sup>, ni en pacientes con alto riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular<sup>208</sup> ni en un estudio de casos y controles sobre espina bífida<sup>212</sup>.</p> <p>El único efecto descrito de la presencia del polimorfismo <i>BHMT 742G</i>→<i>A</i> en homocigosis sobre la vía metabólica de la colina es una disminución de DMG<sup>164</sup>.</p>	<p>Se desconoce si la presencia del polimorfismo <i>BHMT742G</i>→<i>A</i> en homocigosis podría tener un efecto sobre la vía de la colina y sobre la tHcy durante la gestación y en el feto.</p> <p>Se desconoce si el estado en folato puede interferir en esta relación.</p>
<p>La tHcy elevada durante la preconcepción<sup>250</sup> o bien durante el segundo trimestre de gestación<sup>269</sup> se ha asociado con un incremento del riesgo de tener un hijo con un bajo peso al nacer según su edad gestacional.</p> <p>El único indicio descrito de que el estado en colina podría estar relacionado con el peso al nacer se encontró en un grupo de recién nacidos, situados por debajo del percentil 10 para su edad gestacional, hijos de madres con preeclampsia, que presentaron la colina plasmática en el cordón umbilical superior a los niños que se situaban por encima de este percentil<sup>232</sup>.</p>	<p>No se ha investigado la asociación entre el estado en colina o betaína materna durante el embarazo y el peso al nacer.</p>



---

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---





## **HIPÓTESIS PRINCIPAL**

La colina y su metabolito principal, la betaína, contribuyen a la regulación de la homocisteína durante la gestación y en el feto. El polimorfismo *BHMT* 742G→A tiene un efecto sobre la vía metabólica de la colina y sobre la homocisteína durante el embarazo y en el feto. El estado en colina y en betaína de la gestante influye en el desarrollo fetal.

## **HIPÓTESIS SECUNDARIA**

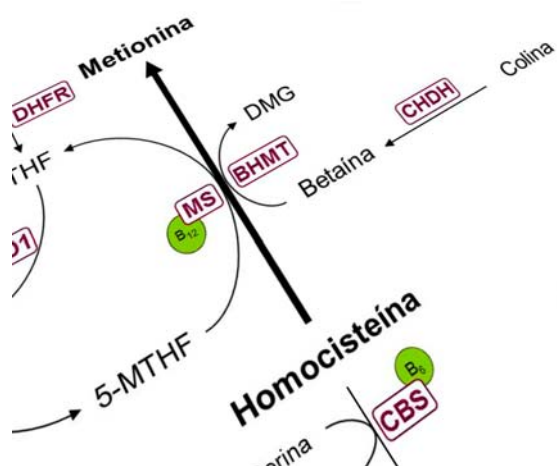
El estado en folato del organismo influye sobre:

- (1) el papel que tiene la colina y la betaína en la regulación de la homocisteína durante la gestación y en el feto.
- (2) la relación del polimorfismo *BHMT* 742G→A con la vía metabólica de la colina y con la homocisteína durante la gestación y en el feto.

## **OBJETIVOS**

- 1.- Describir la fluctuación de la colina, la betaína y la DMG durante la gestación y en cordón umbilical globalmente y en función del estado en folato.
- 2.- Analizar el efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A sobre la vía metabólica de la colina y sobre la homocisteína en diferentes momentos de la gestación y en el cordón.
- 3.- Analizar la relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG globalmente y en función del estado en folato.
- 4.- Analizar el efecto de la colina y la betaína sobre la homocisteína durante la gestación y del cordón globalmente y en función del estado en folato.
- 5.- Analizar la asociación de la colina y la betaína en diferentes momentos del embarazo con el peso al nacer.





# MATERIAL Y MÉTODOS

---



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Estudio NUTCIR

El estudio NUTCIR es un estudio longitudinal del embarazo cuyo objetivo general es evaluar la contribución del estado nutricional materno y la función placentaria al desarrollo intrauterino retardado y otras complicaciones del embarazo. Para esta tesis se utiliza la información obtenida entre la primera visita prenatal y el día del parto. Este estudio se está realizando desde el año 2005 en la *Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública* de la *Universitat Rovira i Virgili*, en colaboración con los servicios de Obstetricia y Ginecología de dos hospitales: *Hospital Universitari Sant Joan de Reus* (HUSJR) y *Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona* (HUJXXIII) y fue aprobado por los Comités de Ética de Investigación Clínica de ambos hospitales. Todas las participantes son informadas personalmente del protocolo del estudio antes de iniciar su participación y firman un consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki<sup>270</sup>. El criterio de inclusión es estar embarazada de menos de 12 SG en el momento de realizar la primera analítica prenatal. Los criterios de exclusión son: embarazo múltiple, cirugía mayor durante los últimos 6 meses, sufrir alguna enfermedad crónica que afecte al estado nutricional de la mujer (enfermedad de Crohn, celiaquía, diabetes, etc.) y hallarse bajo tratamiento farmacológico que interfiera con el metabolismo del folato.

Desde el inicio del estudio hasta el febrero del 2011 se realizaron 1423 primeras visitas prenatales, de las cuales 839 no cumplieron los criterios de inclusión (mayoritariamente por haber cumplido las 12 SG). Se invitó a participar en el estudio a las 584 gestantes elegibles, de las cuales 29 declinaron la invitación y 9 aceptaron aunque posteriormente no se presentaron a la visita prenatal programada. Finalmente, 546 gestantes (93.5 % de la población elegible) iniciaron el estudio.

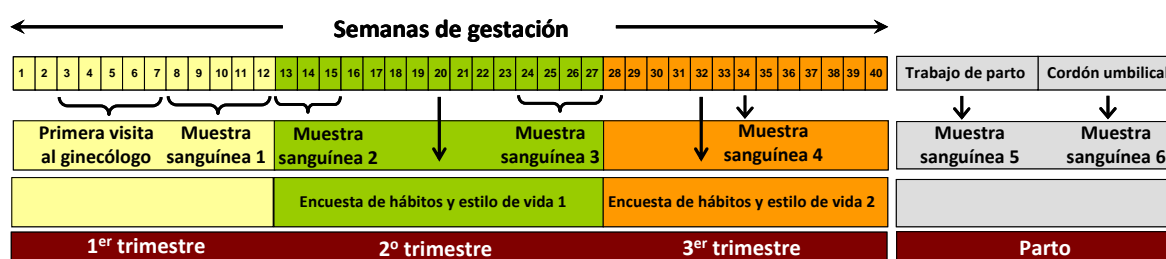
La recomendación actual de las autoridades sanitarias y las sociedades científicas<sup>259</sup> es la de suplementar diariamente con 400 µg de ácido fólico durante el primer trimestre de gestación. Por este motivo los obstetras prescribieron a todas las participantes un suplemento prenatal diario que contenía 400 µg de ácido fólico y 2 µg de cianocobalamina, desde su primera visita prenatal hasta el final del primer trimestre de gestación. Además, para prevenir la aparición de anemia se les prescribieron 40 mg/día de hierro elemental (bebible o en comprimidos) a partir de la semana 12 de gestación hasta finalizar el embarazo. No obstante, en el caso de detectar

anemia en alguna participante se le prescribió un suplemento de hierro de 80 o 120 mg/día, según el criterio del obstetra.

### 1.1. Muestras biológicas

En el estudio NUTCIR se obtuvieron seis muestras sanguíneas. Las cuatro primeras muestras prenatales fueron en ayunas. La primera se extrajo antes de las 12 SG (Muestra 1) y las otras tres coincidieron con las extracciones previstas por el protocolo de control del embarazo normal del *Departament de Salut* de la *Generalitat de Catalunya* aplicado en todos los hospitales de Catalunya<sup>259</sup>. Estas muestras se extrajeron a las 15 SG (Muestra 2), entre las 24-27 SG (Muestra 3), y a las 34 SG (Muestra 4). Finalmente, se obtuvo una muestra materna durante el trabajo de parto (Muestra 5) y una de la vena del cordón umbilical después del nacimiento del bebé y antes de la expulsión de la placenta (Muestra 6) (**Figura 9**).

**Figura 9.** Diseño del estudio NUTCIR.



Las muestras de sangre maternas prenatales se obtuvieron en el mismo hospital donde las mujeres realizaban el seguimiento del embarazo. Se obtuvieron en cada extracción 10 mL de sangre mediante punción venosa antecubital, en uno de EDTA-K<sub>3</sub>. El procesamiento, que tuvo lugar en menos de una hora después de la extracción, y el almacenamiento de las muestras se llevó a cabo en el Biobanco del *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili* (IISPV) y en el laboratorio del área de investigación del HUIJXXIII por un miembro del equipo NUTCIR. Ambas instalaciones dispusieron de un sistema de calidad que permitió registrar la hora de llegada y procesamiento de las muestras sanguíneas.

A partir de enero de 2011, el HUSJR se trasladó a una nueva ubicación, momento en que se instauró un sistema de valijas que permitió la llegada de las muestras desde el nuevo edificio al Biobanco-IISPV, en el menor tiempo posible. Para evitar que pasara más de una hora entre la

extracción y el procesamiento del plasma, la centrifugación del tubo de EDTA-K<sub>3</sub> y la posterior separación del plasma se realizaron en la sala de extracciones.

Las muestras del trabajo de parto y del cordón umbilical se obtuvieron en la sala de partos del hospital correspondiente. De la gestante se obtuvieron 10 mL de sangre y del cordón umbilical, 20 mL; ambas muestras se recogieron en tubo de EDTA-K<sub>3</sub>. Si las extracciones se realizaban fuera del horario del Biobanco-IISPV o del laboratorio de investigación, las muestras se derivaban al laboratorio central del hospital correspondiente, donde disponían de los protocolos necesarios para procesarlas parcialmente y mantenerlas a 4°C. Posteriormente, un miembro del equipo NUTCIR las recogía para completar su procesamiento.

El protocolo para procesar las muestras fue idéntico en ambos hospitales. De todas las muestras se obtuvieron el plasma y los leucocitos que se conservaron a -80°C. Para obtener el plasma, se centrifugó el tubo de EDTA-K<sub>3</sub> durante 15 minutos, a 1500 g y a 4°C. Se obtuvieron cuatro alícuotas de 1 mL de plasma. Al resto de fracción densa de sangre, se le añadió PBS<sup>i</sup> y se agitó por inversión para posteriormente obtener los leucocitos. Esta mezcla se traspasó a un tubo tipo Falcon y se añadieron 30 mL de solución de hemólisis<sup>ii</sup>. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para que los hematíes se hemolizaran. Se centrifugó durante 5 minutos a 2000 g y se descartó el sobrenadante, los leucocitos se mantuvieron en el pélet. Se lavó el pélet con solución de hemólisis y se resuspendió. Al repetirse el mismo proceso con 20 mL de esta solución se consiguieron los leucocitos libres de otras células. Se añadieron 0.9 mL de PBS para conservarlos posteriormente a -80 °C.

Para poder determinar los genotipos de distintos polimorfismos se extrajo y se cuantificó el ADN de los leucocitos. Este proceso constó de cinco fases:

a) Lisis celular: Se añadieron 10 mL de *Autopure Cell Lysis Solution (Qiagen Sciences, Maryland, USA)* a la alícuota de leucocitos para destruir su membrana. Se mantuvo esta mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente durante como mínimo 4 semanas, para conseguir una lisis total de la célula. El tiempo de lisis puede variar en función de la cantidad de leucocitos que se hayan obtenido.

---

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

<sup>ii</sup> 7.007 g de CINH<sub>4</sub> 131mM y 0.071 g de CH<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> 0.9 mM, en un litro de H<sub>2</sub>O



b) Precipitación de proteínas ajenas al ADN: Se añadieron 3,33 mL de *Autopure Protein Precipitation Solution (Quiagen Sciences, Maryland, USA)* y se agitó durante 20 segundos para conseguir una solución homogénea. Se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 2000 g durante 12 minutos a 4°C. El pélet contenía los restos celulares y el sobrenadante, el ADN en suspensión.

c) Precipitación del ADN: Se separó el sobrenadante y se mezcló con 10 mL de isopropanol frío. Se agitó suavemente por inversión hasta observar una masa blanca condensada de ADN. Se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos y a 4°C de manera que el ADN se desplazó al pélet. Después de eliminarse el sobrenadante y secar los restos de líquido, se añadieron 10 mL de etanol frío y se volvió a centrifugar a 2000 g durante 5 minutos y a 4°C. Finalmente, se eliminó definitivamente el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente durante 30-40 minutos.

d) Hidratación de ADN genómico: Se añadieron 1200 µL de *Autopure ADN Hydration Solution (Quiagen Sciences, Maryland, USA)* y se mantuvo la solución durante 3 o 4 días a temperatura ambiente y en agitación.

e) Cuantificación de ADN genómico: La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* a una longitud de onda de 260 nm. Éste cuenta con un software propio que permite calcular la concentración automáticamente. Se utilizaron 2 µL de ADN hidratado por cada una de las muestras analizadas.

## 1.2. Encuestas de hábitos y estilos de vida

Las participantes del estudio realizaron dos encuestas de hábitos y estilo de vida. Un miembro del equipo investigador entrevistó a cada participante a las 20 SG (se registró información desde la preconcepción hasta las 20 SG) y a las 32 SG (se obtuvo información hasta aquel momento del embarazo) (**Figura 9**).

La encuesta de hábitos y estilo de vida tenía cinco bloques de preguntas (*Ver Anexo 1*). En el primer bloque se preguntó detalladamente el uso de suplementos vitamínicos. Para cada uno de ellos (ácido fólico, hierro y complejos multivitamínicos) se registró el nombre comercial, la frecuencia con la que lo tomaron (cada día, la mayoría de los días o algunos días) y los meses exactos del embarazo que lo tomaron. Con toda esta información se calculó la cantidad (en

microgramos) de ácido fólico consumido durante el primer trimestre y entre los meses 4 y 7. Se tuvo en cuenta también el ácido fólico procedente de los complejos multivitamínicos.

Estos datos permitieron identificar a las gestantes que hacían un seguimiento correcto del patrón de suplementación recomendado por los obstetras y las que no. Al grupo de gestantes que consumieron menos de 19.200 µg de ácido fólico durante el primer trimestre se consideró que hacían un seguimiento inferior a la pauta recomendada. Al grupo que consumió entre 19.200 y 33.600 µg, se consideró que cumplían el patrón de suplementación de manera adecuada. Finalmente, se consideró que el grupo de gestantes que consumió más de 33.600 µg seguían una pauta de suplementación superior a la recomendada.

El segundo bloque de la encuesta de hábitos y estilo de vida consistió en cuatro preguntas sobre el desayuno. Por un lado se preguntó si tenían costumbre de desayunar y si lo hacían con cereales inflados. Por otro, si tomaban café con o sin cafeína. Así se pudo clasificar a las gestantes como consumidoras o no de café no descafeinado durante toda la gestación.

El tercer bloque estuvo dedicado a los hábitos tóxicos: tabaco, alcohol y drogas. Se registró si eran fumadoras pasivas y/o activas. En caso de haber sido fumadora activa en los últimos cinco años, se registró la cantidad de cigarrillos que fumaba diariamente, tanto en aquel momento como durante los doce meses anteriores al embarazo. Si había dejado de fumar durante la gestación, se registraba en qué trimestre lo había hecho. Combinando esta información con la determinación bioquímica de la cotinina plasmática durante el embarazo (<12 SG y 24-27 SG) y en el cordón, se identificaron las fumadoras activas, las pasivas y las no fumadoras durante el primer trimestre y durante toda la gestación. En los análisis multivariantes en que se ajustó por el hábito tabáquico se consideró a las fumadoras pasivas como no fumadoras ya que no presentaban diferencias en su capacidad explicativa de la variable dependiente.

En relación al consumo de alcohol, se preguntó con qué frecuencia lo consumían, tanto durante la preconcepción como durante el embarazo. Posteriormente, se clasificó a las participantes como consumidoras habituales de alcohol (si bebían cada día o más de siete copas por semana) o no. También se preguntó si habían consumido sustancias tóxicas ilegales en los últimos cinco años. En caso afirmativo, se registró la sustancia, la frecuencia de su consumo durante los doce meses previos al embarazo y la frecuencia en el momento de la encuesta. Si habían abandonado este hábito durante la gestación, se registraba en qué trimestre lo habían hecho. A partir de esta información se clasificó a las participantes como

consumidoras o no de sustancias tóxicas ilegales durante la preconcepción y durante la gestación.

El cuarto bloque se centró en la actividad física de las participantes. Se registró la intensidad y la frecuencia de la actividad física durante el trabajo y durante el tiempo libre.

El quinto bloque estuvo dedicado a los datos socioeconómicos. Se registró el nivel de estudios y oficio de aquél momento tanto de la participante como del padre de la criatura. Posteriormente, el oficio fue categorizado según la *Clasificación Nacional de Ocupaciones 1994*<sup>271</sup>. Se asignó cada participante a un determinado nivel socioeconómico (alto, medio o bajo) combinando la profesión del padre y de la madre. Finalmente, se preguntó si habían planificado el embarazo.

### **1.3. Historia clínica**

En la historia clínica del control del embarazo cumplimentada por los obstetras se registró información referente a: edad, peso, altura y paridad de la gestante; sexo, fecha de nacimiento y peso del recién nacido y SG en el momento del parto. Con estos datos se calculó el índice de masa corporal (IMC) de la participante al inicio de la gestación y las SG en cada extracción realizada durante el embarazo.

Los resultados bioquímicos de las analíticas rutinarias de seguimiento aportaron los siguientes datos: hemograma (hemoglobina, hematocrito, hematíes, volumen corpuscular medio), glicemia y grupo sanguíneo. Con estos datos se definió la anemia como hemoglobina < 11 g/dL. También realizó un control de la tensión arterial durante toda la gestación.

## **2. Determinaciones bioquímicas y genéticas.**

El resto de determinaciones bioquímicas y las determinaciones genéticas se llevaron a cabo en el laboratorio Bevital AS (Locus for Homocysteine Research) de Bergen, Noruega. De cada una de las extracciones, se envió una alícuota de 0,5 mL de plasma en nieve carbónica para mantenerlas congeladas durante el transporte. También se enviaron 120 ng de ADN de cada participante y de su respectivo hijo/a, liofilizado en una microplaca de 96 pocillos.

## 2.1. Determinaciones bioquímicas en plasma

### Determinación de colina, betaína y DMG

La determinación de la colina plasmática y sus metabolitos (betaína y DMG) se realizó con LC-MS/MS. Las muestras de plasma se mezclaron, previamente, con tres volúmenes de acetonitrilo conteniendo 10  $\mu\text{mol/L}$  de colina- $d_6$  y de betaína- $d_9$ . Seguidamente fueron centrifugadas durante 2 minutos a 5800 g. Se trata de un proceso completamente automatizado, rápido y sencillo, sin requerimiento de derivatización que permite analizar los tres metabolitos simultáneamente<sup>131</sup>. La sensibilidad fue de 0.1  $\mu\text{mol/L}$  para la colina y la betaína y de 0.2  $\mu\text{mol/L}$  para la DMG. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron del 3%, 4% y 5% para la colina, la betaína y la DMG respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo fueron del 4%, 5% y 8% para la colina, la betaína y la DMG respectivamente<sup>272</sup>.

### Determinación de tHcy

La técnica utilizada para la determinación de la tHcy fue la HPLC<sup>273</sup>. La sensibilidad de esta prueba fue de 0.1  $\mu\text{mol/L}$ . El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 0.9% y el de inter-ensayo fue del 2.1%<sup>272</sup>.

### Determinación de folato

Se determinó la concentración de folato plasmático mediante un ensayo microbiológico, con una cepa de *Lactobacillus casei* resistente al cloramfelicol<sup>274</sup>. Se adaptó la técnica para trabajar en microplaca y poder automatizar el proceso. La sensibilidad de esta técnica fue de 2 nmol/L, con un coeficiente de variación del 4% intraensayo y del 5% interensayo<sup>272</sup>.

### Determinación de cobalamina

La determinación de la cobalamina plasmática se llevó a cabo con un ensayo microbiológico utilizando una cepa de *Lactobacillus leichmannii* resistente a colistin sulfato. Se automatizó el proceso de análisis adaptando esta técnica para microplacas<sup>275</sup>. La sensibilidad de ésta técnica fue de 30 pmol/L, con coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo del 4 % y 5% respectivamente<sup>272</sup>.

### Determinación de metionina

La determinación de la metionina plasmática se realizó con GS-MS/MS<sup>276</sup>. La sensibilidad de esta prueba fue de 1  $\mu\text{mol/L}$ . El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 0.9% y el de inter-ensayo fue del 2.6%<sup>272</sup>.

### Determinación de creatinina

La concentración de creatinina plasmática fue determinada por LC-MS/MS<sup>277</sup>. La sensibilidad fue de 0.1 µmol/L, con coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo del 4%<sup>272</sup>.

### Determinación de cotinina

La cotinina es el metabolito primario de la nicotina y se utiliza como biomarcador de la exposición reciente al tabaco<sup>278</sup>. Para su determinación en plasma se utilizó el método LC-MS/MS con una sensibilidad mínima de 0.18 ng/mL<sup>279</sup>. Los coeficientes de variación fueron del 2-3% intra-ensayo y del 6% inter-ensayo. Los rangos de concentración de cotinina plasmática utilizados para categorizar la exposición al tabaco fueron: <1 ng/mL para no fumadoras, 1-10 ng/mL para fumadoras pasivas y >10 ng/mL para fumadoras activas<sup>280</sup>.

## **2.2. Determinaciones genéticas.**

A partir del ADN extraído de los leucocitos de las participantes y de sus hijo/as se determinaron polimorfismos relacionados con el metabolismo monocarbonado que pudieran influir en la vía de la colina y su relación con la tHcy. El método utilizado para la determinación de polimorfismos fue *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS). La cantidad de DNA requerida para poder llevar a cabo el análisis fue de 15-20 ng. El porcentaje de error de este método fue inferior al 1.7 atribuido a una incorrecta purificación del DNA, nanodispensación o calibración del espectro. El error medio fue de 0.26%, aunque varía en función de los polimorfismos. Los polimorfismos analizados fueron: *MTHFR* 677C→T, *MTRR* 66A→G y *BHMT* 742G→A<sup>281</sup>.

## **3. Análisis estadístico.**

En primer lugar se realizó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* para comprobar la normalidad de las concentraciones plasmáticas de todos los metabolitos. Las variables que no tenían una distribución normal se transformaron logarítmicamente.

Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como media aritmética y desviación estándar (DE) o intervalo de confianza al 95% (IC95%). Los resultados de variables cualitativas se expresaron con frecuencias absolutas y porcentajes. Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos transformados logarítmicamente (colina, betaína, DMG, Hcy, folato y cobalamina) se presentaron como medias geométricas con su IC95%.

Para explorar la fluctuación de una variable cuantitativa en función del tiempo se utilizó el análisis de la variancia para medidas repetidas (el factor intrasujeto fue la edad gestacional) con corrección *posthoc* de Bonferroni para corregir el aumento de error tipo I debido a comparaciones múltiples. También se utilizó esta prueba para investigar la fluctuación de la tHcy a lo largo de la gestación en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A (factor intersujeto), ajustando por hospital, IMC y edad de la madre al inicio de la gestación, edad gestacional (en semanas), hábito tabáquico, creatinina, folato, cobalamina y betaína en plasma del momento de la extracción.

Para comparar la media de una variable cuantitativa entre dos grupos relacionados se utilizó la prueba *t de Student* para muestras apareadas. Para investigar la significación estadística de la diferencia de medias de variables cuantitativas en más de dos grupos se utilizó el análisis de la variancia con corrección *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para explorar la fluctuación de los metabolitos de la vía de la colina y asociaciones durante la gestación en función del estado en folato se crearon terciles de folato plasmático antes de las 12, a las 15 y a las 24-27 SG. El efecto del uso de suplementación con ácido fólico sobre el estado en folato durante el primer trimestre de gestación podría ser transitorio y desaparecer cuando se termina su uso. Por este motivo, los análisis del primer trimestre se realizaron utilizando los terciles de folato creados en el mismo momento de determinación de los metabolitos (a las 12 y a las 15 SG). En cambio, los análisis del segundo y tercer trimestre se realizaron con los terciles creados a las 24-27 SG, para poder observar el efecto longitudinal del propio embarazo. Finalmente, para investigar el efecto del estado en folato materno sobre la vía metabólica de la colina fetal, se crearon terciles de folato en el momento del parto. Este es el momento de máximo estrés del estado en folato de toda la gestación lo cual puede influir en la concentración de los metabolitos fetales. El rango de todos los terciles se presenta en la **Tabla 6**.

**Tabla 6:** Rango de los terciles de folato plasmático durante la gestación.

Tercil de folato	Semanas de gestación			Parto
	< 12	15	24-27	
Bajo	3.96 - 18.11 <sup>1</sup>	3.35 - 19.86	3.21 - 8.64	2.29 - 6.74
Medio	18.18 - 35.12	19.90 - 32.47	8.68 - 16.18	6.75 - 12.44
Alto	35.29 - 447.00	32.49 - 441.00	16.22 - 333.84	12.56 - 256.57

<sup>1</sup> mínimo-máximo (nmol/L).

Se utilizó la prueba de correlación lineal de *Pearson* para investigar la asociación:

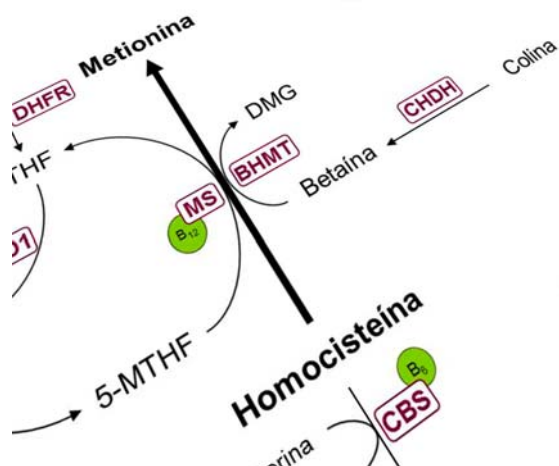
- 1) materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG en función del estado en folato
- 2) entre la colina y la betaína y entre la betaína y la DMG, tanto en la madre como en el feto y en función del estado en folato
- 3) entre la colina materna y la tHcy fetal y entre la colina y la tHcy fetales, en función del estado en folato
- 4) entre la betaína materna y la tHcy fetal y entre la betaína y la tHcy fetales, en función del estado en folato

Se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple para investigar la capacidad:

- 1) del estado en folato y del polimorfismo *BHMT* 742 G→A para explicar los metabolitos de la vía de la colina y la tHcy durante la gestación
- 2) de los metabolitos maternos (colina, betaína y DMG) para explicar los mismos en el feto y en función del estado en folato
- 3) de la colina y la betaína para explicar la tHcy durante la gestación y en el feto, en función del estado en folato
- 4) de la colina y la betaína para explicar el peso al nacer.

Todos los modelos se ajustaron con las variables confusoras pertinentes, detalladas en el apartado de resultados.

Para el análisis estadístico realizado para esta tesis se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows (*Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA*) versión 19.0. El nivel de significación utilizado fue de  $p < 0.05$  para contrastes bilaterales.



## RESULTADOS

---



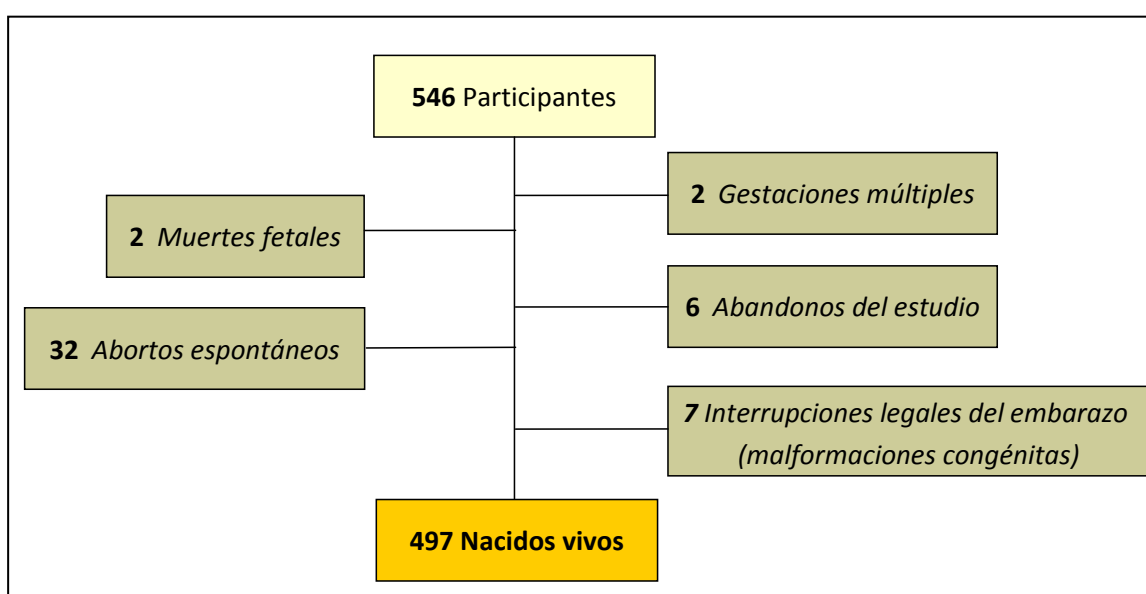


## RESULTADOS

### 1. Características generales del estudio NUTCIR

En la **Figura 10** se representa el diagrama de flujo del estudio NUTCIR. De las 546 participantes que iniciaron el estudio, 497 acabaron la gestación con el parto de un hijo vivo (91%). De las 49 restantes: 2 fueron excluidas por gestación múltiple no detectada inicialmente, 6 abandonaron el estudio durante la gestación, 2 sufrieron una muerte fetal, 7 optaron por una interrupción legal del embarazo (malformaciones fetales mayores) y 32 sufrieron un aborto espontáneo.

**Figura 10:** Diagrama de flujo del estudio NUTCIR.



En la **Tabla 5** se presentan los hábitos y estilos de vida y las características obstétricas de las participantes del estudio NUTCIR. La media de edad fue de 31.9 años. La media del IMC al inicio del embarazo fue de 23.7. Un 50.8% de las gestantes fueron primíparas y un 45.9% tenían un nivel socioeconómico alto. El 81.5% de las participantes decidieron planificar su embarazo.

El porcentaje de fumadoras activas durante el primer trimestre de gestación fue de 31.4%. El 18.8% de las gestantes continuaron con este hábito durante todo el embarazo. El consumo de alcohol y de sustancias tóxicas ilegales durante la preconcepción fue del 5.9% y 3.1%, respectivamente. En cambio, su consumo durante la gestación se redujo a 0.2% y 0.8%, respectivamente. El 59.2% de las gestantes que decidieron tomar suplementos siguieron la pauta de suplementación con ácido fólico recomendada por los obstetras durante el primer

trimestre. La media de la edad gestacional en el momento del parto fue de 38.9 semanas. El 47.7% de los nacimientos fueron fetos masculinos y la media de peso de los recién nacidos fue de 3200 gramos.

**Tabla 7.** Hábitos y estilo de vida y características obstétricas de las participantes del estudio NUTCIR.

Características	Media <sup>1</sup> o frecuencia <sup>2</sup>
Edad de la madre al inicio de la gestación (años)	31.9 (4.7) [543]
IMC al inicio de la gestación, kg/m <sup>2</sup>	23.7 (4.1) [472]
Paridad: <i>Ningún hijo</i>	50.8 [257]
<i>Un hijo vivo</i>	41.3 [209]
<i>Dos o más hijos vivos</i>	7.7 [40]
Nivel socioeconómico: <i>Bajo</i>	5.4 [25]
<i>Medio</i>	48.7 [225]
<i>Alto</i>	45.9 [212]
Planificación de la gestación	81.5 [391]
Fumadora activa durante <i>la preconcepción y el 1r trimestre</i>	31.4 [169]
<i>toda la gestación</i>	18.8 [94]
Consumo de alcohol durante <i>la preconcepción</i>	5.9 [29]
<i>toda la gestación</i>	0.2 [1]
Consumo de sustancias tóxicas ilegales durante <i>la preconcepción</i>	3.1 [15]
<i>toda la gestación</i>	0.8 [4]
Suplementación con ácido fólico <i>durante 1r trimestre de gestación:</i>	87.7 [477]
<i>&lt; 400 µg/día</i>	12.1 [58]
<i>= 400 µg/día</i>	59.1 [282]
<i>&gt; 400 µg/día</i>	28.8 [137]
<i>durante toda la gestación</i>	55.3 [262]
Edad gestacional en el momento del parto (semanas)	38.9 (1.6) [497]
Feto masculino	47.7 [237]
Peso al nacer (gramos)	3200 (454) [497]

IMC: índice de masa corporal. <sup>1</sup>Media (DE) [N]; <sup>2</sup>% [N].

## 2. Fluctuación de los metabolitos del ciclo de la metionina durante la gestación y en el cordón umbilical

La concentración plasmática de todos los metabolitos del ciclo de la metionina fluctúa a medida que avanza la gestación ( $p < 0.001$  para todos los metabolitos). En la **Tabla 7** se presenta la media geométrica y su IC95% de la colina, la betaína, la DMG, la cobalamina, el folato, y la tHcy y la media aritmética y su IC95% de la metionina, en diferentes momentos del embarazo (<12, 15, 24-27, 34 SG y en el momento parto) y en cordón umbilical.

Se observó que la colina plasmática aumenta continuamente desde la semana 15 de gestación hasta el momento del parto. La betaína plasmática disminuyó progresivamente desde antes de la semana 12 hasta las semanas 24-27 de gestación. A partir de este momento se mantuvo constante durante el resto del embarazo y no recuperó la concentración observada en la primera determinación. La DMG plasmática disminuyó desde antes de la semana 12 hasta la 15 y se mantuvo constante hasta las semanas 24-27. Se observó un aumento a las 34 SG y en el momento del parto, llegando a superar la concentración inicial.

El folato plasmático no sufrió cambios desde antes de la semana 12 hasta la semana 15. Después disminuyó hasta la semana 34 y se mantuvo constante hasta el momento del parto. La cobalamina plasmática disminuyó a lo largo de la gestación llegando en el parto con la concentración más baja de todas las determinaciones realizadas.

La tHcy a las 15 y a las 24-27 SG fue inferior que antes de las 12 SG. A partir de las 24-27 SG se observó un claro incremento de modo que a las 34 SG la tHcy fue igual que antes de las 12 SG y en el momento del parto fue incluso superior. Finalmente, la metionina plasmática sufrió una ligera disminución desde antes de la semana 12 hasta la semana 34, momento en que se mantuvo constante hasta el final de la gestación.

Por otro lado, se observó que la concentración plasmática de estos metabolitos en el cordón umbilical fue superior que en la gestante en el momento del parto, a excepción de la tHcy, que fue inferior.

**Tabla 8.** Fluctuación de colina, betaína, DMG, folato, cobalamina, tHcy y metionina a lo largo de la gestación y en cordón umbilical<sup>1</sup>.

	< 12 SG [537] <sup>2</sup>	15 SG [425]	24-27 SG [462]	34 SG [450]	Parto [422]	Cordón umbilical [405]
<b>Colina, µmol/L</b>	7.73 (7.59-7.88)	7.79 (7.64-7.95)	9.30 (9.14-9.46) <sup>a,c</sup>	10.45 (10.24-10.67) <sup>a,c</sup>	11.82 (11.51-12.14) <sup>a,c</sup>	29.01 (27.95-30.10) <sup>e</sup>
<b>Betaína, µmol/L</b>	21.38 (20.81-21.97)	14.92 (14.62-15.23) <sup>a,c</sup>	12.96 (12.71-13.21) <sup>a,c</sup>	13.14 (12.90-13.38) <sup>c</sup>	13.30 (13.03-13.59) <sup>c</sup>	25.09 (24.6-25.59) <sup>e</sup>
<b>DMG, µmol/L</b>	2.50 (2.42-2.58)	2.20 (2.13 - 2.27) <sup>a,c</sup>	2.16 (2.09-2.24) <sup>c</sup>	2.43 (2.34-2.53) <sup>a</sup>	2.81 (2.69-2.94) <sup>a,c</sup>	3.59 (3.47-3.72) <sup>e</sup>
<b>Folato, nmol/L</b>	25.05 (23.51- 26.69)	24.70 (23.16-26.35)	12.82 (12.01-13.69) <sup>a,c</sup>	10.78 (10.04-11.57) <sup>a,c</sup>	10.61 (9.82-11.47) <sup>c</sup>	23.89 (22.64-25.22) <sup>e</sup>
<b>Cobalamina, pmol/L</b>	361 (351-372)	320 (310-331) <sup>a,c</sup>	271 (263- 280) <sup>a,c</sup>	245 (237 - 253) <sup>a,c</sup>	230 (222 - 239) <sup>a,c</sup>	316 (297- 337) <sup>e</sup>
<b>tHcy, µmol/L</b>	5.30 (5.19-5.40)	4.49 (4.40-4.57) <sup>a,c</sup>	4.64 (4.54-4.75) <sup>b,c</sup>	5.29 (5.16-5.42) <sup>a</sup>	6.16 (5.99-6.33) <sup>a,c</sup>	4.87 (4.73-5.02) <sup>e</sup>
<b>Metionina, µmol/L</b>	23.00 (22.74-23.26)	22.24 (21.95-22.53) <sup>a,c</sup>	21.70 (21.42-21.99) <sup>b,c</sup>	22.09 (21.79-22.39) <sup>b,c</sup>	22.53 (21.99-23.08) <sup>d</sup>	30.44 (29.89-30.98) <sup>e</sup>

**DMG:** Dimetilglicina; **tHcy:** concentración de homocisteína total en ayunas; **SG:** semanas de gestación. <sup>1</sup>La concentración de todos los metabolitos se representa con: media geométrica (IC 95%), excepto para la metionina que se representa con media aritmética (IC 95%); <sup>2</sup>[N]. Análisis de la variancia para medidas repetidas con corrección *posthoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples: <sup>a</sup>p<0.001 o <sup>b</sup>p<0.05 respecto a la determinación anterior; <sup>c</sup>p<0.001 o <sup>d</sup>p<0.05 respecto a la determinación <12 SG; Prueba *T de Student* para muestras apareadas: <sup>e</sup>p<0.001 respecto a la concentración materna en el momento del parto.

### 3. Fluctuación de la colina, la betaína y la DMG en función del estado en folato durante la gestación y en el cordón umbilical

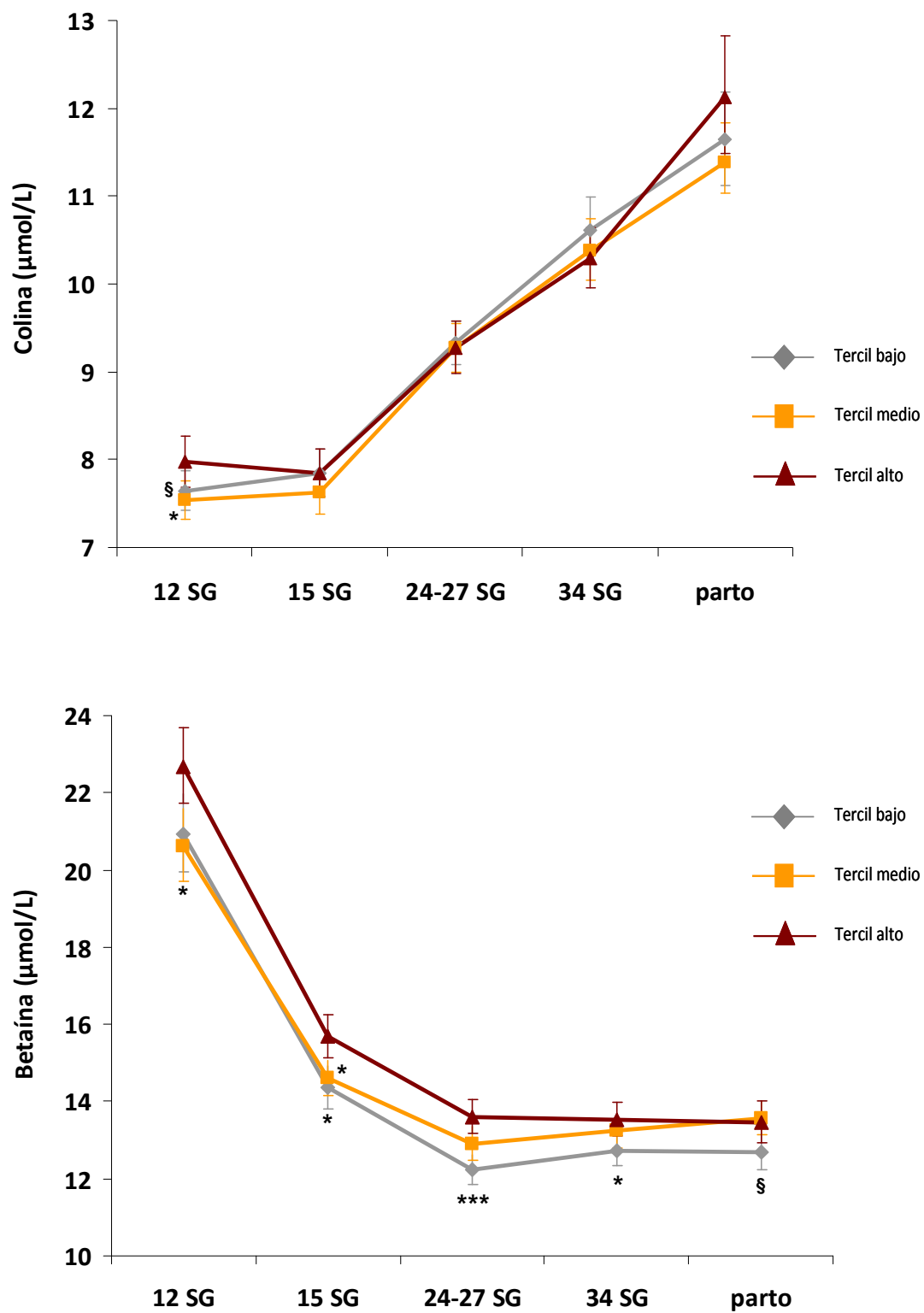
Antes de las 12 SG, las gestantes del tercil bajo y medio presentaron la colina plasmática inferior a las del tercil alto. Las del tercil medio, además, presentaron la betaína plasmática inferior. La DMG plasmática no fue diferente en función del estado en folato materno. A las 15 SG, el único metabolito que varió en función del estado en folato fue la betaína. Las gestantes del tercil bajo y medio presentaron la betaína plasmática inferior a las del tercil alto (**Figura 11**). La concentración plasmática de colina, betaína y DMG no varió en función del patrón de suplementación con ácido fólico (inferior, igual o superior a la pauta recomendada) utilizado durante el primer trimestre de gestación.

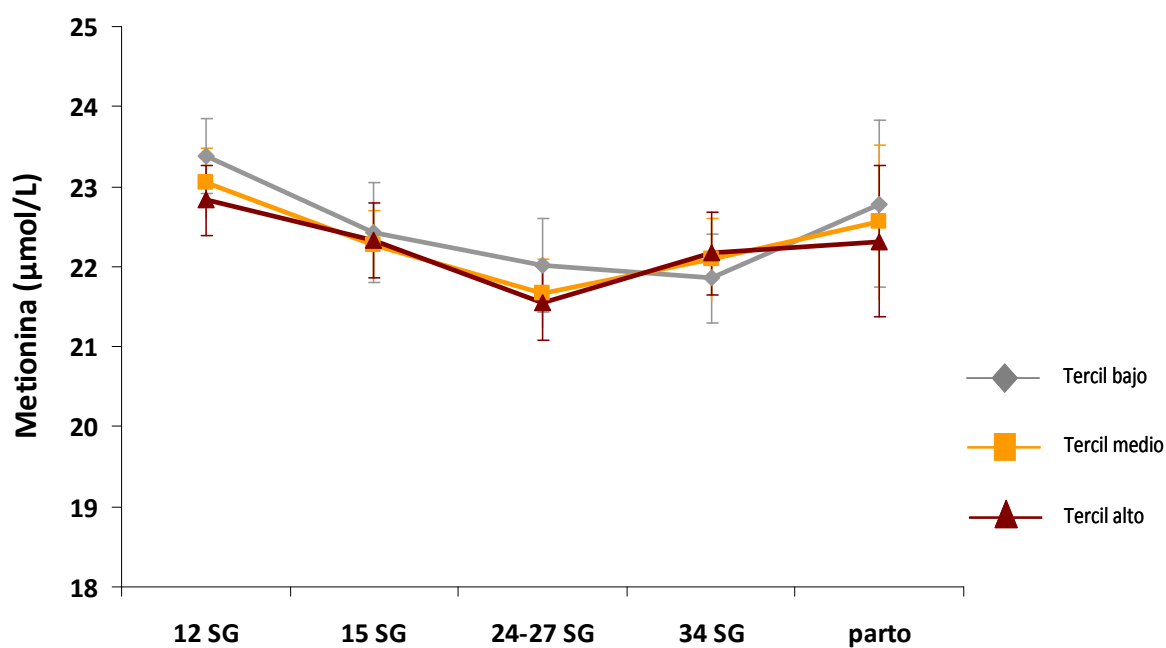
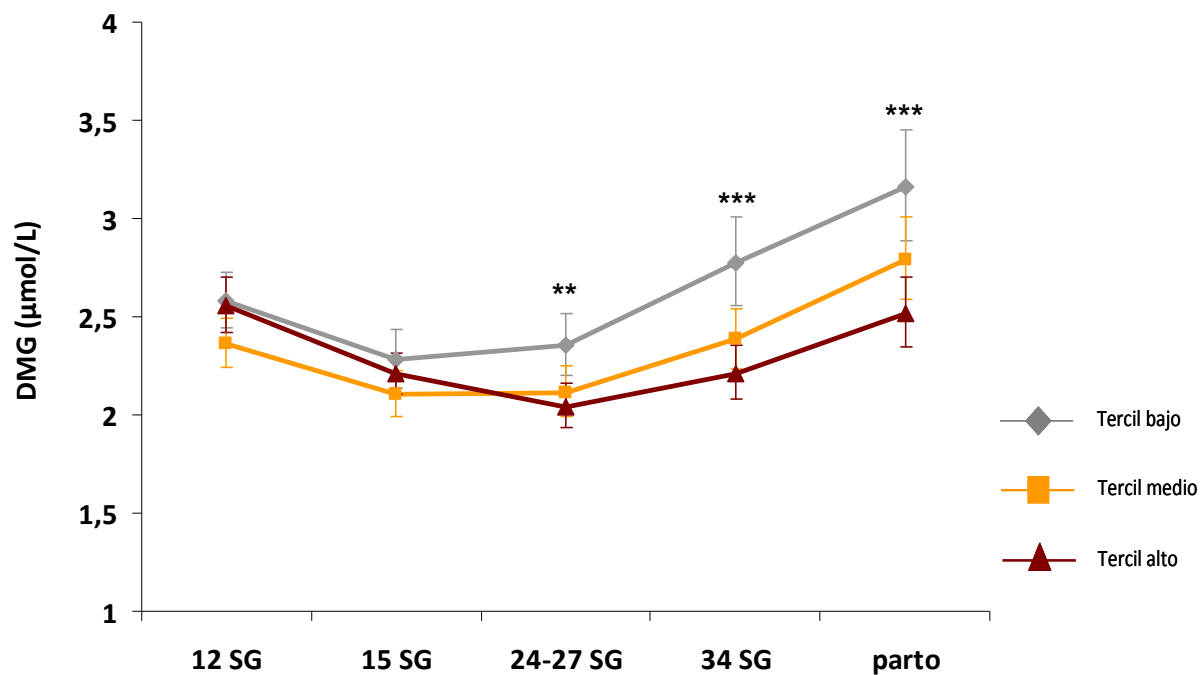
En el segundo y tercer trimestre se observó que las gestantes del tercil bajo de folato tenían la betaína plasmática inferior y la DMG plasmática superior al resto de gestantes. A las 24-27 SG, presentaron la betaína plasmática un 11,3% inferior respecto a las del tercil alto. Asimismo, su DMG plasmática fue un 13% superior respecto a las del tercil alto de folato a las 24-27 SG y un 20% superior, a las 34 SG y en el momento del parto. Sin embargo, no se hallaron diferencias en la colina ni en la metionina plasmáticas en función del estado en folato (**Figura 11**).

Las gestantes que mantuvieron la suplementación con ácido fólico durante la segunda parte de la gestación (meses de 4 a 7), presentaron la betaína plasmática un 4.7% y 4.3% superior, a las 24-27 SG y a las 34 SG respectivamente, en comparación con las gestantes no usuarias de esta suplementación. De la misma manera, las usuarias de dicha suplementación presentaron una DMG plasmática un 7.8% menor a las 34 SG que las no usuarias, aunque con una significación marginal (**Figura 12**).

Finalmente, se analizó la vía de la colina de la gestante en el momento del parto y del feto, en función del estado en folato materno (**Figura 13**). La colina plasmática no varió según el estado en folato ni en la madre ni en el feto. La betaína plasmática fue inferior ante un bajo estado en folato, tanto en la madre como en el feto. Además, en el feto, también se observó esta diferencia en el tercil medio de folato. La DMG plasmática materna fue superior en las gestantes situadas en el tercil bajo y medio de folato respecto a las del tercil alto. Sin embargo, en el feto, tan solo se observó esta diferencia cuando la gestante tenía un bajo estado en folato y con una significación marginal.

**Figura 11:** Fluctuación de la colina, la betaína, la DMG y la metionina plasmáticas durante la gestación en función del estado en folato<sup>1</sup>.

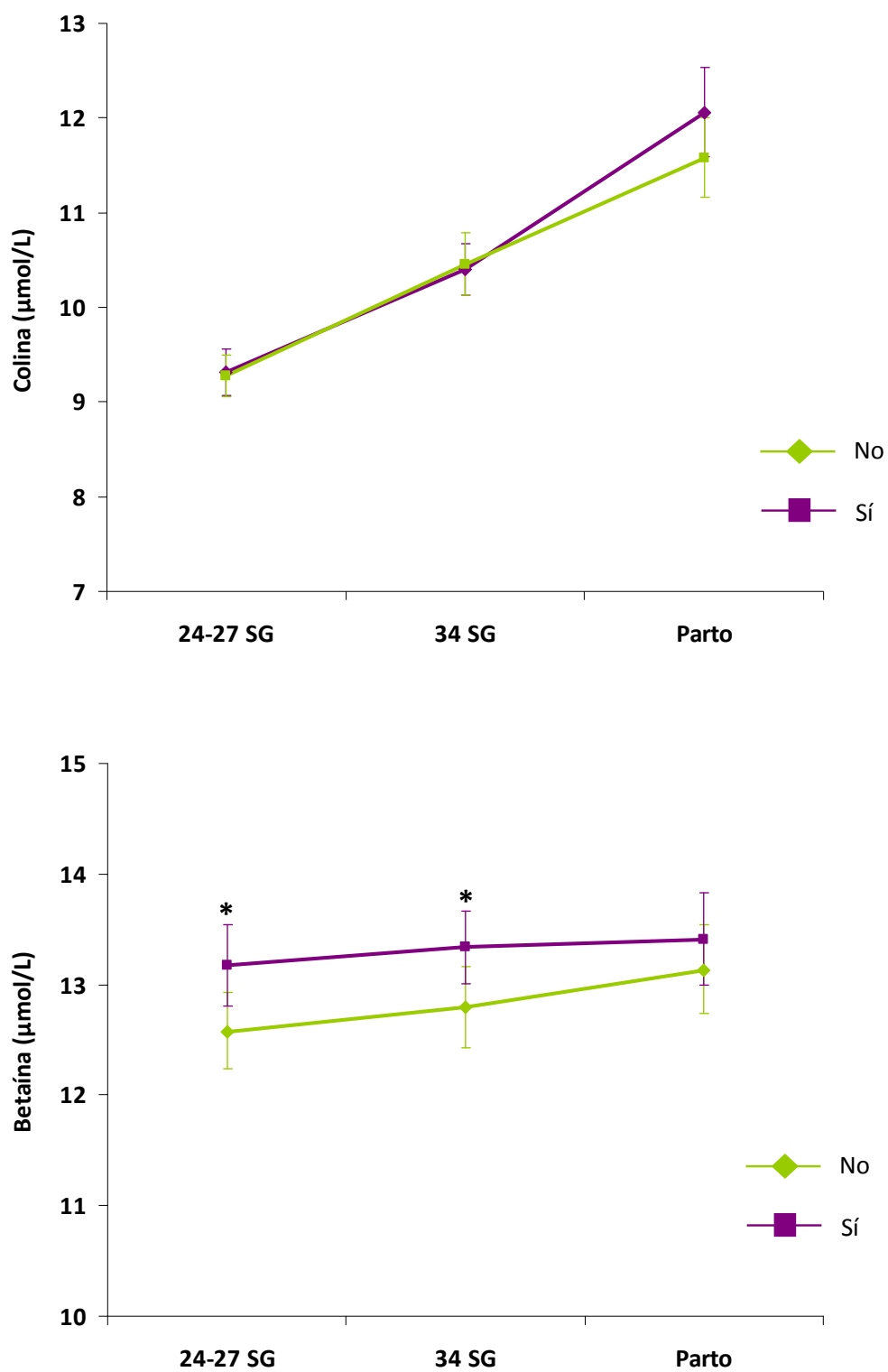


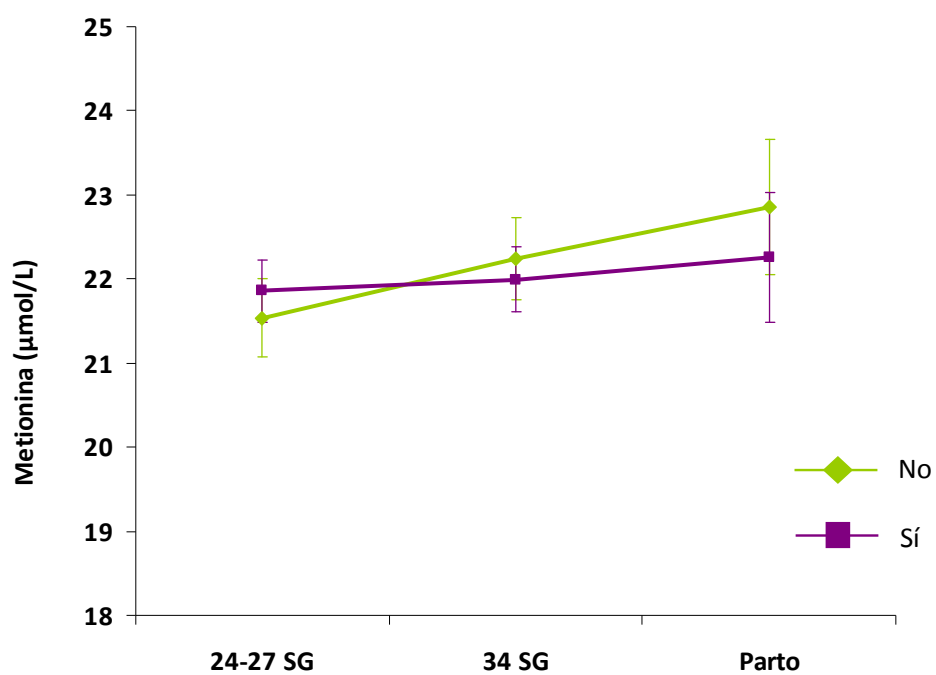
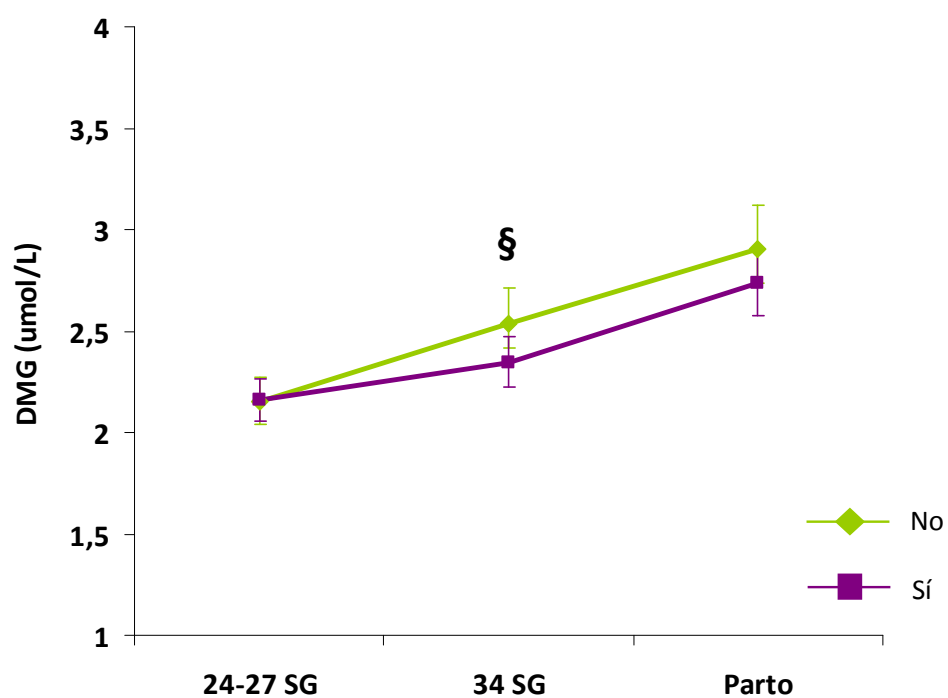


**DMG:** Dimetilglicina; **SG:** semanas de gestación. <sup>1</sup>Terciles de folato a <12 SG: bajo (3.96-18.11 nmol/L), medio (18.18-35.12 nmol/L) y alto (35.29-447.00 nmol/L); a las 15 SG: bajo (3.35-19.86), medio (19.90-32.47) y alto (32.49-441.00); a las 24-27 SG, 34 SG y parto: Bajo (3.21-8.64 nmol/L), medio (8.68 9-16.18 nmol/L) y alto (16.22-333.84 nmol/L). Se representan las medias geométricas (IC 95%) de la colina, la betaína y la DMG plasmáticas y la media aritmética (IC 95%) de la metionina. Las diferencias entre terciles se han explorado con la prueba del análisis de la variancia con corrección *posthoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples. <sup>§</sup>p≤0.06; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, respecto al tercil alto.



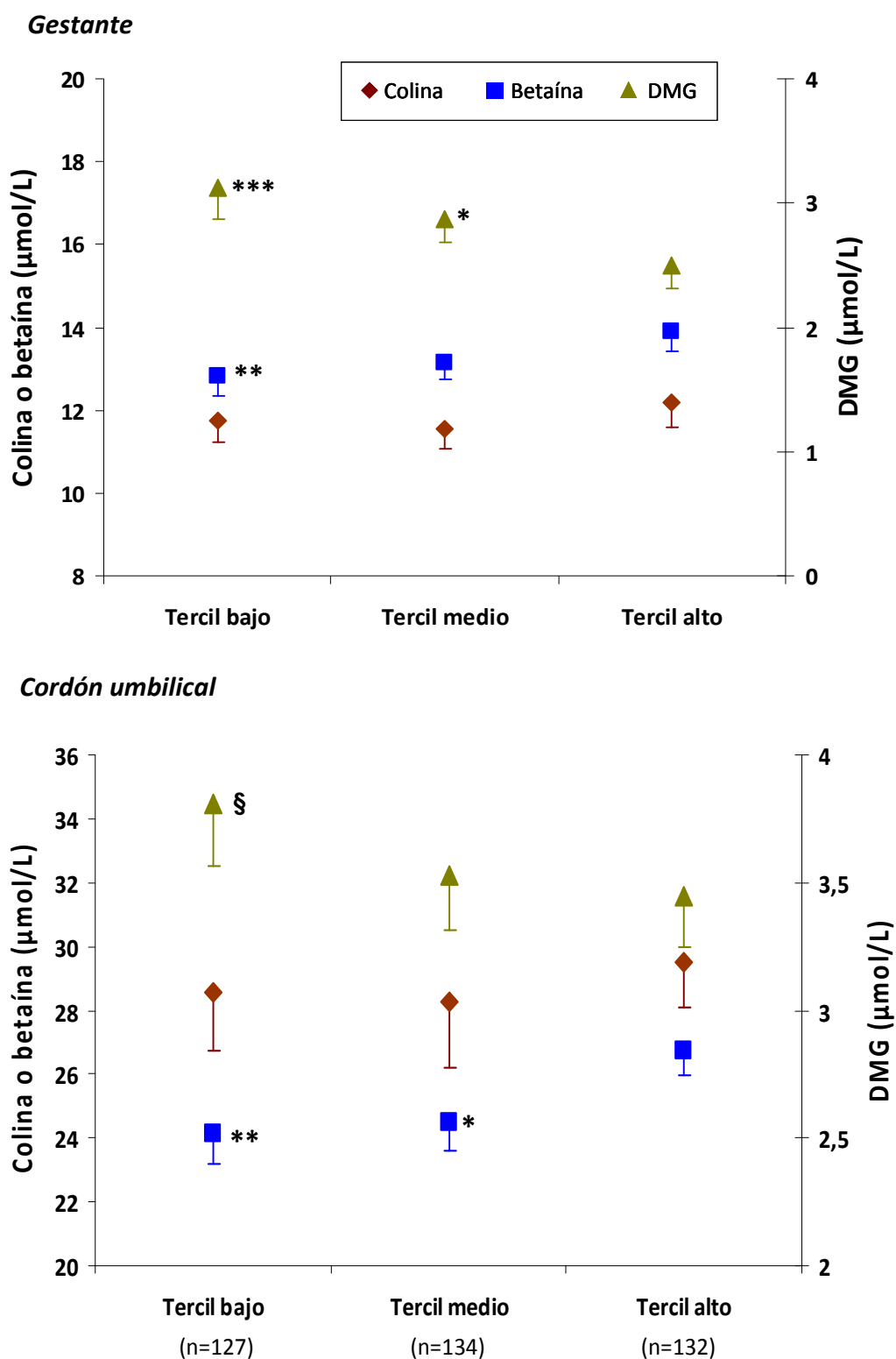
**Figura 12:** Fluctuación de la colina, la betaína, la DMG y la metionina plasmáticas durante el segundo y tercer trimestre de la gestación en función de la suplementación con ácido fólico entre los meses 4 y 7.





**DMG:** Dimetilglicina; **SG:** semanas de gestación. Se representan las medias geométricas (IC 95%) de la colina, la betaína, la DMG y la metionina plasmáticas. Las diferencias entre terciles se han explorado con la prueba del análisis de la varianza. <sup>§</sup>p=0.053; \*p<0.05, respecto al grupo de gestantes no usuarias de suplementación con ácido fólico.

Figura 13. Colina, betaína y DMG maternas y fetales en función del estado en folato<sup>1</sup>



DMG: Dimetilglicina. Se representa la media geométrica (semi-IC 95%). <sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L). Las diferencias entre terciles se han explorado con la prueba del análisis de la variancia con corrección *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples. §p=0.073; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, respecto al tercil alto de folato.

## 4. Relación del polimorfismo *BHMT* 742G→A y la vía metabólica de la colina durante la gestación y en el cordón umbilical

El polimorfismo *BHMT* 742G→A afecta el gen de la enzima BHMT, enzima responsable de la conversión de Hcy a metionina, utilizando a la betaína como dador de grupos metilo. Por este motivo se investigó la relación del polimorfismo *BHMT* 742G→A y la vía metabólica de la colina. También se exploró la frecuencia genotípica de los polimorfismos *MTHFR* 677C→T y *MTRR* 66A→G ya que tienen efecto sobre la tHcy y podrían influir indirectamente en la contribución que tiene la vía de la colina al metabolismo monocarbonado.

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo *BHMT* 742G→A en las gestantes fueron 48.8% para el genotipo salvaje, 40.9% para el genotipo heterocigoto y 10.2% para el genotipo homocigoto. Las frecuencias en los recién nacidos fueron 45.1%, 45.9% y 9.0% respectivamente (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos *BHMT* 742G→A, *MTHFR* 677C→T y *MTRR* 66A→G en las gestantes y en los recién nacidos.

		Genotipo		
		Salvaje	Heterocigoto	Homocigoto
<b>Gestantes</b>	<i>BHMT</i> 742G→A	48.8 [254] <sup>1</sup>	41.0 [213]	10.2 [53]
	<i>MTHFR</i> 677C→T	34.8 [181]	47.1 [245]	18.1 [94]
	<i>MTRR</i> 66A→G	28.3 [147]	45.9 [238]	25.8 [134]
<b>Recién nacidos</b>	<i>BHMT</i> 742G→A	45.1 [165]	45.9 [168]	9.0 [33]
	<i>MTHFR</i> 677C→T	35.1 [128]	45.5 [166]	19.4 [71]
	<i>MTRR</i> 66A→G	26.0 [95]	46.1 [168]	27.9 [102]

<sup>1</sup> % [N]

Se analizó el efecto que tenía la presencia del polimorfismo *BHMT* 742G→A materno sobre la colina, la betaína y la DMG plasmáticas a lo largo de la gestación (**Tabla 10**). No se observaron diferencias en la colina ni en la betaína plasmáticas en función del genotipo, pero sí en la DMG plasmática ( $p<0,01$ ). Las gestantes homocigóticas para el polimorfismo *BHMT* 742G→A presentaron la DMG plasmática inferior respecto a las que tienen el genotipo salvaje, a las 34 SG y en el momento del parto.

En el feto, se investigó el efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A materno y del recién nacido sobre la colina, la betaína y la DMG plasmáticas (**Tabla 10**). Al igual que en las gestantes, no se observaron diferencias en la colina ni en la betaína plasmáticas, pero sí en la DMG ( $p<0,01$ ). Los hijos de las gestantes homocigóticas para este polimorfismo tenían la DMG plasmática fetal inferior en comparación con los hijos de las gestantes con el genotipo salvaje. En cambio, no se observó ningún efecto en la DMG plasmática fetal en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A del recién nacido.

**Tabla 10.** Colina, betaína y DMG plasmáticas en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A durante la gestación y en cordón umbilical.

	<i>Genotipo</i>	< 12 SG	15 SG	24-27 SG	34 SG	Parto	Cordón umbilical	
							<i>Genotipo materno</i> <sup>1</sup>	<i>Genotipo fetal</i> <sup>2</sup>
<b>Colina</b> μmol/L	GG	7.75(7.54-7.97) [252] <sup>3</sup>	7.73(7.51-7.95) [196]	9.30(9.07-9.53) [216]	10.55(10.22-10.88) [213]	11.89(11.49-12.32) [192]	28,62(27,06-30,27) [184]	29,73(27,85-31,73) [164]
	GA	7.75(7.52-7.98) [213]	7.82(7.60-8.06) [173]	9.32(9.07-9.59) [184]	10.48(10.16-10.82) [178]	11.88(11.36-12.43) [175]	29,37(27,77-31,06) [171]	28,30 (26,97-29,69) [167]
	AA	7.88(7.40-8.39) [53]	7.98(7.54-8.44) [40]	9.67(9.11-10.25) [43]	10.69(10.20-11.20) [39]	11.66(10.67-12.75) [39]	29,76(25,54-34,69) [34]	28,15 (24,60-32,22) [33]
<b>Betaína</b> μmol/L	GG	20.96(20.16 -21.80) [252]	14.57(14.14- 15.01) [196]	12.76(12.41- 13.11) [216]	12.96(12.62-13.31) [213]	13.25(12.88-13.64) [192]	25.10(24.38-25.84) [184]	24.67(23.91-25.46) [164]
	GA	21.85(20.89-22.85) [213]	15.29(14.79-15.80) [173]	13.18(12.76-13.62) [184]	13.30(12.91-13.69) [178]	13.45(12.98-13.94) [175]	25.10(24.34-25.88) [171]	25.91(25.15-26.69) [167]
	AA	21.41(19.70-23.26) [53]	14.64(13.76-15.58) [40]	12.83(12.10-13.59) [43]	13.16(12.34-14.04) [39]	12.69(11.87-13.58) [39]	24.78(22.95-26.76) [34]	24.46(22.75-26.31) [33]
<b>DMG</b> μmol/L	GG	2.59(2.48-2.71) [252]	2.27(2.16-2.39) [196]	2.23(2.11-2.35) [216]	2.51(2.37-2.67) [213]	2.98(2.81-3.16) [192]	3.71(3.51-3.91) [184]	3.72(3.50-3.96) [164]
	GA	2.41(2.29-2.53) [213]	2.15(2.05-2.26) [173]	2.13(2.02-2.26) [184]	2.41(2.26-2.57) [178]	2.76(2.56-2.98) [175]	3.57(3.38-3.77) [171]	3.49(3.32-3.67) [167]
	AA	2.48(2.22-2.77) [53]	2.03(1.81-2.27) [40]	1.93( 1.76-2.12) [43] <sup>§</sup>	1.98(1.80-2.18) [39] <sup>b</sup>	2.25(1.97-2.57) [39] <sup>b</sup>	3.02(2.74-3.32) [34] <sup>b</sup>	3.36(2.94-3.84) [33]

**DMG:** Dimetilglicina; **SG:** Semanas de gestación; <sup>1</sup>Concentración fetal en función del genotipo materno; <sup>2</sup>Concentración fetal en función del genotipo fetal; <sup>3</sup>Media geométrica (IC95%) [N]; Análisis de la variancia con corrección *posthoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples, <sup>§</sup>p=0.08; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001, respecto al genotipo salvaje (GG).

## 5. Efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la vía metabólica de la colina durante la gestación

Hemos observado que durante la gestación, tanto el estado en folato como el polimorfismo *BHMT* 742G→A pueden influir en la vía de la colina. Por este motivo se investigó cual de los dos factores tiene más capacidad de explicar la concentración plasmática de los metabolitos de la vía de la colina y si existe interacción entre ellos, tanto en el primer trimestre (**Tabla 11**) como en el segundo y en el tercero (**Tabla 12**).

El estado en folato fue el factor más determinante de la colina plasmática tan solo antes de las 12 SG, momento en que las gestantes situadas en el tercil alto de folato presentaron un incremento del 7.83% de la colina plasmática en comparación con las gestantes situadas en el tercil bajo. No obstante, el modelo de regresión lineal múltiple fue capaz de explicar tan solo un 8% de la variabilidad de la colina plasmática.

Un elevado estado en folato también se asoció positivamente con la betaína plasmática durante toda la gestación, y de manera significativa a las 15 SG, a las 24-27 SG y en el momento del parto. Sin embargo, antes de las 12 SG se observó una relación inversa. Las gestantes con un estado en folato de entre 18.18 y 35.12 nmol/L presentaron una concentración media de betaína plasmática un 7% inferior a las gestantes con el folato plasmático <18.11 nmol/L.

En las gestantes, el estado en folato presentó una asociación inversa con la DMG plasmática durante toda la gestación y significativamente a partir de las 24-27 SG hasta el momento del parto. A las 34 SG fue cuando se observó el mayor efecto, de manera que las gestantes situadas en el tercil alto de folato presentaron la DMG plasmática un 25% inferior comparado con las gestantes del tercil bajo.

A lo largo de la gestación, no se observó asociación alguna entre la presencia del genotipo *BHMT* 742AA y la concentración de los metabolitos de la vía de la colina en plasma. Sin embargo, se observó que las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA tenían la tendencia a presentar una concentración superior de colina y betaína que el resto de gestantes, excepto antes de las 12 SG y en el momento del parto que sus concentraciones eran inferiores.

La colina fue el factor con más capacidad explicativa relativa de la betaína plasmática durante toda la gestación. De la misma manera, la betaína lo fue de la DMG plasmática. No obstante, antes de las 12 SG, el coeficiente de regresión estandarizado  $\beta$  (que indica la capacidad explicativa relativa) del genotipo *BHMT* 742AA para la betaína fue comparable al de la colina, pero en sentido contrario. Y a las 34 SG, la capacidad del estado en folato para explicar la DMG plasmática fue equiparable a la de su precursor metabólico, pero en sentido inverso.

No se observó interacción entre el estado en folato y el polimorfismo *BHMT* 742G→A en ningún momento de la gestación, para ninguno de los metabolitos analizados. Sin embargo, antes de las 12 SG, la significación estadística de la interacción entre ambos factores sobre la betaína plasmática fue 0.09.



**Tabla 11:** El efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la vía de la colina durante el primer trimestre de la gestación.

		< 12 SG			15 SG		
		% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
Colina ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	0.05 (2.72) <sup>5</sup>	0.001	0.08 [441] <sup>c</sup>	-1.59 (2.82)	-0.038	0.06 [373] <sup>b</sup>
	alto <sup>3</sup>	7.83 (3.35) <sup>a</sup>	0.170		0.03 (3.48)	0.001	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	3.05 (4.49)	0.070		2.79 (4.52)	0.070	
	AA <sup>4</sup>	4.76 (8.73)	0.064		6.73 (9.11)	0.097	
	Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-1.31 (1.91)	-0.092		-0.91 (1.91)	-0.072	
Betaína ( $\mu\text{mol/L}$ )	Betaína, $\mu\text{mol/L}$	3.31 (0.77) <sup>c</sup>	0.186	0.23 [441] <sup>c</sup>	3.64 (0.65) <sup>c</sup>	0.280	0.12 [373] <sup>c</sup>
	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	-7.16 (3.77) <sup>a</sup>	-0.110		2.21 (3.01)	0.048	
	alto <sup>3</sup>	-1.93 (4.69)	-0.029		8.79 (3.72) <sup>a</sup>	0.187	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>5</sup>	-4.95 (6.25)	-0.078		7.31 (4.83)	0.161	
	AA <sup>5</sup>	-17.82 (12.24) <sup>§</sup>	-0.181		6.49 (9.76)	0.085	
Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	4.47 (2.64) <sup>§</sup>	0.205	-1.43 (2.04)	-0.103			
DMG ( $\mu\text{mol/L}$ )	Betaína, $\mu\text{mol/L}$	2.01 (0.24) <sup>c</sup>	0.404	0.19 [441] <sup>c</sup>	3.02 (0.48) <sup>c</sup>	0.312	0.13 [373] <sup>c</sup>
	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	-4.65 (4.54)	-0.061		-5.81 (4.92)	-0.080	
	alto <sup>3</sup>	0.22 (5.58)	0.003		-3.90 (6.12)	-0.054	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	-1.25 (7.51)	-0.017		1.26 (7.95)	0.017	
	AA <sup>4</sup>	8.77 (14.84)	0.066		8.76 (16.26)	0.069	
Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-4.59 (3.17)	-0.189	-4.87 (3.32)	-0.218			

$\beta$ : coeficiente de regresión estandarizado. SG: Semanas de gestación. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup>Antes de las 12 SG, tercil de folato bajo (3.96-18.11 nmol/L), medio (18.18-35.12 nmol/L) y alto (35.29-447.00 nmol/L) y a las 15SG, tercil de folato bajo (3.35-19.86), medio (19.90-32.47) y alto (32.49-441.00); <sup>3</sup>Referencia: tercil bajo; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, hábito tabáquico en el primer trimestre, edad gestacional, creatinina y cobalamina en el momento de la extracción. <sup>§</sup>p=0.09; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 12:** El efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la vía de la colina durante el segundo y tercer trimestre de la gestación.

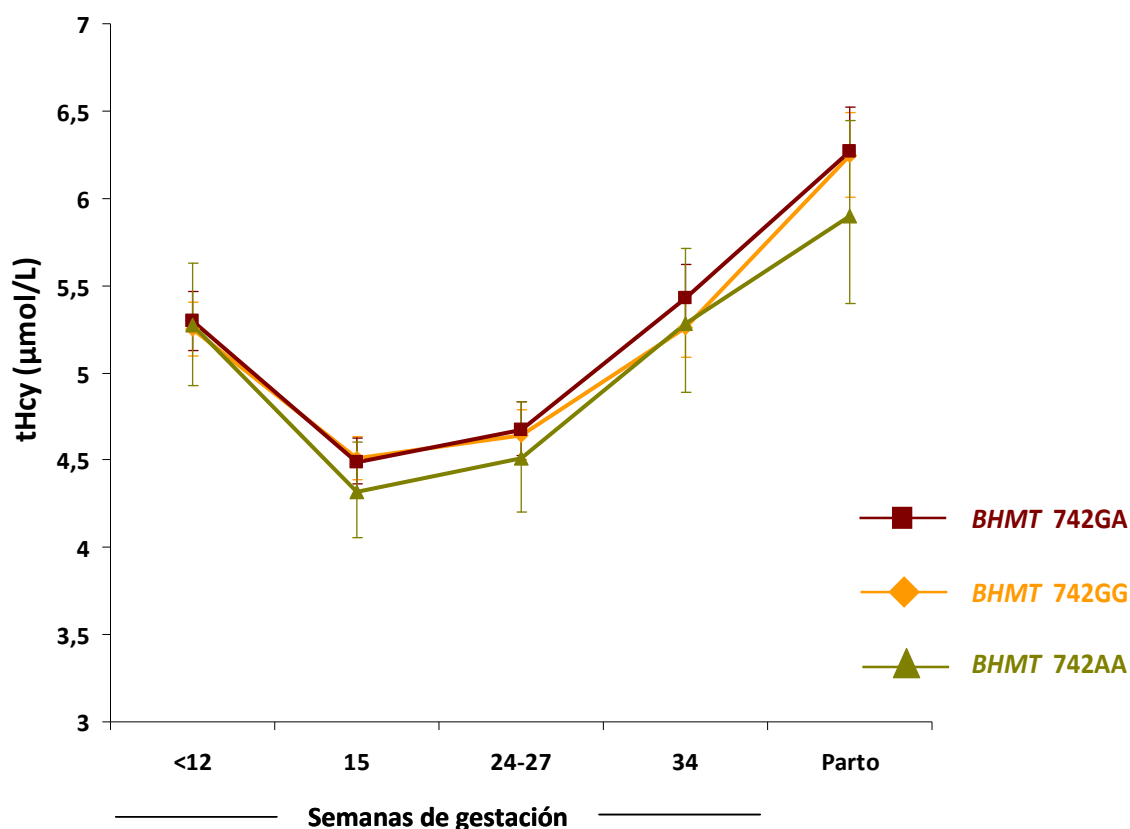
Metabolito	Variables independientes	24-27 SG			34 SG			Parto		
		% de cambio <sup>1</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]
Colina (μmol/L)	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	1.39 (2.51) <sup>5</sup>	0.034	0.11 [409] <sup>c</sup>	-2.17 (2.91)	-0.050	0.11 [367] <sup>c</sup>	-2.70 (4.09)	-0.048	0.05 [342] <sup>b</sup>
	alto <sup>3</sup>	3.04 (3.11)	0.075		-0.44 (3.74)	-0.010		1.41 (5.24)	0.025	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	2.00 (3.93)	0.510		5.41 (4.52)	0.128		2.82 (6.24)	0.052	
	AA <sup>4</sup>	7,46 (7.87)	0.111		10.02 (9.13)	0.133		-1.44 (12.80)	-0.016	
	Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-0,68 (1.69)	-0,055		-1.26 (1.93)	-0.095		0.01 (2.66)	-0.001	
Betaína (μmol/L)	Colina, μmol/L	4.43 (0.55) <sup>c</sup>	0.374	0.21 [409] <sup>c</sup>	1.83 (0.42) <sup>c</sup>	0.218	0.18 [367] <sup>c</sup>	1.19 (0.29) <sup>c</sup>	0.216	0.12 [342] <sup>c</sup>
	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	6.37 (2.64) <sup>a</sup>	0.136		3.26 (2.70)	0.076		6.81 (3.09) <sup>a</sup>	0.148	
	alto <sup>3</sup>	10.92 (3.29) <sup>b</sup>	0.232		5.33 (3.45)	0.127		7.81 (3.96) <sup>§</sup>	0.131	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	5.17 (4.14)	0.117		2.76 (4.20)	0.068		1.47 (4.71)	0.035	
	AA <sup>4</sup>	3.28 (8.30)	0.045		3.87 (8.48)	0.055		-3.33 (9.59)	-0.048	
	Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-0.99 (1.78)	-0.071		0.03 (1.80)	0.002		0.09 (2.02)	0.007	
DMG (μmol/L)	Betaína, μmol/L	4.06 (0.61) <sup>c</sup>	0.317	0.15 [409] <sup>c</sup>	5.70 (0.80) <sup>c</sup>	0.352	0.20 [367] <sup>c</sup>	5.44 (0.84) <sup>c</sup>	0.314	0.24 [342] <sup>c</sup>
	Tercil de folato <sup>2</sup> : medio <sup>3</sup>	-16.70 (5.12) <sup>c</sup>	-0.219		-18.19 (6.13)	-0.210		-15.94 (6.68) <sup>b</sup>	-0.171	
	alto <sup>3</sup>	-20.48 (6.43) <sup>c</sup>	-0.280		-25.13 (7.87) <sup>c</sup>	-0.313		-20.33 (8.61) <sup>b</sup>	-0.230	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	-6.65 (8.05)	-0.087		-5.94 (9.61)	-0.068		9.31 (10.24)	0.093	
	AA <sup>4</sup>	-14.38	-0.117		-24.03	-0.175		12.02 (21.38)	0.071	
	Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	0.47 (3.41)	0.18		0.88 (4.05)	0.030		-7.25 (4.32)	-0.247	

SG: Semanas de gestación; β: coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup>A las 24-27 SG: Bajo (3.21-8.64 nmol/L), medio (8.68 9-16.18 nmol/L) y alto (16.22-333.84 nmol/L); <sup>3</sup>Referencia: tercil bajo; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, hábito tabáquico durante toda la gestación, edad gestacional, creatinina y cobalamina en el momento de la extracción. <sup>§</sup>p=0.05; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

## 6. Relación del polimorfismo *BHMT* 742G→A y la tHcy durante la gestación y en el cordón umbilical

A lo largo de la gestación, el polimorfismo *BHMT* 742 G→A también podría tener efecto sobre la tHcy. Por este motivo se compararon las medias geométricas de la tHcy en diferentes momentos del embarazo, en función del polimorfismo *BHMT* 742 G→A y ajustando por variables confusoras que podrían influir en la tHcy. En la **Figura 14** se observa que la fluctuación de la tHcy a lo largo de la gestación fue similar entre los tres genotipos. Sin embargo, las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA presentaron una tendencia a tener la tHcy inferior en comparación al resto de gestantes. En el momento del parto, su tHcy fue un 5.6% inferior, aunque esta diferencia no fue significativa.

**Figura 14:** Fluctuación de la tHcy en función del polimorfismo *BHMT* 742 G→A a lo largo de la gestación.



tHcy: concentración de homocisteína total en ayunas. Medias geométricas (IC95%) ajustadas por: Hospital, edad e IMC de la madre al inicio de la gestación, hábito tabáquico, edad gestacional, creatinina, folato, cobalamina y betaína del momento de la extracción. Análisis de la variancia para medidas repetidas (edad gestacional como factor intrasujeto) en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A (factor intersujeto), con corrección *posthoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples.

De la misma manera, la tHcy fetal también podría estar influenciada por el polimorfismo *BHMT* 742 G→A materno o bien del recién nacido. En la **Tabla 13** se presenta la tHcy del cordón umbilical en función del polimorfismo *BHMT* 742 G→A materno y fetal, ajustada por distintas variables confusoras. Ni el genotipo materno del polimorfismo *BHMT* 742 G→A ni el fetal se asociaron con una tHcy diferente en el cordón umbilical.

**Tabla 13:** tHcy fetal (μmol/L) en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A materno o fetal.

	Genotipo materno	Genotipo fetal
GG	4.82 (4.63-5.02) [171] <sup>1</sup>	4.86 (4.67-5.06) [154]
GA	4.88 (4.68-5.09) [163]	4.80 (4.61-5.00) [153]
AA	4.94 (4.49-5.45) [30]	4.85 (4.43-5.32) [30]

**tHcy:** concentración de homocisteína total en ayunas. <sup>1</sup>Media geométrica (IC95%) [N]. Medias de tHcy ajustadas por: Hospital, edad e IMC de la madre al inicio de la gestación, hábito tabáquico durante toda la gestación, edad gestacional en el momento del parto, creatinina, folato, cobalamina y betaína fetales. Análisis de la variancia en función del polimorfismo *BHMT* 742G→A (factor intersujeto) con corrección *posthoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples.

## 7. Efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la tHcy durante la gestación

El estado en folato es un factor que tiene una influencia ampliamente conocida sobre la tHcy en la población adulta y también durante la gestación. Hemos observado anteriormente que las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA tenían la tendencia a presentar la tHcy inferior respecto al resto de gestantes. Por este motivo se decidió investigar la interacción entre el polimorfismo *BHMT* 742G→A y el estado en folato plasmático sobre la tHcy en el primer trimestre (**Tabla 14**) así como en el segundo y en el tercero (**Tabla 15**).

Se observó una relación inversa entre el estado en folato y la tHcy, durante toda la gestación. El mayor efecto se observó a las 34 SG, momento en que las gestantes con el folato plasmático >16.22 nmol/L presentaron una reducción de un 19% de la tHcy respecto a las gestantes con el folato plasmático <8.64 nmol/L..

La presencia del genotipo *BHMT* 742AA se relacionó positivamente con la tHcy durante toda la gestación, excepto a las 15 SG. Sin embargo, tan solo antes de las 12 SG las gestantes con este genotipo se asociaron significativamente con un incremento del 18% de la tHcy respecto a las gestantes con el genotipo salvaje, coincidiendo con el momento en que se observó una interacción entre el polimorfismo y el estado en folato. La aparición de esta interacción entre ambos factores indica que el polimorfismo actúa de forma distinta sobre la tHcy en función del estado en folato y que existe la necesidad de investigarlo de forma independiente.

**Tabla 14.** El efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación.

	< 12 SG			15 SG		
	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
Tercil de folato <sup>2</sup> medio <sup>3</sup>	-11.58 (2.69) <sup>5,c</sup>	-0.248		-6.96 (2.67)	-0.169	
alto <sup>3</sup>	-11.49 (3.29) <sup>c</sup>	-0.249		-8.30 (3.31)	-0.207	
<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	7.80 (4.41) <sup>§</sup>	0.158	0.28	-3.41 (4.28)	-0.086	0.20
AA <sup>4</sup>	18.08 (8.62) <sup>a</sup>	0.208	[441] <sup>c</sup>	-7.60 (8.63)	-0.115	[372] <sup>c</sup>
Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-3.64 (1.88) <sup>a</sup>	-0.236		0.89 (1.81)	0.069	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación;  **$\beta$ :** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup>Antes de las 12 SG: bajo (3.96-18.11 nmol/L), medio (18.18-35.12 nmol/L) y alto (35.29-447.00 nmol/L) y a las 15SG: bajo (3.35-19.86), medio (19.90-32.47) y alto (32.49-441.00); <sup>3</sup>Referencia: tercil bajo; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, hábito tabáquico en el primer trimestre, edad gestacional, creatinina, betaína y cobalamina en el momento de la extracción y por los polimorfismos: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto) y *MTRR* 66A→G. <sup>§</sup>p=0.08; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 15.** El efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A y del estado en folato sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre de gestación.

	24-27 SG			34 SG			Parto		
	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
Tercil de folato <sup>2</sup> medio <sup>3</sup>	-9.99 (3.04) <sup>5,c</sup>	-0.198		-11.56 (3.43) <sup>c</sup>	-0.210		-12.64 (3.89) <sup>c</sup>	-0.212	
alto <sup>3</sup>	-16.29 (3.80) <sup>c</sup>	-0.339	0.25	-19.16 (4.39) <sup>c</sup>	-0.375	0.32	-17.38 (4.99) <sup>c</sup>	-0.308	0.33
<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	3.57 (4.77)	0.069	[408] <sup>c</sup>	6.45 (5.37)	0.113	[366] <sup>c</sup>	4.54 (5.93)	0.074	[341] <sup>c</sup>
AA <sup>4</sup>	5.51 (9.55)	0.063		8.19 (10.92)	0.082		11.83 (12.16)	0.112	
Interacción Folato- <i>BHMT</i> 742G→A	-1.46 (2.03)	-0.090		-2.31 (2.28)	-0.131		-3.25 (2.53)	-0.173	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación;  **$\beta$ :** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup>A las 24-27 SG: Bajo (3.21-8.64 nmol/L), medio (8.68 9-16.18 nmol/L) y alto (16.22-333.84 nmol/L); <sup>3</sup>Referencia: tercil bajo; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, hábito tabáquico durante toda la gestación, edad gestacional, creatinina, betaína y cobalamina en el momento de la extracción y por los polimorfismos: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto) y *MTRR* 66A→G. Los modelos de la semana 34 y del parto también se ajustaron por el uso de suplementación con ácido fólico durante los meses de 4 a 7. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

## 8. Relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG

Para investigar la relación de los metabolitos de la vía de la colina entre la gestante y el feto se exploró la correlación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG. Los tres metabolitos maternos en el momento del parto se correlacionaron positivamente con los fetales. La correlación materno-fetal de la colina fue baja ( $r=0.15$ ;  $p<0.01$ ;  $n=394$ ), la de la betaína fue moderada ( $r=0.43$ ;  $p<0.001$ ,  $n=394$ ) y la de la DMG fue alta ( $r=0.77$ ;  $p<0.001$ ;  $n=394$ ). Al investigar estas relaciones en función del estado en folato de la gestante en el momento del parto (**Tabla 16**) se observó que la colina materna se correlaciona positivamente con la colina fetal tan solo en las gestantes del tercil medio de folato. La betaína materna se correlacionó moderadamente con la betaína fetal en todos los terciles de folato. La DMG materna presentó una correlación muy elevada con la DMG fetal, independientemente del estado en folato, aunque en las gestantes del tercil bajo el coeficiente de correlación lineal de *Pearson* fue ligeramente superior.

**Tabla 16:** Relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG, en función del estado en folato<sup>1</sup>.

	Tercil bajo	Tercil medio	Tercil alto
Colina	0.12 <sup>2</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.12
Betaína	0.42 <sup>c</sup>	0.49 <sup>c</sup>	0.30 <sup>c</sup>
DMG	0.79 <sup>c</sup>	0.75 <sup>c</sup>	0.76 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L;  $n=127$ ), medio (6.75-12.44 nmol/L;  $n=134$ ) y alto (12.56-256.57 nmol/L;  $n=132$ ); <sup>2</sup>Coefficiente de correlación  $r$  de *Pearson*. <sup>a</sup> $p<0.05$ ; <sup>b</sup> $p<0.01$ ; <sup>c</sup> $p<0.001$ .

Al encontrar una correlación materno-fetal moderada para la betaína y elevada para la DMG, se decidió investigar la capacidad que tiene el metabolito materno comparado con otros factores fetales (antropométricos, bioquímicos y genéticos) para explicar la concentración plasmática fetal de la colina, la betaína y la DMG (**Tabla 17**). Se observó que el principal determinante de la concentración de estos metabolitos en el feto es la concentración del mismo metabolito en la gestante en el momento del parto. En el caso de la betaína y la DMG, el metabolito materno fue incluso más influyente que su precursor en la vía metabólica del feto. El polimorfismo *BHMT* 742G→A del feto no presentó ningún efecto sobre la concentración de colina, betaína y DMG fetales.

**Tabla 17:** Factores explicativos de la colina, la betaína y la DMG fetales.

		% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
<b>Colina fetal<sup>2</sup></b>	Colina materna <sup>2</sup>	1.89 (0.51) <sup>4,c</sup>	0.191	0.11 [354] <sup>c</sup>
	BHMT 742 GA <sup>3</sup>	-3.70 (4.04)	-0.051	
	AA <sup>3</sup>	-8.41 (7.04)	-0.069	
<b>Betaína fetal<sup>2</sup></b>	Betaína materna <sup>2</sup>	3.05(0.33) <sup>c</sup>	0.428	0.30 [353] <sup>c</sup>
	Colina fetal <sup>2</sup>	0.35(0.07) <sup>c</sup>	0.250	
	BHMT 742 GA <sup>3</sup>	4.07 (1.92) <sup>a</sup>	0.097	
	AA <sup>3</sup>	-2.66 (3.29)	-0.039	
<b>DMG fetal<sup>2</sup></b>	DMG materna <sup>2</sup>	6.78 (0.43) <sup>c</sup>	0.605	0.48 [354] <sup>c</sup>
	Betaína fetal <sup>2</sup>	1.65 (0.29) <sup>c</sup>	0.235	
	BHMT 742 GA <sup>3</sup>	-3.81 (3.06)	-0.053	
	AA <sup>3</sup>	-7.04 (5.22)	-0.058	

**DMG:** Dimetilglicina;  $\beta$ : coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup> $\mu\text{mol/L}$ ; <sup>3</sup>Referencia: genotipo salvaje (polimorfismo fetal); <sup>4</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: hospital, edad gestacional en el momento del parto, peso fetal al nacer, cotinina, folato y cobalamina fetales. <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> $p < 0.01$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$ .

Al investigar la relación materno-fetal de estos metabolitos en función del estado en folato (**Tabla 18**) de la gestante en el momento del parto se observó que, al igual que en el análisis anterior, la betaína y la DMG maternas tienen más capacidad para explicar la concentración de la betaína y la DMG fetales, respectivamente, que su propio precursor en la vía metabólica fetal. Pero se observaron algunas diferencias en función del estado en folato. La colina plasmática materna solo se asoció positivamente con la colina plasmática fetal en las gestantes situadas en los terciles medio y alto de folato.

La colina fetal, el precursor de la betaína en la vía metabólica, se asoció con un incremento del 0.3% de la betaína fetal, independientemente del estado en folato de la gestante. En cambio, la contribución de la betaína materna a la concentración de la betaína fetal disminuyó a medida que mejoró el estado en folato. Mientras que el aumento de 1  $\mu\text{mol/L}$  de betaína materna de las gestantes situadas en el tercil bajo de folato se asoció con un incremento del 3.79% de la betaína fetal, en las gestantes del tercil alto este porcentaje fue del 2.09%.



El mayor efecto del estado en folato materno se refleja en la DMG fetal. Mientras que su precursor fetal se asoció con un incremento de la DMG fetal de aproximadamente un 2%, indistintamente del estado en folato materno; la DMG materna fue capaz de aumentarla hasta un 17%, en las gestantes situadas en el tercil alto de folato. Además, cabe destacar que estos modelos de regresión lineal múltiple fueron capaces de explicar entre el 52% y el 68% de la variabilidad de la DMG fetal.

En general, el polimorfismo fetal *BHMT* 742 G→A tiene una capacidad baja para explicar la variabilidad de los metabolitos de la vía de la colina del feto.

Por otro lado, se investigó la presencia de la oxidación de la colina a betaína, que tiene lugar mediante la enzima CHDH, y la conversión de betaína a DMG, mediante la enzima BHMT, tanto en la gestante como en el feto. Para explorarlo, se calculó la correlación lineal de *Pearson* de la colina con la betaína y de la betaína con la DMG, en la gestante en el momento del parto y en el cordón umbilical (**Tabla 19**). La oxidación de la colina parece ser más activa en la gestante ya que el coeficiente de correlación entre la colina y la betaína fue más alto en la gestante que en el feto. En cambio, la correlación entre la betaína y la DMG fue similar entre ambos.

Finalmente, se investigó si la oxidación de la colina y la conversión de la betaína a DMG eran diferentes en la madre y en el feto, en función del estado en folato de la gestante en el momento del parto (**Tabla 20**). Por un lado, la correlación entre la colina y la betaína maternas fue similar entre terciles de folato, aunque en el tercil medio fue ligeramente inferior. En cambio, en el feto, se observó una tendencia a disminuir la correlación entre ambos metabolitos a medida que aumentaba el estado en folato. De esta forma, la oxidación de la colina fetal fue menor cuando las gestantes se situaban en el tercil alto de folato que cuando lo hacían en el tercil bajo. Por otro lado, la correlación entre la betaína y la DMG disminuyó a medida que aumentaba el estado en folato, tanto en la gestante como en el feto.

**Tabla 18.** Factores explicativos de la colina, la betaína y la DMG fetales, en función del estado en folato<sup>1</sup>.

		Tercil bajo			Tercil medio			Tercil alto		
		% de cambio <sup>2</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
<b>Colina</b> <sup>3</sup>	Colina materna <sup>3</sup>	1.41 (0.95) <sup>5</sup>	0.141	0.20 [110] <sup>c</sup>	2.90 (1.13) <sup>a</sup>	0.224	0.14 [120] <sup>b</sup>	1.46 (0.65) <sup>a</sup>	0.203	0.07 [123] <sup>a</sup>
	BHMT 742 GA <sup>4</sup>	-2.90 (7.49)	-0.038		-9.95 (8.29)	-0.122		-2.12(5.59)	-0.037	
	AA <sup>4</sup>	-6.93 (18.59)	-0.042		-17.06 (12.33)	-0.148		1.48 (10.00)	0.014	
<b>Betaína</b> <sup>3</sup>	Betaína materna <sup>3</sup>	3.79 (0.64) <sup>c</sup>	0.516	0.32 [110] <sup>c</sup>	2.89 (0.61) <sup>a</sup>	0.378	0.35 [119] <sup>c</sup>	2.09 (0.53) <sup>c</sup>	0.343	0.20 [123] <sup>c</sup>
	Colina fetal <sup>3</sup>	0.32(0.11) <sup>b</sup>	0.269		0.39 (0.12) <sup>b</sup>	0.270		0.33 (0.14) <sup>a</sup>	0.199	
	BHMT 742 GA <sup>4</sup>	2.32 (3.79)	0.053		4.11 (3.47)	0.097		3.31 (2.92)	0.099	
	AA <sup>4</sup>	2.24 (8.76)	0.023		-0.72 (5.07)	-0.012		-9.19 (5.26)	-0.167	
<b>DMG</b> <sup>3</sup>	DMG materna <sup>3</sup>	4.44 (0.54) <sup>c</sup>	0.603	0.52 [110] <sup>c</sup>	14.09 (1.07) <sup>c</sup>	0.669	0.68 [120] <sup>c</sup>	17.23 (1.05) <sup>c</sup>	0.805	0.67 [123] <sup>c</sup>
	Betaína fetal <sup>3</sup>	1.90 (0.55) <sup>b</sup>	0.273		1.98 (0.40) <sup>c</sup>	0.282		1.83 (0.41) <sup>c</sup>	0.245	
	BHMT 742 GA <sup>4</sup>	-6.16 (5.98)	-0.081		-1.57 (4.31)	-0.021		-4.73 (3.93)	-0.071	
	AA <sup>4</sup>	1.75 (13.64)	0.010		-11.33 (6.34)	-0.111		-3.06 (6.96)	-0.026	

**DMG:** Dimetilglicina;  $\beta$ : coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L); <sup>2</sup>Porcentaje de cambio al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>3</sup> $\mu$ mol/L; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje (polimorfismo fetal); <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: hospital, edad gestacional en el momento del parto, peso fetal al nacer, cotinina, folato y cobalamina fetales. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 19:** Relación entre los metabolitos de la vía de la colina en la gestante y en el feto.

	Madre	Feto
<b>Colina - Betaína</b>	0.39 <sup>1,c</sup>	0.27 <sup>c</sup>
<b>Betaína - DMG</b>	0.32 <sup>c</sup>	0.31 <sup>c</sup>

N de la comparación en la madre: 422 y en el feto: 405. <sup>1</sup>Coefficiente de correlación r de Pearson. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 20:** Relación entre los metabolitos de la vía de la colina en la gestante y en el feto en función del estado de folato<sup>1</sup>.

		Tercil bajo	Tercil medio	Tercil alto
<b>Colina-Betaína</b>	<i>Madre</i>	0.40 [140] <sup>2,c</sup>	0.34 [141] <sup>c</sup>	0.41 [140] <sup>c</sup>
	<i>Feto</i>	0.37 [127] <sup>c</sup>	0.25 [134] <sup>b</sup>	0.29 [132] <sup>b</sup>
<b>Betaína - DMG</b>	<i>Madre</i>	0.44 [140] <sup>c</sup>	0.35 [141] <sup>c</sup>	0.29 [140] <sup>c</sup>
	<i>Feto</i>	0.42 [127] <sup>c</sup>	0.40 [134] <sup>c</sup>	0.20 [132] <sup>a</sup>

<sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L); <sup>2</sup>Coefficiente de correlación r de Pearson [N]. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

## 9. Efecto de la colina sobre la tHcy durante la gestación y en cordón umbilical

En primer lugar se investigó la posible interacción entre la colina plasmática y el estado en folato sobre la tHcy a lo largo de la gestación. Tan solo se encontró interacción entre ambos factores en el primer trimestre, antes de las 12 SG. Por este motivo se decidió que la contribución de la colina a la regulación de tHcy durante el primer trimestre se investigaría en función de los terciles de folato creados antes de las 12 SG y a las 15 SG respectivamente (**Tabla 21**).

Antes de las 12 SG, la relación entre la colina y la tHcy fue distinta en función del estado en folato. Mientras que en las gestantes situadas en los terciles bajo y medio de folato la relación fue positiva, en las gestantes del tercil alto fue negativa. El coeficiente de regresión estandarizado  $\beta$  de la colina disminuyó a medida que aumentaba el estado en folato de las gestantes. Sin embargo, ninguna de las relaciones observadas fue estadísticamente significativa. A las 15 SG, la relación fue siempre positiva independientemente del estado en folato, aunque tampoco se observó ninguna asociación significativa. Pero, a diferencia de lo observado antes de las 12 SG, el coeficiente  $\beta$  aumentó a medida que incrementaba el estado en folato.

El análisis del efecto de la colina sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre no se realizó en función del estado en folato, sino que el folato plasmático se utilizó como una variable de ajuste más del modelo de regresión lineal múltiple (**Tabla 22**). En esta segunda parte de la gestación, la colina se asoció positivamente con la tHcy, llegando a ser significativa en el momento del parto. Sin embargo, el aumento de tHcy asociado al aumento de 1  $\mu\text{mol/L}$  de colina fue pequeño, entre un 0.24 y un 0.95%.

**Tabla 21.** Efecto de la colina plasmática sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación, en función del estado en folato.

SG	Estado en folato	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	<i>p</i>	R <sup>2</sup> [N]
<b>&lt;12</b>	<i>Bajo</i>	1.85 (1.37) <sup>2</sup>	0.110	0.182	0.27 [130] <sup>c</sup>
	<i>Medio</i>	1.18 (0.99)	0.088	0.238	0.39 [141] <sup>c</sup>
	<i>Alto</i>	-0.60 (0.69)	-0.067	0.389	0.22 [148] <sup>b</sup>
<b>15</b>	<i>Bajo</i>	0.40 (1.03)	0.036	0.694	0.28 [109] <sup>c</sup>
	<i>Medio</i>	1.27 (1.09)	0.094	0.248	0.36 [119] <sup>c</sup>
	<i>Alto</i>	1.21 (0.97)	0.114	0.214	0.13 [127] <sup>b</sup>

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación;  **$\beta$ :** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar un  $\mu\text{mol}$  de colina; <sup>2</sup>Media (Error típico). Todos los modelos utilizados están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, consumo de café no descafeinado durante toda la gestación, hábito tabáquico en el primer trimestre, edad gestacional, creatinina y cobalamina en el momento de la extracción y por los polimorfismos: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto), *MTRR* 66A→G y *BHMT* 742G→A. Terciles de folato a < 12 SG: Bajo (3.96-18.11 nmol/L), medio (18.18-35.12 nmol/L) y alto (35.29-447.00 nmol/L) y a las 15 SG: tercil de folato bajo (3.35-19.86), medio (19.90-32.47) y alto (32.49-441.00); <sup>a</sup>*p*<0.05; <sup>b</sup>*p*<0.01; <sup>c</sup>*p*<0.001.

**Tabla 22.** Efecto de la colina sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre de la gestación.

	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	<i>p</i>	R <sup>2</sup> [N]
<b>24-27 SG</b>	0.24 (0.65) <sup>2</sup>	0.017	0.717	0.23 [394] <sup>c</sup>
<b>34 SG</b>	0.95 (0.51)	0.088	0.064	0.25 [386] <sup>c</sup>
<b>Parto</b>	0.75 (0.37)	0.097	0.043	0.23 [361] <sup>c</sup>

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación;  **$\beta$ :** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup> Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar un  $\mu\text{mol}$  de colina; <sup>2</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, consumo de café no descafeinado durante toda la gestación, hábito tabáquico, edad gestacional, creatinina, cobalamina y folato en el momento de la extracción y por los polimorfismos: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto), *MTRR* 66A→G y *BHMT* 742G→A. <sup>a</sup>*p*<0.05; <sup>b</sup>*p*<0.01; <sup>c</sup>*p*<0.001.

Finalmente, se exploró la relación de la colina y la tHcy en el cordón umbilical. Debido a que previamente se había descrito que la colina materna está relacionada con la colina fetal, se investigó cuál de las dos tenía un efecto más importante sobre la tHcy fetal.

La primera aproximación a la relación entre la colina materna o fetal y la tHcy fetal fue el cálculo de la correlación lineal de *Pearson*. No se observó una correlación estadísticamente significativa entre la colina materna y la tHcy fetal ( $r=0.09$ ;  $p=0.082$ ;  $n=397$ ). Sin embargo, la colina fetal se correlacionó positivamente con la tHcy fetal ( $r=0.20$ ;  $p<0.001$ ;  $n=405$ ). Estos resultados nos sugieren que la influencia de la colina materna y de la colina fetal sobre la tHcy fetal puede ser distinta. Teniendo en cuenta que previamente hemos observado que la correlación materno-fetal de la colina es distinta en función del estado en folato de la gestante en el momento del parto, se decidió explorar la correlación entre la colina (materna y fetal) y la tHcy fetal también en función del estado en folato (**Tabla 23**). Se observó que la colina materna se correlaciona positivamente con la tHcy fetal únicamente en las gestantes situadas en el tercil alto de folato, mientras que en las del tercil medio y bajo no se observó una correlación significativa. En cambio, la colina fetal se correlacionó positivamente con la tHcy fetal independientemente del estado en folato de la madre.

Ante estos resultados se decidió investigar la asociación entre la colina (materna y fetal) y la tHcy fetal con un análisis multivariante que permitiera controlar factores confusores (antropométricos, bioquímicos y genéticos) que podrían interferir en esta relación (**Tabla 24**).

La tHcy materna fue el factor más determinante de la tHcy fetal, independientemente del estado en folato de la gestante en el momento del parto. La colina materna se relacionó de manera distinta con la tHcy fetal en función del estado en folato de la gestante. Mientras que en las gestantes del tercil bajo y medio, la colina materna se asoció inversamente con la tHcy fetal (tan solo de manera significativa en el tercil medio), en las del tercil alto la asociación fue positiva pero tampoco significativamente. En cambio, la colina fetal se relacionó positivamente con la tHcy fetal, independientemente del estado en folato. En las gestantes del tercil alto de folato donde la asociación fue significativa y el porcentaje de cambio de la tHcy fetal asociado a la colina fetal fue superior.

**Tabla 23.** Relación entre la colina (materna o fetal) y la tHcy fetal en función del estado en folato<sup>1</sup>.

	Tercil bajo	Tercil medio	Tercil alto
<b>Colina materna vs tHcy fetal</b>	0.11 [129] <sup>2</sup>	0.00 [134]	0.24 [133] <sup>b</sup>
<b>Colina fetal vs tHcy fetal</b>	0.25 [127] <sup>b</sup>	0.23 [134] <sup>b</sup>	0.24 [132] <sup>b</sup>

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas. <sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L) <sup>2</sup>Coefficiente de correlación r de Pearson [N]. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 24.** Colina como factor explicativo de la tHcy fetal en función del estado en folato<sup>1</sup>.

	Tercil bajo		Tercil medio		Tercil alto	
	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]
tHcy materna <sup>3</sup>	8.10 (1.04) <sup>4,c</sup>	0.46	8.07 (1.21) <sup>c</sup>	0.42	12.74 (1.56) <sup>c</sup>	0.41
Colina materna <sup>3</sup>	-0.21 (0.54)		-1.22 (0.62) <sup>a</sup>		0.31 (0.45)	
Colina fetal <sup>3</sup>	0.18 (0.11)	[110] <sup>c</sup>	0.17 (0.14)	[119] <sup>c</sup>	0.66 (0.18) <sup>c</sup>	[121] <sup>c</sup>

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas. <sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L); <sup>2</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar un  $\mu$ mol del factor explicativo; <sup>3</sup> $\mu$ mol/L; <sup>4</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: Edad gestacional en el momento del parto, peso al nacer, cotinina, creatinina, folato y cobalamina fetales y por los polimorfismos del recién nacido: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto), *MTRR* 66A→G y *BHMT* 742G→A. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001.

## 10. Efecto de la betaína sobre la tHcy durante la gestación y en cordón umbilical

En primer lugar se investigó si existía una interacción entre la betaína y el estado en folato sobre la tHcy a lo largo de la gestación. Se encontró interacción a las 24-27 y a las 34 SG. Además, previamente habíamos observado una interacción entre el estado en folato y el polimorfismo *BHMT* 742 G→A sobre la tHcy únicamente antes de las 12 SG (ver *Tabla 15*). Por esto motivo y porqué el estado en folato puede regular la tHcy durante la gestación se decidió analizar la relación entre la betaína plasmática y la tHcy en función del estado en folato. El análisis de esta relación en el primer trimestre se realizó según el estado en folato de antes de las 12 SG y a las 15 SG respectivamente (**Tabla 25**). En cambio, en el segundo y tercer trimestre se analizó según el estado en folato de las 24-27 SG (**Tabla 26**).

La betaína plasmática se relacionó inversamente con la tHcy durante toda la gestación e independientemente del estado en folato. Sin embargo, se observó una relación positiva antes de las 12 SG, en las gestantes del tercil bajo y medio de folato y a las 15 SG, en gestantes con el folato plasmático en el tercil alto (>35.2 nmol/L). La asociación entre la betaína plasmática y la tHcy tan solo fue significativa a partir del segundo trimestre. A las 24-27 SG, el aumento de 1 µmol/L de betaína se asoció con una reducción de 1.55% de la tHcy en las gestantes del tercil bajo de folato, de 1.41% en las gestantes del tercil medio y de 1.15% en las del alto, momento en que se perdió la significación. Mientras que en este momento de la gestación un mejor estado en folato disminuye el porcentaje de cambio de la tHcy asociado a la betaína, en el momento del parto se observó el contrario. Las gestantes con el folato plasmático >16.22 nmol/L a las 24-27 SG presentaron, en el momento del parto, el porcentaje de reducción de la tHcy asociado a la betaína más importante de toda la gestación. Además, en el momento del parto, se observó una asociación inversa entre el uso de suplementación con ácido fólico y la tHcy, únicamente en las gestantes situadas al tercil bajo de folato a las 24-27 SG. Las usuarias de esta suplementación presentaron una disminución de aproximadamente un 15% de la tHcy en comparación con las no usuarias de esta suplementación.

El efecto del polimorfismo *BHMT* 742 G→A sobre la tHcy fue distinto en función del estado en folato. Mientras que en las gestantes del tercil alto y medio de folato, la presencia del genotipo *BHMT* 742AA se asoció inversamente con la tHcy, en las gestantes del tercil bajo la relación observada a lo largo de la gestación fue inconsistente y en ningún caso significativa. De todas formas, el hecho que antes de las 12 SG, el comportamiento del genotipo *BHMT* 742AA sobre



la tHcy sea contrario en las gestantes del tercil bajo que en las del medio y alto, es consistente con la interacción encontrada previamente entre el polimorfismo *BHMT* 742G→A y el estado en folato sobre la tHcy de este momento de la gestación.

Finalmente, se investigó la relación entre la betaína, tanto la materna como la fetal, y la tHcy fetal. Se calculó su correlación lineal de *Pearson* y se encontró que existe una relación inversa entre la betaína materna y la tHcy fetal ( $r=-0.13$ ;  $p<0.05$ ), sin embargo no se encontró una correlación significativa entre la betaína fetal y la tHcy fetal ( $r=0.004$ ;  $p=0.943$ ). A continuación, se exploró si estas relaciones variaban en función del estado en folato de la gestante en el momento del parto. Así, no se encontró asociación alguna entre la betaína (ni la materna ni la fetal) con la tHcy fetal, en ninguno de los terciles de folatos (**Tabla 27**).

Al explorar esta relación utilizando un análisis multivariante, sin estratificar las gestantes según su estado en folato en el momento del parto, se observó que la betaína materna se asocia inversamente con la tHcy fetal, con un nivel próximo a la significación. En cambio, la betaína fetal se asoció directamente con la tHcy fetal (**Tabla 28**).

Posteriormente, se realizó este mismo análisis en función del estado en folato en el momento del parto (**Tabla 29**). En las gestantes situadas al tercil bajo de folato, el incremento de la betaína materna se asoció con una reducción de la tHcy fetal, aunque con una significación marginal. En cambio, el incremento de la betaína fetal se asoció con un incremento significativo de la tHcy fetal. En las gestantes del tercil medio y alto, la dirección de las asociaciones fue la misma, aunque perdieron fuerza. Ni la betaína materna ni la fetal en las gestantes situadas en el tercil alto de folato ( $>12.56$  nmol/L) en el momento del parto fueron determinantes de la tHcy fetal.

**Tabla 25.** Efecto de la betaína y del polimorfismo *BHMT* 742 G→A sobre la tHcy durante el primer trimestre de gestación en función del estado en folato.

Estado en folato		< 12 SG			15 SG		
		% de cambio <sup>1</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio	β	R <sup>2</sup> [N]
Tercil bajo <sup>2</sup>	Betaína <sup>3</sup>	0.32 (0.29) <sup>5</sup>	0.090	0.27 [130] <sup>c</sup>	-0.07 (0.54)	-0.013	0.28 [109] <sup>c</sup>
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	2.52 (4.78)	0.045		-0.73 (4.32)	-0.173	
	AA <sup>4</sup>	15.04 (7.98)	0.149		-3.19 (7.23)	-0.043	
Tercil medio <sup>2</sup>	Betaína <sup>3</sup>	0.08 (0.30)	0.023	0.38 [141] <sup>c</sup>	-0.58 (0.59)	-0.078	0.36 [119] <sup>c</sup>
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	-5.47 (5.01)	-0.133		-4.79 (3.33)	-0.067	
	AA <sup>4</sup>	-1.26 (5.01)	-0.019		-4.67 (5.98)	-0.67	
Tercil alto <sup>2</sup>	Betaína <sup>3</sup>	-0.32 (0.21)	-0.130	0.23 [146] <sup>c</sup>	0.58 (0.36)	0.140	0.14 [127] <sup>b</sup>
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	2.06 (3.15)	2.06		0.54 (3.20)	0.015	
	AA <sup>4</sup>	-8.83 (6.09)	-0.118		-5.82 (5.50)	-0.098	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación; **β:** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>2</sup>Antes de las 12 SG: bajo (3.9-18.1 nmol/L), medio (18.2-35.1 nmol/L) y alto (35.2-447.0 nmol/L) y a las 15SG: tercil de folato bajo (3.35-19.8), medio (19.9-32.4) y alto (32.5-441.0); <sup>3</sup>μmol/L; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, consumo de café no descafeinado durante toda la gestación, hábito tabáquico en el primer trimestre, edad gestacional, creatinina y cobalamina en el momento de la extracción y por los polimorfismos: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto) y *MTRR* 66A→G. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 26.** Efecto de la betaína y del polimorfismo *BHMT* 742 G→A sobre la tHcy durante el segundo y tercer trimestre de gestación en función del estado en folato<sup>1</sup>.

Estado en folato		24-27 SG			34 SG			Parto		
		% de cambio <sup>2</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	β	R <sup>2</sup> [N]
Tercil bajo	Betaína	-1.55 (0.73) <sup>5,a</sup>	-0.0180		-1.14 (0.82)	-0.114		-0.06 (0.82)	-0.006	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	-3.17 (4.54)	-0.063	0.22 [131] <sup>c</sup>	2.42 (5.44)	0.039	0.31 [119] <sup>c</sup>	2.25 (5.66)	0.035	0.32 [111] <sup>c</sup>
	AA <sup>4</sup>	4.97 (7.74)	0.054		-1.09 (9.77)	-0.010		0.67 (10.35)	0.006	
Tercil medio	Betaína <sup>3</sup>	-1.41 (0.55) <sup>a</sup>	-0.231		-1.24 (0.64) <sup>§</sup>	-0.184		-1.51 (0.86) <sup>§</sup>	-0.166	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	0.78 (3.82)	0.019	0.14 [123] <sup>b</sup>	-0.56 (3.57)	-0.014	0.25 [114] <sup>c</sup>	1.30 (4.84)	-0.038	0.23 [106] <sup>b</sup>
	AA <sup>4</sup>	-1.68 (6.32)	-0.025		-7.57 (6.15)	-0.118		-3.04 (7.94)	-0.038	
Tercil alto	Betaína <sup>3</sup>	-1.15 (0.65) <sup>§</sup>	-0.144		-1.23 (0.84)	-0.138		-2.66 (0.98) <sup>b</sup>	-0.253	
	<i>BHMT</i> 742 GA <sup>4</sup>	2.45 (3.94)	0.052	0.18 [140] <sup>c</sup>	-1.98 (4.24)	-0.044	0.13 [128] <sup>b</sup>	-7.66 (5.04)	-0.147	0.21 [118] <sup>c</sup>
	AA <sup>4</sup>	-6.95 (6.64)	-0.091		-1.42 (7.31)	-0.018		-7.01 (8.41)	-0.082	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas; **SG:** Semanas de gestación; **β:** coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>A las 24-27 SG: Bajo (3.21-8.64 nmol/L), medio (8.68 9-16.18 nmol/L) y alto (16.22-333.84 nmol/L). <sup>2</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>3</sup>μmol/L; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje; <sup>5</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: edad e IMC al inicio de la gestación, hospital, consumo de café no descafeinado y hábito tabáquico durante toda la gestación, edad gestacional, creatinina y cobalamina en el momento de la extracción y por los polimorfismos *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto) y *MTRR* 66A→G. Los modelos de la semana 34 y del parto también se ajustaron por el uso de suplementación con ácido fólico durante los meses de 4 a 7. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001; <sup>§</sup>p entre 0.05 y 0.07.

**Tabla 27.** Relación entre la betaína (materna o fetal) y la tHcy fetal en función del estado en folato<sup>1</sup>

	Tercil bajo	Tercil medio	Tercil alto
<b>Betaína materna vs tHcy fetal</b>	-0.11 [129] <sup>2</sup>	-0.11 [134]	0.01 [133]
<b>Betaína fetal vs tHcy fetal</b>	0.07 [127]	0.14 [134]	0.03 [132]

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas. <sup>1</sup>En el momento del parto: Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L). <sup>2</sup>Coefficiente de correlación r de *Pearson* [N].  
<sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 28.** Betaína como factor explicativo de la tHcy fetal.

	% de cambio <sup>1</sup>	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
tHcy materna <sup>2</sup>	9.45 (0.64) <sup>3,a</sup>	0.006	
Betaína materna <sup>2</sup>	-0.82 (0.45) <sup>§</sup>	0.004	0.48 [352] <sup>c</sup>
Betaína fetal <sup>2</sup>	0.82 (0.26) <sup>c</sup>	0.003	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas;  $\beta$ : coeficiente de regresión estandarizado.  
<sup>1</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar una unidad de la variable independiente; <sup>2</sup> $\mu\text{mol/L}$ ;  
<sup>3</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: Edad gestacional en el momento del parto (semanas), peso al nacer, cotinina, creatinina, folato y cobalamina fetales y por los polimorfismos del recién nacido: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto), *MTRR* 66A→G y *BHMT* 742G→A. <sup>§</sup>p=0.065; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

**Tabla 29.** Betaína como factor explicativo de la tHcy fetal en función del estado en folato<sup>1</sup>.

	Tercil bajo		Tercil medio		Tercil alto	
	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]	% de cambio <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> [N]
tHcy materna <sup>3</sup>	8.33 (1.02) <sup>5,c</sup>		7.75 (1.16) <sup>c</sup>		12.54 (1.62) <sup>c</sup>	
Betaína materna <sup>3</sup>	-1.46 (0.82) <sup>§</sup>	0.48 [110] <sup>c</sup>	-0.38 (0.84) <sup>a</sup>	0.43 [120] <sup>c</sup>	-0.25 (0.77)	0.33 [121] <sup>c</sup>
Betaína fetal <sup>3</sup>	1.09 (0.45) <sup>a</sup>		0.80 (0.46)		0.46 (0.44)	
BHMT 742 GA <sup>4</sup>	0.75 (4.15)		0.79 (4.22)		-1.10 (3.94)	
AA <sup>4</sup>	-1.97 (9.45)		-2.53 (6.22)		8.35 (7.47)	

**tHcy:** Homocisteína plasmática total en ayunas. Todos los modelos están ajustados por: Edad gestacional al parto, peso al nacer, cotinina, creatinina, folato y cobalamina fetales y por los polimorfismos del recién nacido: *MTHFR* 677C→T (genotipo salvaje respecto al resto) y *MTRR* 66A→G. <sup>1</sup>En el momento del parto : Bajo (2.29-6.74 nmol/L), medio (6.75-12.44 nmol/L) y alto (12.56-256.57 nmol/L). <sup>2</sup>Porcentaje de cambio de la tHcy al aumentar una unidad o respecto a la categoría de referencia; <sup>3</sup>μmol/L; <sup>4</sup>Referencia: genotipo salvaje (polimorfismo fetal); <sup>5</sup>Media (Error típico). <sup>§</sup>p=0.07; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.

## 11. Efecto de la colina y la betaína maternas sobre el peso al nacer

Al encontrar que existe una relación tanto de la colina como de la betaína con la tHcy a lo largo del embarazo se decidió investigar el posible efecto de estos dos metabolitos en diferentes momentos de la gestación sobre el peso de nacimiento.

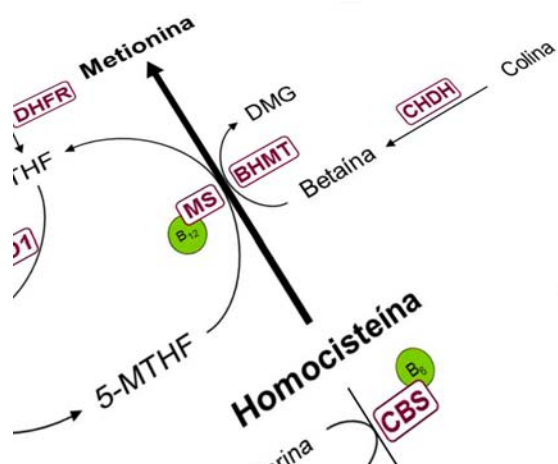
Utilizando un análisis multivariante, después de ajustar por factores de estilos de vida, antropométricos y bioquímicos que podrían influenciar sobre el peso de nacimiento, se observó que ni la colina ni la betaína plasmáticas se asocian con el peso al nacer en ningún momento de la gestación. Aunque a las 34 SG, el incremento de 1 μmol/L de betaína plasmática se asoció con una reducción de 11.60 g del peso al nacer con una significación de 0.08 (**Tabla 30**). Utilizando el mismo modelo de regresión lineal múltiple pero excluyendo la cobalamina plasmática en el momento de la extracción como factor de ajuste, la asociación entre la betaína y el peso al nacer fue más fuerte. El incremento de 1 μmol/L de betaína plasmática se asoció con una reducción de 10 g a las 15 SG ( $\beta = -0.083$ ;  $p=0.07$ ), de 11 g a las 24-27 SG ( $\beta = -0.076$ ;  $p=0.07$ ) y de 15 g a las 34 SG ( $\beta = -0.097$ ;  $p=0.03$ ).

**Tabla 30.** Efecto del estado materno en colina y en betaína sobre el peso al nacer.

SG	Colina			Betaína		
	Cambio (g)	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]	Cambio (g)	$\beta$	R <sup>2</sup> [N]
< 12	-13.52 (9.83) <sup>1</sup>	-0.057	0.35 [395] <sup>c</sup>	-1.81 (2.42)	-0.035	0.35 [395] <sup>c</sup>
15	7.13 (11.50)	0.029	0.33 [337] <sup>c</sup>	-9.22 (5.57)	-0.076	0.34 [337] <sup>c</sup>
24-27	4.93 (10.31)	0.021	0.36 [373] <sup>c</sup>	-9.78 (6.16)	-0.069	0.36 [373] <sup>c</sup>
34	-3.65 (7.37)	-0.021	0.34 [375] <sup>c</sup>	-11.60 (6.75) <sup>§</sup>	-0.077	0.34 [375] <sup>c</sup>
Parto	3.56 (5.07)	0.031	0.34[350] <sup>c</sup>	1.63 (6.52)	0.011	0.34 [350] <sup>c</sup>

SG: Semanas de gestación;  $\beta$ : coeficiente de regresión estandarizado. <sup>1</sup>Media (Error típico). Todos los modelos están ajustados por: Edad e IMC al inicio de la gestación, hábito tabáquico durante toda la gestación, nivel socioeconómico, haber completado un embarazo previamente, anemia (hemoglobina < 11 g/dL) a partir de la semana 34, edad gestacional en el momento del parto, sexo del feto, suplementación con ácido fólico entre los meses 4 y 7 de gestación y cobalamina plasmática en el momento de la extracción. <sup>§</sup>p=0.08; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001.





## DISCUSIÓN





## DISCUSIÓN

### 1. Participantes del estudio NUTCIR

Las participantes en nuestro estudio tienen un nivel socioeconómico mayoritariamente medio-alto. Esto podría tener implicaciones sobre sus hábitos, como el elevado porcentaje de mujeres que planificaron el embarazo, las pocas gestantes que consumieron sustancias tóxicas (tabaco, alcohol o drogas ilegales) durante la gestación o bien el elevado porcentaje de ellas que siguieron la pauta de suplementación con ácido fólico de forma adecuada. El porcentaje de fumadoras activas al inicio de la gestación fue de 31.4%, muy similar al descrito para la población femenina en edad fértil (entre 15 y 55 años) de Catalunya, que se encuentra alrededor del 30%<sup>282</sup>. A pesar de ello, se trata de un porcentaje ligeramente superior al que describe el *Departament de Salut* de la *Generalitat de Catalunya* para las mujeres de clase social media-alta mayores de 15 años<sup>282</sup>. El 40.1% de las fumadoras abandonaron el hábito tabáquico durante el primer trimestre de gestación.

### 2. La vía metabólica de la colina

Este estudio describe por primera vez de forma longitudinal en una población europea de 497 gestantes, la fluctuación de la colina, la betaína y la DMG plasmáticas durante el embarazo y en cordón umbilical.

El aumento de la colina plasmática observado a partir de las 15 SG coincide con la fluctuación descrita previamente en un estudio de 50 embarazadas realizado en la isla de Curaçao (habitantes básicamente africanos aunque con hábitos dietéticos predominantemente occidentales)<sup>77</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio el estado en colina fue ligeramente superior. Mientras que en el estudio de Velzing-Aarts y colaboradores la colina plasmática a las 9, 24 y 32 SG fue de 6.62, 8.87 y 9.78  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente; en nuestro estudio fue de 7.73, 9.30 y 10.45  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente. En cambio, en otro estudio realizado con 404 parejas de madres e hijos en Birmingham (Alabama) cuyo objetivo era explorar la relación entre la colina materna y el coeficiente intelectual de sus hijos a los 5 años, no se observaron variaciones en la concentración de la colina plasmática a lo largo del embarazo (9.34  $\mu\text{mol/L}$  a las 18-20 SG, 9.39  $\mu\text{mol/L}$  a las 24-26 SG y 9.14  $\mu\text{mol/L}$  a las 30-32SG)<sup>240</sup>. El motivo podría ser la diferencia entre ambas poblaciones ya que Signore y colaboradores estudiaron mujeres indígenas, mayoritariamente africanas y el 95% de las ellas con un elevado riesgo de sufrir alteraciones en el crecimiento intrauterino. Es muy probable que el estado nutricional y la prevalencia de

polimorfismos relacionados con el metabolismo monocarbonado de este grupo de mujeres indígenas sean distintos a nuestro estudio. Además, se ha descrito que las mujeres afroamericanas son más susceptibles a tener un peor estado en colina que las mujeres caucásicas<sup>106</sup>. Todos estos factores podrían explicar que la fluctuación de la colina plasmática del grupo de gestantes estudiado por Signore y colaboradores sea distinta a la observada en nuestro estudio.

La colina es un nutriente esencial durante los estadios tempranos de la gestación<sup>87</sup> y para el desarrollo cerebral del feto<sup>90</sup>. Se ha propuesto la estimulación de la producción endógena de colina mediante la vía PEMT como posible mecanismo para cubrir este aumento de la demanda durante la gestación<sup>231</sup>. La actividad enzimática de PEMT es superior en presencia de estradiol<sup>75</sup>, una hormona que aumenta a medida que avanza la gestación<sup>79</sup>. Otro posible mecanismo para cubrir la demanda de colina durante la gestación podría ser la movilización de las reservas hepáticas maternas<sup>231</sup>.

La disminución de la betaína plasmática desde el primer trimestre hasta las semanas 24-27 observada en nuestro estudio concuerda con otras descripciones publicadas previamente<sup>77,268</sup>, aunque en nuestro estudio el estado en betaína plasmática fue más elevado. Mientras que en el estudio de Velzing-Aarts y colaboradores la concentración de betaína a las 9 SG fue de 16.27  $\mu\text{mol/L}$ , en nuestro estudio fue de 21.38  $\mu\text{mol/L}$ . Asimismo, a las 28 SG, Velzing-Aarts y colaboradores hallaron una concentración de 10.73  $\mu\text{mol/L}$  y Wallace y colaboradores de 10.56, mientras que en nuestro estudio, entre las semanas 24-27, la concentración fue de 12.96  $\mu\text{mol/L}$ . Es posible que la diferencia observada en la betaína plasmática entre nuestro estudio y los realizados previamente en Curaçao<sup>77</sup> y en las islas Seychelles<sup>268</sup> sea debida, en parte, a una ingesta de betaína más elevada propia de una dieta mediterránea, ya que la ingesta diaria de betaína en mujeres de una población mediterránea<sup>41</sup> fue superior que en mujeres de poblaciones americanas<sup>36,38</sup>. Por otro lado, existe una relación directa entre la colina y la betaína, ya que esta última es el producto de la oxidación de la colina. Es de esperar que si nuestro estudio presenta una colina plasmática superior que el estudio de Velzing-Aarts y colaboradores, esta diferencia repercuta directamente en la betaína plasmática. Aunque también podría ser que la oxidación de la colina por parte de la CHDH esté más activa en nuestro estudio debido a un peor estado en folato observado en la segunda parte de la gestación. Velzing-Aarts y colaboradores observaron un incremento de folato plasmático a lo largo del embarazo, hecho que justificaron con el uso de suplementos con 800  $\mu\text{g/día}$  o más de ácido fólico por parte del 86% de las participantes. Mientras que en el estudio de Velzing-Aarts

y colaboradores la concentración de folato fue de 17.31  $\mu\text{mol/L}$  y de 20.46  $\mu\text{mol/L}$ , a las 24 SG y a las 36 SG respectivamente; en nuestro estudio fue de 12.96  $\mu\text{mol/L}$  y de 10.61  $\mu\text{mol/L}$  a las 24-27 SG y a las 34 SG respectivamente. A pesar de que los métodos analíticos para detectar el folato plasmático fueron distintos, la gran diferencia observada en su concentración sugiere que el estado en folato entre ambos estudios es realmente distinto.

La fluctuación de la DMG plasmática a lo largo del embarazo tan solo se había analizado longitudinalmente en el estudio realizado en Curaçao<sup>77</sup>. La disminución de DMG plasmática observada en nuestro estudio durante la primera parte de la gestación concuerda con el trabajo de Velzing-Aarts y colaboradores, pero la fluctuación observada durante la parte final fue diferente. En nuestro estudio, se observó un aumento a partir de la semana 34, llegando a una concentración incluso superior a la inicial en el momento del parto. La DMG es el producto de la reacción en la que la betaína actúa como dador de grupos metilo en la remetilación de la Hcy a metionina<sup>63</sup>. Durante las últimas semanas de embarazo observamos una betaína plasmática menor junto a una DMG plasmática mayor que al inicio; esta situación sugiere una actividad más elevada de esta vía metabólica. Al final de la gestación es el momento en que el estado en folato y en cobalamina es más bajo. Es posible que esta combinación lleve a una remetilación de la Hcy mediante la enzima MS menos eficaz que al inicio del embarazo. Para compensarlo, la contribución de la vía de la colina a la remetilación de la Hcy podría ser crucial.

La hemodilución es uno de los cambios fisiológicos que tienen lugar durante la gestación<sup>223,224</sup>. Esta adaptación, que adquiere mayor importancia a medida que avanza la gestación, hace que las concentraciones de los metabolitos en plasma estén aparentemente disminuidas<sup>283</sup> en ausencia de la oportuna corrección. La colina plasmática no solo se mantuvo constante hasta las 15 SG, sino que sufrió un aumento sustancial a lo largo del embarazo a pesar de la hemodilución. Esta fluctuación es indicativa de una gran producción de este nutriente a lo largo de la gestación. La reducción de la betaína y DMG plasmáticas observada entre las 12 y las 24-27 SG podría explicarse, en parte, por la hemodilución.

### 3. La vía metabólica de la colina en función del estado en folato

En nuestro estudio, en el que el 88% de las gestantes se suplementó con ácido fólico durante el primer trimestre, la concentración media de folato plasmático antes de las 12 SG fue de 25.05 nmol/L. Ante esta situación y con una concentración adecuada de cobalamina, se esperaría que la remetilación de la Hcy tuviera lugar preferentemente mediante la enzima MS. En el primer trimestre observamos que las gestantes situadas en el tercil alto de folato (>35.29 nmol/L) tenían la colina y la betaína en plasma más elevadas que las gestantes del tercil bajo (<18.11 nmol/L). Esto podría ser indicativo de una menor actividad de la vía metabólica de la colina. Previamente se ha observado tanto en una población adulta<sup>132</sup> como en otra anciana<sup>219</sup>, que la betaína plasmática es mayor en presencia de suplementación con ácido fólico. De todos modos, el hecho de que la DMG plasmática no varíe en función del estado en folato del primer trimestre cuestiona esta menor actividad aparente de la vía de la colina en las gestantes del tercil alto de folato. Si así fuera, la DMG plasmática en este grupo de gestantes habría sido inferior al resto, y sin embargo no fue así. Es poco probable que ante el buen estado en folato de las gestantes en ese momento del embarazo, debido principalmente al uso de suplementación con ácido fólico, la vía de la colina tenga un papel importante en la remetilación de la Hcy. El buen estado en folato hace que la producción de metionina sea elevada y a consecuencia que la disponibilidad de SAM para dar grupos metilo a enzimas como PEMT sea superior. De este modo la síntesis endógena de colina vía PEMT podría ser más alta en gestantes con un elevado estado en folato. Esto justificaría la superior colina plasmática observada en las gestantes situadas en el tercil alto de folato antes de las 12 SG. Por el mismo motivo, la betaína plasmática sería superior ya que es el producto directo de la oxidación de colina. No obstante, la betaína no se utilizaría en la remetilación de la Hcy, sino que actuaría como osmoregulador intracelular, otra de sus funciones en el organismo.

A partir de las 15 SG la colina plasmática no varió en función del estado en folato. Es posible que en presencia de las concentraciones elevadas de estradiol propias del embarazo<sup>79</sup>, la producción endógena de colina vía PEMT tenga más efecto sobre su concentración que el propio estado en folato, incluso al final de la gestación.

La betaína juega un papel más importante en la remetilación de la Hcy en presencia de un estado subóptimo de folato<sup>137</sup>. La gestación es un periodo de gran demanda de folato como consecuencia de la elevada síntesis de ADN, la división y proliferación celular y el crecimiento tanto del feto como de la placenta<sup>284</sup>. A partir de las semanas 24-27 se observó una

disminución sustancial de la concentración de folato plasmático respecto a las 15 SG, tanto en las gestantes que abandonaron la suplementación con ácido fólico como en las que siguieron tomando este suplemento. A partir de este momento y hasta el parto, las gestantes situadas en el tercil bajo de folato plasmático (<8.64 nmol/L) presentaron una betaína plasmática inferior y una DMG plasmática superior al resto de gestantes. No obstante, la metionina plasmática, aminoácido necesario para la síntesis de proteínas, se mantuvo constante a lo largo de toda la gestación, independientemente del estado en folato de la gestante. Del mismo modo, las gestantes que mantuvieron la suplementación con ácido fólico entre los meses 4 y 7 presentaron una betaína plasmática superior y una DMG plasmática inferior que las gestantes que abandonaron dicha suplementación. Esto sugiere que durante la parte final de la gestación, la vía de la colina está más activa y contribuye, en parte, al mantenimiento de la producción de metionina, especialmente en las gestantes que presentan un bajo estado en folato. De todas formas hay que tener en cuenta que la metionina también tiene un origen dietético, lo que podría interferir en la relación que estamos investigando.

La DMG plasmática a las 32 SG en el estudio realizado en Curaçao fue de 1.76  $\mu\text{mol/L}$  mientras que en nuestro estudio, a las 34 SG observamos una concentración de 2.43  $\mu\text{mol/L}$ . Es probable que esta diferencia se deba al distinto estado en folato de ambos grupos. A las 34 SG la concentración de folato plasmático de las gestantes en nuestro estudio es la mitad que la registrada en el estudio de Curaçao (10.78 vs 20.04 nmol/L)<sup>77</sup>. Es posible que el relativamente bajo estado en folato observado en nuestro estudio haya provocado la activación de la vía de la colina y, como consecuencia, una concentración de DMG más elevada.

El resultado global del estrés fisiológico de la gestación sobre el estado en folato se puede observar en la determinación bioquímica realizada en el momento del parto. En este momento, al igual que durante la segunda parte de la gestación, observamos que las gestantes situadas en el tercil bajo de folato presentaban la betaína plasmática inferior y la DMG plasmática superior respecto a las del tercil alto. Este perfil bioquímico, indicativo de una elevada actividad de la vía de la colina, aparentemente no se trasladó al feto. Mientras que la betaína plasmática fetal sí fue inferior en las gestantes del tercil bajo, la DMG plasmática no presentó diferencias en función del estado en folato. Esto sugiere que la vía fetal de la colina no responde igual que la vía materna al estado en folato.

Estudios en animales sugieren que la dieta materna durante la gestación podría modular la expresión de la enzima BHMT en su descendencia. Crías de ratas suplementadas con ácido

fólico durante la gestación presentaron un 50% menos de mRNA de BHMT que las de ratas no suplementadas<sup>200</sup>. Si esto ocurriera de manera similar en humanos, los hijos de gestantes usuarias de suplementación con ácido fólico quizá tendrían una menor actividad de la enzima BHMT. Esta enzima es la responsable de que la actividad de la vía de la colina sea diferente en función del estado en folato. Si su actividad fetal es menor que la materna, probablemente el estado en folato no tenga una repercusión tan clara sobre la vía fetal de la colina.

Nuestro estudio ha permitido observar por primera vez la diferente concentración plasmática de betaína y DMG durante la parte final de la gestación en función del estado en folato, en una población española en la que la suplementación con ácido fólico se recomienda exclusivamente en el primer trimestre de gestación. De esta forma, en las gestantes que siguieron esta pauta, el estado en folato de la parte final de la gestación es el resultado de la dieta y del efecto del propio embarazo. Si este trabajo se hubiera realizado en Estados Unidos, donde esta en vigor desde 1998 la ley de fortificación obligatoria de los cereales con ácido fólico<sup>235</sup>, o en otros países con la misma política, el estado en folato de las gestantes hubiera sido superior de forma generalizada y quizá no habría sido posible observar la activación de la vía de la colina.

#### 4. El polimorfismo *BHMT* 742G→A durante la gestación

El genotipo homocigoto del polimorfismo *BHMT* 742G→A se observó en el 10.2% de las gestantes de nuestro estudio, porcentaje ligeramente superior al 8.6% reportado previamente en una población holandesa<sup>164</sup> pero inferior al 17% de una población canadiense<sup>212</sup>.

Hasta la fecha, el único indicio que existía de que el polimorfismo *BHMT* 742G→A podría tener un efecto sobre la vía de la colina era la disminución de la DMG plasmática descrita en personas homocigóticas de una población adulta y sana de Noruega<sup>164</sup>. En nuestro estudio se ha investigado por primera vez el efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A sobre la vía metabólica de la colina y sobre la tHcy durante la gestación y en cordón umbilical.

En la primera parte de la gestación no se manifestó ningún efecto de este polimorfismo sobre la vía de la colina. Sin embargo, a partir de las semanas 24-27 se observó que las gestantes homocigóticas tenían la tendencia a presentar una DMG plasmática inferior al resto de gestantes. Este efecto se hizo evidente a las 34 SG y en el momento del parto, cuando las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA presentaron una DMG plasmática un 21.1% y 24.5%

inferior, respectivamente, comparado con las que tenían el genotipo *BHMT* 742GG. El efecto del genotipo *BHMT* 742AA tan solo se observó en la parte final de la gestación cuando se incrementó la actividad BHMT en respuesta al deterioro del estado en folato debido al estrés fisiológico propio del embarazo. La menor conversión de betaína a DMG en las gestantes homocigóticas podría ser debido a un funcionamiento reducido de la enzima BHMT. No se observaron diferencias en la concentración de betaína plasmática entre las variantes genotípicas, coincidiendo con lo observado en la población noruega<sup>164</sup>, aunque es posible que la ingesta dietética de betaína enmascare en parte el efecto del polimorfismo sobre la betaína plasmática.

El 9.0% de los recién nacidos de nuestro estudio tenían el genotipo *BHMT* 742AA, porcentaje muy similar al de sus madres. La presencia del polimorfismo *BHMT* 742G→A en el feto no se asoció con un cambio significativo en la concentración de los metabolitos de la vía fetal de la colina. Sin embargo, los hijos de las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA presentaron una DMG plasmática fetal inferior a la de los hijos de gestantes con el genotipo salvaje. Esto sugiere que la vía metabólica de la colina fetal está más influenciada por la actividad BHMT materna que por la fetal.

El estado en folato y el polimorfismo *BHMT* 742G→A influyen en la vía metabólica de la colina durante la parte final de la gestación de forma independiente, pero no presentan interacción entre ellos sobre la colina, la betaína o la DMG. A pesar de ello, antes de las 12 SG, las gestantes del tercil medio de folato presentaron una betaína plasmática inferior a las gestantes del tercil bajo y la presencia del genotipo *BHMT* 742AA se asoció con una reducción del 17% de la betaína plasmática próxima al nivel de significación, mientras que para el resto del embarazo estas asociaciones fueron en sentido contrario. La elevada concentración de folato plasmático en el primer trimestre debido a la suplementación con ácido fólico podría alterar la relación que se esperaría encontrar entre el folato y la betaína. Según la hipótesis de la “trampa de folato”, si el estado en folato es óptimo pero el de cobalamina no, la actividad de la enzima MS se reduce<sup>285,286</sup> simulando un estado de déficit de folato. Podría ser que, ante esta situación, la vía de la colina estuviera compensando y utilizando la betaína como dador de grupos metilo a la Hcy mediante la enzima BHMT.

En nuestro estudio, únicamente en el primer trimestre, la presencia del genotipo *BHMT* 742AA se asoció con una betaína plasmática inferior que el genotipo *BHMT* 742GG. Estudios de genética molecular han descrito que la proteína resultante de la variante homocigótica del



polimorfismo *BHMT* 742G→A tiene una constante de *Michaelis* ( $K_m$ ) para la betaína inferior que la proteína salvaje<sup>191</sup>. Podría ser que ante un estado muy elevado de folato plasmático esta diferente  $K_m$  tuviese un efecto más fuerte y la variante homocigótica tuviera más afinidad por la betaína que la variante salvaje.

En las poblaciones en las que se ha estudiado el efecto del polimorfismo *BHMT* 742G→A no se ha observado una tHcy diferente entre las variantes genotípicas<sup>164,208,210,212,214</sup>. De la misma manera, en nuestro estudio observamos que la tHcy en las gestantes y en los recién nacidos es similar entre las distintas variantes del polimorfismo *BHMT* 742G→A. Sin embargo, las gestantes con el genotipo *BHMT* 742AA tienen la tendencia a presentar una tHcy inferior que las que tienen el genotipo *BHMT* 742GG, incluso controlando factores antropométricos y bioquímicos; una tendencia que ya se había observado en el trabajo de Morin y colaboradores<sup>212</sup>. La variante homocigótica de la enzima BHMT también presenta una afinidad más elevada para la Hcy<sup>191</sup> de modo que su remetilación sería más eficaz que en la variante salvaje justificando la tendencia observada en nuestro estudio. Otros estudios han asociado la presencia del genotipo *BHMT* 742AA con una reducción del riesgo de sufrir espina bífida<sup>212</sup>, enfermedad coronaria<sup>208</sup> y cáncer de cuello uterino<sup>211</sup>.

Al investigar el efecto de este polimorfismo mediante un análisis multivariante, el genotipo *BHMT* 742 AA se asoció positivamente con la tHcy, relación contraria a la observada mediante el análisis univariante. Esta asociación tan solo fue significativa antes de las 12 SG, justo en el momento en que apareció una interacción entre el polimorfismo y el estado en folato sobre la tHcy. Dicha interacción indica que el polimorfismo se comporta de manera distinta en función del estado en folato; quizás la afinidad de la variante homocigótica de la enzima BHMT para la Hcy es superior ante un elevado estado en folato.

## 5. La relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG

La colina plasmática en cordón umbilical fue 2.5 veces mayor que en la madre en el momento del parto; la betaína, aproximadamente el doble y la DMG un 27.8% superior, unas relaciones similares a las observadas en otros estudios<sup>214,230,231,240,268</sup>.

La colina plasmática fetal fue ligeramente inferior a la encontrada en un estudio irlandés<sup>231</sup>, uno canadiense<sup>214</sup> y uno americano<sup>230,240</sup>. El motivo podría ser, en parte, que la colina plasmática materna en el momento del parto también fue más baja. Aunque se ha descrito la

existencia de un transporte en contra de gradiente de la colina materna hacia el feto<sup>227</sup>, la correlación materno-fetal de la colina en los estudios realizados hasta la fecha es poco consistente. Mientras que en el estudio irlandés se encontró correlación no significativa entre la colina materna en el momento del parto y la colina fetal ( $r=0.06$ ;  $p>0.05$ ) en 202 parejas de madres e hijos<sup>231</sup>, Friesen y colaboradores observaron una correlación positiva ( $r=0.35$ ;  $p<0.05$ ), aunque en tan solo 46 parejas de madres e hijos<sup>214</sup>. En nuestro estudio la correlación de la colina entre ambos compartimientos, aunque significativa, fue baja ( $r=0.15$ ;  $p<0.01$ ). No obstante, en el análisis multivariante se identificó a la colina materna como el principal determinante de la colina fetal, lo cual es consistente con la existencia de un transporte desde la madre hacia el feto de este nutriente esencial para su desarrollo.

El estado en folato puede modificar la relación materno-fetal de la colina. La correlación de este nutriente entre ambos compartimientos se perdió en las gestantes que en el momento del parto tenían un folato plasmático  $>12.56$  nmol/L (tercil alto). Posiblemente, la falta de correlación observada en el estudio irlandés sea debida al elevado estado en folato de las gestantes (media de 24.8 nmol/L). En las gestantes con un folato plasmático  $<6.74$  nmol/L (tercil bajo), la correlación materno-fetal de la colina se perdió y la colina materna dejó de ser determinante de la colina fetal en los análisis multivariantes. Quizá ante esta situación una parte importante de la colina materna se oxida a betaína para contribuir a la remetilación de la Hcy materna. Por otro lado, existen evidencias de síntesis endógena de fosfatidilcolina en placenta<sup>287</sup>. Por lo tanto, la colina fetal podría ser el resultado del paso de colina sintetizada en la placenta hacia el feto junto a la propia síntesis endógena del feto.

La concentración de betaína fetal en nuestro estudio fue similar a la observada en un estudio canadiense<sup>214</sup>, pero superior a la del estudio de Irlanda<sup>231</sup> y a la del realizado en las islas Seychelles<sup>268</sup>, probablemente porque la betaína materna también fue superior en el momento del parto. La correlación materno-fetal de la betaína fue moderada ( $r=0.43$ ;  $p<0.001$ ) y similar con la correlación encontrada por otros autores<sup>214,231</sup>. Al realizar un análisis multivariante observamos que el peso relativo de la betaína plasmática materna sobre la fetal es el doble que la de su precursor en la vía metabólica fetal. Aunque no se haya descrito ningún mecanismo fisiológico para el paso de la betaína desde la madre al feto, nuestros resultados, junto a la reciente detección de betaína en tejido placentario<sup>230</sup>, sugieren la existencia de un transporte entre ambos compartimientos.

El estado en folato no tuvo una repercusión sustancial sobre la correlación materno-fetal de la betaína. Las gestantes con un folato plasmático  $>12.56$  nmol/L (tercil alto) en el momento del parto presentaron un menor coeficiente de correlación materno-fetal, sugiriendo que con elevado estado en folatos el paso de betaína materna al feto es ligeramente menor. La capacidad de la betaína materna para explicar la betaína fetal y la correlación entre la colina y la betaína fetales también disminuyeron a medida que mejoró el estado en folato de la gestante. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la vía de la colina tiene una contribución menor al metabolismo monocarbonado cuando el estado en folato es elevado.

La colina plasmática se correlacionó positivamente con la betaína plasmática en la madre ( $r=0.39$ ;  $p<0.001$ ) indicando la presencia de oxidación de la colina a betaína debida a la elevada expresión de mRNA de la enzima CHDH descrita en gestantes<sup>214</sup>. En el plasma de cordón umbilical, esta correlación fue menor ( $r=0.27$ ;  $p<0.001$ ), sugiriendo que la oxidación de la colina en el feto es menor que en la madre. Esta posibilidad fue sugerida previamente por Molloy y colaboradores al no encontrar asociación entre la tHcy y la DMG fetales<sup>231</sup>.

La concentración fetal de DMG en nuestro estudio fue aproximadamente un 46% más alta que en otros dos estudios<sup>214,231</sup>, posiblemente porque la DMG plasmática de las gestantes de nuestro estudio en el momento del parto fue también un 35% superior. Pero también es posible que exista una diferente tasa de producción de DMG entre estudios debido al diferente estado en folato de las gestantes. Únicamente Molloy y colaboradores determinaron el folato plasmático de ambos compartimentos y utilizando el mismo método analítico que en nuestro estudio (ensayo microbiológico). El folato plasmático de las gestantes irlandesas fue 2.3 veces más alto que en nuestro estudio por lo que no sorprende que el folato plasmático fetal también fuera el doble. Es probable que las gestantes de nuestro estudio, que presentan un estado en folato más bajo, tengan la vía de la colina más activa, lo que se traduce en una DMG plasmática más elevada. Un estudio realizado en Brasil con 119 gestantes apoya esta hipótesis. Los autores hallaron una concentración de DMG plasmática materna en el momento del parto y fetal muy similares a las de nuestro estudio, en gestantes con un estado en folato también similar<sup>288</sup>.

El coeficiente de correlación materno-fetal de la DMG fue mayor que para los otros dos metabolitos de la vía de la colina ( $r=0.77$ ;  $p<0.001$ ), similar al encontrado en 46 parejas de gestantes e hijos<sup>214</sup>, pero superior al descrito por Molloy y colaboradores<sup>231</sup>. Los resultados de los modelos de regresión lineal múltiple, que explicaron el 48% de la variabilidad de la DMG

fetal, otorgaron a la DMG materna una importancia relativa muy superior que a su precursor en la vía metabólica fetal. Estos resultados sugieren que la DMG materna debe pasar a través de la placenta mediante algún sistema de transporte desconocido hasta la fecha. Podría ser que la DMG fetal fuera la suma de la DMG materna más la procedente de la betaína fetal. No obstante, y según los conocimientos disponibles actualmente, no parece plausible que tuviera un origen placentario, ya que la enzima BHMT no se expresa en placenta<sup>245</sup>.

Recientemente, Yan y colaboradores sugirieron que la DMG fetal tiene un origen exclusivamente fetal al no detectarla en tejido placentario<sup>230</sup>. Se han descrito distintos sistemas de transporte en la membrana basal de la placenta que permiten un flujo de aminoácidos hacia el feto<sup>289</sup>, entre ellos el de la glicina, molécula estructuralmente parecida a la DMG. Es probable que por su analogía estructural, la DMG se comporte de manera similar a la glicina y no se quede retenida en el compartimento materno. Dado que el transporte a través de la placenta para la mayoría de aminoácidos es rápido<sup>290</sup>, es posible que el transporte de la DMG sea también rápido y permanezca poco tiempo en el tejido placentario, con lo que su concentración sería siempre demasiado baja para ser detectada.

El coeficiente de correlación materno-fetal de la DMG plasmática no fue diferente en función del estado en folato de las gestantes en el momento del parto. Sin embargo, los resultados de los análisis multivariantes mostraron una diferente capacidad de la DMG materna para explicar la DMG fetal en función del estado en folato en el momento del parto. Mientras que la DMG materna en las gestantes del tercil bajo de folato se asoció con un incremento del 4.4% de la DMG fetal, en las del tercil alto se asoció con un incremento del 17.2%. Probablemente, el buen estado en folato de la gestante, que repercute en el estado en folato del feto, hace que la vía de la colina fetal esté menos activa y que produzca menos DMG. Por este motivo, en el tercil alto de folato, gran parte de la DMG fetal podría ser el resultado de un transporte desde la madre hacia el feto a través de la placenta, lo que sugeriría que la DMG debe ser necesaria para el feto. Ésta, una vez sintetizada en el citoplasma, se transfiere al interior de la mitocondria para convertirse secuencialmente en sarcosina y glicina<sup>64</sup>. La glicina es un aminoácido no esencial pero importante para la síntesis de proteínas, proceso vital para el desarrollo fetal. Quizás aquí radica la importancia del transporte de la DMG materna hacia el feto.

## 6. Contribución de la colina y la betaína a la tHcy durante la gestación

La fluctuación de la tHcy a lo largo de la gestación fue similar a la descrita previamente por otros autores<sup>77,255,256,291</sup>. La media de tHcy durante la primera parte de la gestación, período en que la tHcy disminuye, fue ligeramente superior a la de algunos trabajos publicados previamente<sup>248,291</sup>, pero inferior a la descrita por otros autores<sup>77,255,256</sup>. Estas diferencias podrían ser debidas al diferente uso de suplementación con ácido fólico durante la preconcepción y en el primer trimestre.

La media de tHcy en el momento del parto fue de 6.16  $\mu\text{mol/L}$ , concentración inferior a la de otros estudios cuyas gestantes presentaban un folato plasmático superior a las gestantes de nuestro estudio<sup>77,231</sup>. El motivo de esta diferencia podría ser el estado en cobalamina ya que las gestantes de ambos estudios presentaron un estado en cobalamina muy inferior al de las gestantes de nuestro estudio. La tHcy depende en gran parte del estado en folato pero necesita un buen estado en cobalamina para que la remetilación de la Hcy tenga lugar.

El diseño longitudinal de nuestro estudio ha permitido demostrar por primera vez que existe una interacción entre el estado en folato y la colina plasmática sobre la tHcy antes de las 12 SG en un grupo de gestantes usuarias de suplementación con ácido fólico. Es decir, el efecto de la colina plasmática sobre la tHcy fue diferente en función del estado en folato. Mientras que las gestantes del tercil bajo de folato (<18.11 nmol/L) presentaron una relación positiva entre la colina plasmática y la tHcy, en las del tercil alto (>35.29 nmol/L) la relación fue inversa; aunque ninguna de las dos fue significativa. A las 15 SG esta interacción desapareció, quizá porque en este punto la tHcy es sustancialmente más baja que antes de las 12 SG y se relaciona de manera distinta con ambos nutrientes. A partir de las 24-27 SG y hasta el final de la gestación, la colina se asoció positivamente con la tHcy, llegando a la significación en el momento del parto. Este resultado coincide con el único trabajo publicado hasta la actualidad sobre la relación de la colina y la Hcy al final de la gestación<sup>231</sup>.

La colina juega un papel más importante en la remetilación de la Hcy cuando existe un estado subóptimo de folato<sup>216</sup>. En nuestro estudio hemos demostrado que durante la parte final de la gestación, momento en que existe el mayor estrés fisiológico sobre el estado en folato, la vía de la colina se encuentra más activa. Esta activación es aún mayor en las gestantes con un bajo estado en folato, en las que la vía de la colina está actuando en la remetilación de la Hcy

mediante la enzima BHMT y por lo tanto se esperaría encontrar una relación negativa entre la colina plasmática y la tHcy. De este modo, la relación positiva observada en nuestro estudio requiere otra explicación. La colina es un nutriente esencial para el desarrollo del feto<sup>233</sup> por lo que su concentración plasmática aumenta a lo largo de la gestación. Probablemente tiene lugar una síntesis endógena de colina para poder cubrir las necesidades de la gestante durante este periodo. Esta síntesis tiene lugar en el hígado gracias a tres metilaciones secuenciales de la fosfatidiletanolamina por parte de la enzima PEMT<sup>14,66</sup>. SAM es el dador de grupos metilo de estas reacciones de metilación. Por este motivo, el producto indirecto de la síntesis endógena de colina es la Hcy. La activación de este proceso durante la gestación podría explicar la relación positiva observada entre la colina y la Hcy.

El aumento de tHcy durante el tercer trimestre de la gestación no se explica completamente por el bajo estado en folato propio de este periodo<sup>250</sup>. La síntesis endógena de colina a partir de la cual indirectamente se genera Hcy ayudaría a entender el incremento de tHcy del tercer trimestre. También es posible que la Hcy responda a otros factores fisiológicos propios del embarazo como factores hormonales. O bien que la misma Hcy tenga un papel fisiológico relacionado con el final de la gestación. Se ha propuesto que la Hcy es necesaria para la contractilidad uterina ya que se ha demostrado *in vitro* que células de endometrio humano se contraen en presencia de Hcy<sup>292</sup>.

La betaína se relacionó inversamente con la tHcy durante toda la gestación, aunque fue a partir del segundo trimestre cuando la asociación fue significativa, coincidiendo con los resultados de otros autores<sup>77,231,232</sup>. Esta asociación inversa indica que la betaína participa en la remetilación de la Hcy, especialmente en la parte final de la gestación cuando empeora el estado en folato de la gestante. Además, a las 24-27 SG, la capacidad de la betaína para explicar la tHcy aumentó a medida que el estado en folato de las gestantes disminuía. Esta relación ha sido descrita previamente en población adulta<sup>137</sup>.

En el momento del parto, la betaína de las gestantes situadas en el tercil alto de folato se asoció con la reducción más importante de tHcy observada en todo el embarazo. En gestantes con un bajo estado en cobalamina y un elevado estado en folato al inicio del embarazo se observó una mayor concentración de ácido metilmalónico (marcador bioquímico de deficiencia de cobalamina) que en gestantes con el mismo estado en cobalamina pero con un estado en folato inferior<sup>173</sup>. Ante esta situación, la remetilación de la Hcy mediante la enzima MS estaría reducida. Es posible que en el momento del parto, cuando se observa el peor estado en

cobalamina de toda la gestación, la actividad de la MS en las gestantes del tercil alto de folato sea menos eficaz y el organismo utilice la enzima BHMT para convertir la Hcy a metionina. Esto justificaría que la contribución de la betaína a la remetilación de la Hcy sea máxima en las gestantes con un elevado estado en folato sin el estado adecuado de cobalamina necesario para utilizar el 5-MTHF en el momento del parto.

## 7. Contribución de la colina y la betaína a la tHcy fetal

Los estudios de radioactividad utilizando modelos animales son los más adecuados para investigar la relación materno-fetal de los metabolitos y la contribución materna al metabolismo monocarbonado del feto. La ingesta de colina marcada radioactivamente por parte de un animal durante la gestación permitiría identificar si ésta se oxida a betaína en la madre o bien si se traslada al feto y se incorpora a la vía fetal de la colina. Conscientes de esta limitación en nuestro estudio, hemos intentado entender las relaciones materno-fetales en los humanos utilizando las determinaciones bioquímicas y los análisis estadísticos más apropiados.

En nuestro estudio, la colina materna no se correlacionó significativamente con la tHcy fetal, como tampoco sucedió en las gestantes del grupo control del estudio de Braekke y colaboradores<sup>232</sup>. En contraposición, en el estudio irlandés encontraron que la colina materna era un predictor negativo de la tHcy fetal<sup>231</sup>. El motivo de esta diferencia podría ser el estado en folato de las gestantes en el momento del parto. Al explorar la relación entre la colina materna y la tHcy fetal en función del estado en folato de las gestantes utilizando un análisis multivariante encontramos que la colina materna se asocia inversamente con la tHcy fetal en las gestantes del tercil bajo y medio (<12.44 nmol/L), aunque solo en las del medio se alcanzó el nivel de significación, mientras que en las gestantes del tercil alto la relación fue positiva. Estos resultados sugieren que ante un bajo estado en folato en el momento del parto, la colina materna juega un papel crucial en la remetilación de la Hcy fetal. En el estudio irlandés, la media de folato de las gestantes fue de 24.8 nmol/L pero la media de cobalamina fue de 127 pmol/L (deficiencia de cobalamina: <148 pmol/L<sup>293</sup>). Esto podría reducir la capacidad del folato para liberar grupos metil a la MS y a consecuencia se utilizaría la vía de la colina para remetilar la Hcy, justificación para la relación inversa entre la colina materna y la tHcy fetal encontrada en este estudio. De todos modos, la tHcy materna fue el principal determinante de la tHcy fetal, especialmente en las gestantes del tercil alto de folato. Estos resultados son compatibles con el gradiente de concentración de Hcy observado previamente entre la vena y la arteria umbilicales que sugiere la utilización de la Hcy materna por parte del feto<sup>294</sup>.

Por otro lado, en el conjunto de la muestra, la colina fetal se correlacionó positivamente con la tHcy fetal ( $r=0.20$ ;  $p<0.001$ ), concordando con trabajos previos<sup>231,232</sup>. En el posterior análisis multivariante realizado en función del estado en folatos, el aumento de la colina fetal se asoció con un incremento de la tHcy fetal, aunque únicamente en las gestantes del tercil alto de folato fue una asociación significativa. Esto sugiere que, de manera análoga a lo observado durante la gestación, la colina fetal sería el resultado de una síntesis endógena del feto, hecho que se evidencia con una relación positiva entre la colina y la tHcy fetales. Probablemente, la asociación fue más fuerte en las gestantes del tercil alto de folato porque existe una mayor producción de metionina, precursor de SAM que a su vez es el dador de grupos metilo a la enzima PEMT, encargada de la síntesis de colina.

En nuestro estudio, la betaína materna se correlacionó inversamente con la tHcy fetal ( $r=-0.13$ ;  $p<0.05$ ) mientras que otros autores no encontraron relación<sup>231,232,268</sup>. En otros estudios<sup>231,232</sup> la betaína fetal no se correlacionó significativamente con la tHcy fetal en cambio Wallace y colaboradores encontraron una relación positiva ( $r=0.394$ ;  $p<0.001$ )<sup>268</sup>. Al explorar los determinantes de la tHcy fetal mediante un análisis multivariante, encontramos que la betaína materna se asocia negativamente con la tHcy fetal, mientras que la betaína fetal lo hace positivamente. Estos resultados concuerdan con los encontrados para la colina y sugieren que la betaína materna está involucrada en la remetilación de la Hcy fetal, mientras que la betaína fetal no. Al investigar estas asociaciones en función del estado en folato, observamos que la betaína materna se asocia inversamente con la tHcy en las gestantes situadas en el tercil bajo y medio de folato, lo que apoya la hipótesis de que la betaína materna participa de la remetilación de la Hcy fetal especialmente cuando el estado en folato es bajo. También se observó que tan solo las gestantes situadas en el tercil bajo de folato ( $<6.74$  nmol/L) presentaban una relación positiva entre la betaína y la tHcy fetales. Esto sugiere que la betaína fetal, al igual que lo observado para la colina, no está involucrada en la remetilación de la Hcy fetal ni siquiera cuando el estado en folato es bajo. Las gestantes del estudio realizado en las islas Seychelles presentaron una mediana de folato plasmático en el momento del parto de 9.01 nmol/L. La similitud del estado en folato entre este estudio y el nuestro puede contribuir a que en ambos se observe una relación positiva entre la betaína y la tHcy fetales.

El efecto observado de la vía de la colina materna sobre la tHcy fetal junto a las relaciones materno-fetales observadas para la colina, la betaína y la DMG sugieren que la vía de la colina fetal tiene una contribución baja en el metabolismo monocarbonado del feto. La DMG fetal está más influenciada por el polimorfismo *BHMT* 742 G→A materno que por el fetal quizá



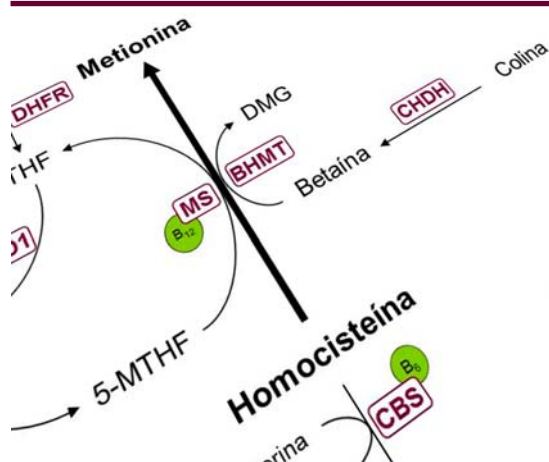
porque la actividad BHMT en el feto es baja. Esta hipótesis es compatible con la elevada excreción de betaína observada en recién nacidos<sup>295</sup> – algo que no sucede en adultos<sup>121</sup> – al no ser utilizada ésta en la remetilación de la Hcy.

Tanto la colina como la betaína fetales se relacionan positivamente con la tHcy fetal independientemente del estado en folato de la gestante en el momento del parto. Sin embargo, durante la gestación la relación entre la betaína y la tHcy fue negativa. Estos resultados, junto al hecho de que se haya detectado síntesis endógena de colina en tejido mamario<sup>296</sup> y placentario<sup>287</sup> además del hepático, sostienen la hipótesis de la existencia de una síntesis endógena de colina por parte del feto e independientemente del estado en folato. Esta síntesis tendría por objetivo cubrir las necesidades de colina, molécula esencial en diversos procesos del desarrollo fetal, como la formación de la membrana celular o la transmisión de señales en el sistema nervioso entre otros.

## 8. Efecto de la colina y la betaína sobre el peso al nacer

Una elevada tHcy durante la gestación se ha asociado con un incremento del riesgo de tener hijos con un peso inferior al esperado para su edad gestacional y sexo<sup>250</sup>. El diseño longitudinal de nuestro estudio ha permitido investigar por primera vez el efecto que tiene la colina y la betaína a lo largo de la gestación sobre el peso al nacer. La colina no se asoció con el peso al nacer en ningún momento de la gestación. En cambio, la betaína podría tener un pequeño efecto sobre el peso de nacimiento, ya que a las 34 SG se observó que el incremento de 1  $\mu\text{mol/L}$  de betaína plasmática se asocia con una media de 11.60 g menos del peso al nacer, aunque esta asociación no llegó a ser significativa.

La única explicación para que la betaína tenga un efecto sobre el peso al nacer pasa por el metabolismo de la Hcy. Un aumento de Hcy podría relacionarse con una disminución de metionina. La metionina es un aminoácido muy necesario para el desarrollo fetal, tanto que se ha calificado como un predictor positivo del peso al nacer<sup>297</sup>. Una betaína plasmática más elevada podría estar relacionada con una tHcy también superior y como consecuencia una metionina inferior. Aunque probablemente el estado en folato o en cobalamina son claramente más determinantes del peso al nacer que no la betaína o la colina.



## CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

*Objetivo 1: Describir la fluctuación de la colina, la betaína y la DMG durante la gestación y en cordón umbilical globalmente y en función del estado en folato.*

La colina plasmática aumenta a lo largo de toda la gestación y a las 12 SG este aumento es mayor en un elevado estado en folato.

Tras una disminución inicial, la betaína plasmática se mantiene constante a partir de las 24-27 SG y su estado es inferior en un bajo estado en folato.

La DMG plasmática disminuye inicialmente, pero aumenta a partir de las semanas 24-27 y su estado es superior en un bajo estado en folato.

*Objetivo 2: Analizar el efecto del polimorfismo BHMT 742G → A sobre la vía metabólica de la colina y sobre la homocisteína en diferentes momentos de la gestación y en el cordón.*

La colina y la betaína plasmáticas no varían en función del polimorfismo BHMT 742G → A ni durante la gestación ni en el cordón. La DMG plasmática es inferior al final de la gestación y en el cordón en la variante homocigota materna respecto a la salvaje. No se observa relación entre la tHcy y el polimorfismo BHMT 742G → A.

*Objetivo 3: Analizar la relación materno-fetal de la colina, la betaína y la DMG globalmente y en función del estado en folato.*

La correlación materno-fetal de la colina es baja. El efecto de la betaína materna sobre la betaína fetal disminuye a medida que aumenta el estado en folato. La DMG materna es el principal determinante de la DMG fetal, efecto que tiene más importancia a medida que aumenta el estado en folato.

*Objectivo 4: Analizar el efecto de la colina y la betaína sobre la homocisteína durante la gestación y en el cordón, globalmente y en función del estado en folato.*

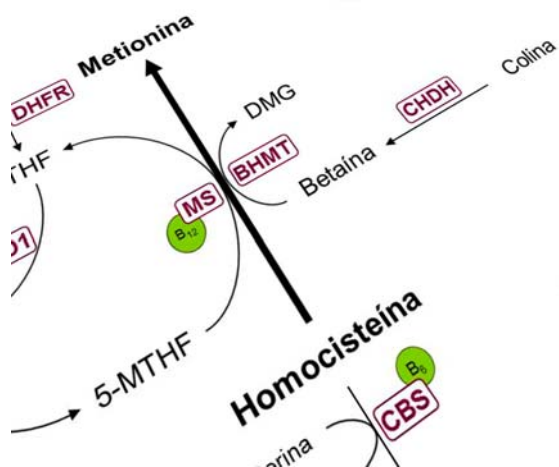
La colina plasmática se asocia positivamente con la tHcy durante toda la gestación. La betaína plasmática se asocia negativamente con la tHcy a partir del segundo trimestre y especialmente en las gestantes con un bajo estado en folato.

La colina plasmática materna no se correlaciona con la tHcy fetal. La colina plasmática fetal se asocia positivamente con la tHcy fetal tan solo en las gestantes con un elevado estado en folato.

La betaína plasmática materna se asocia negativamente con la tHcy fetal tan solo cuando el estado en folato materno no es elevado. La betaína plasmática fetal se asocia positivamente con la tHcy fetal, cuando el estado en folato es bajo.

*Objectivo 5: Analizar la asociación del estado en colina y betaína en diferentes momentos del embarazo con el peso al nacer.*

El estado materno en colina y en betaína no se relaciona con el peso al nacer.



---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Moss GP. Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB). 2011. Consultado en: Enero de 2012. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
2. Strecker A. Ueber einige neue bestandtheile der schweinegalle. Annal der Chemie u Pharm 1862;123:353-60.
3. Wurtz A. [Título no disponible]. Annal der Chem u Pharm 1868; 148:116-97.
4. Strecker A. Ueber das lecithin. Annal der Chemie u Pharm 1868;148:77-90.
5. Levene PA. On sphingomyelin II. J Biol Chem 1914;18:453-63.
6. Levene PA. Spingomyelin III. J Biol Chem 1916;24:68-9.
7. Hunt R, Taveau RM. The pharmacological action of certain choline derivatives and new methodology for detecting choline. Br Med J 1906;2:1788-91.
8. Du Vigneaud V, Cohn M, Chandler J et al. The utilization of the methyl group of methionine in the biological synthesis of choline and creatine. J Biol Chem 1941;140:625-41.
9. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. J Biol Chem 1956;222:193-214.
10. Bligh J. The effect of a choline-deficient diet upon the level of free choline in plasma of the rat. J Physiol 1953;120:440-4.
11. Yao ZM, Vance DE. Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient in choline. Biochem Cell Biol 1990;68:552-8.
12. Varela-Moreiras G, Ragel C, Perez de Miguelsanz J. Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. J Am Coll Nutr 1995;14:480-5.
13. Tani H, Suzuki S, Kobayashi M, Kotake Y. The physiological role of choline in guinea pigs. J Nutr 1967;92:317-24.
14. Bremer J, Greenberg D. Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). Biochim Biophys Acta 1961;46:205-16.
15. Savendahl L, Mar MH, Underwood LE, Zeisel SH. Prolonged fasting in humans results in diminished plasma choline concentrations but does not cause liver dysfunction. Am J Clin Nutr 1997;66:622-5.
16. Zeisel SH, Da Costa KA, Franklin PD et al. Choline, an essential nutrient for humans. FASEB J 1991;5:2093-8.



17. Sheard NF, Tayek JA, Bistran BR et al. Plasma choline concentration in humans fed parenterally. *Am J Clin Nutr* 1986;43:219-24.
18. Chawla RK, Wolf DC, Kutner MH, Bonkovsky HL. Choline may be an essential nutrient in malnourished patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1989;97:1514-20.
19. Buchman AL, Dubin M, Jenden D et al. Lecithin increases plasma free choline and decreases hepatic steatosis in long-term total parenteral nutrition patients. *Gastroenterology* 1992;102:1363-70.
20. Buchman AL, Moukarzel A, Jenden DJ et al. Low plasma free choline is prevalent in patients receiving long term parenteral nutrition and is associated with hepatic aminotransferase abnormalities. *Clin Nutr* 1993;12:33-7.
21. Buchman AL, Dubin MD, Moukarzel AA et al. Choline deficiency: A cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* 1995;22:1399-403.
22. da Costa KA, Niculescu MD, Craciunescu CN et al. Choline deficiency increases lymphocyte apoptosis and DNA damage in humans. *Am J Clin Nutr* 2006;84:88-94.
23. Vance DE, Li Z, Jacobs RL. Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology. *J Biol Chem* 2007;282:33237-41.
24. Fischer LM, daCosta KA, Kwok L et al. Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1275-85.
25. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: The National Academies Press, 1998. Disponible en: [www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=6015](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=6015)
26. Garrow TA. Choline. 4th ed. New York: Boca Raton, 2007.
27. Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, Holden JM. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr* 2003;133:1302-7.
28. Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE et al. Dietary patterns, food groups, and nutrients as predictors of plasma choline and betaine in middle-aged and elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1663-9.
29. Patterson KY, Bhagwat SA, Williams JR, Howe JC, Holden JM. USDA database for the choline content of common foods. release two. 2008. Consultado en: Abril de 2012 Disponible en: [www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Choline/Choln02.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Choline/Choln02.pdf).
30. Holmes-McNary MQ, Cheng WL, Mar MH et al. Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 1996;64:572-6.
31. Bjornstad P, Bremer J. In vivo studies on pathways for the biosynthesis of lecithin in the rat. *J Lipid Res* 1966;7:38-45.

32. Zeisel SH, Mar MH, Zhou Z, da Costa KA. Pregnancy and lactation are associated with diminished concentrations of choline and its metabolites in rat liver. *J Nutr* 1995;125:3049-54.
33. Conlay LA, Wurtman RJ, Blusztajn K et al. Decreased plasma choline concentrations in marathon runners. *N Engl J Med* 1986;315:892.
34. Buchman AL, Awal M, Jenden D et al. The effect of lecithin supplementation on plasma choline concentrations during a marathon. *J Am Coll Nutr* 2000;19:768-70.
35. Cheng WL, Holmes-McNary MQ, Mar MH et al. Bioavailability of choline and choline esters from milk in rat pups. *J Nutr Biochem* 1996;7:457-64.
36. Cho E, Zeisel SH, Jacques P et al. Dietary choline and betaine assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma total homocysteine concentration in the framingham offspring study. *Am J Clin Nutr* 2006;83:905-11.
37. Keast DR. Food sources of choline in the diets of U.S. older adults: NHANES, 1999-2004. Washington, DC 2007.
38. Chiuve SE, Giovannucci EL, Hankinson SE et al. The association between betaine and choline intakes and the plasma concentrations of homocysteine in women. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1073-81.
39. Bidulescu A, Chambless LE, Siega-Riz AM et al. Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *BMC Cardiovasc Disord* 2007;7:20.
40. Dalmeijer GW, Olthof MR, Verhoef P et al. Prospective study on dietary intakes of folate, betaine, and choline and cardiovascular disease risk in women. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:386-94.
41. Detopoulou P, Panagiotakos DB, Antonopoulou S et al. Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: The ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:424-30.
42. Zeisel SH. Gene response elements, genetic polymorphisms and epigenetics influence the human dietary requirement for choline. *IUBMB Life* 2007;59:380-7.
43. Veenema K, Solis C, Li R et al. Adequate intake levels of choline are sufficient for preventing elevations in serum markers of liver dysfunction in mexican american men but are not optimal for minimizing plasma total homocysteine increases after a methionine load. *Am J Clin Nutr* 2008;88:685-92.
44. Kohlmeier M, da Costa KA, Fischer LM, Zeisel SH. Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16025-30.
45. Fischer LM, da Costa KA, Kwok L et al. Dietary choline requirements of women: Effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1113-9.

46. da Costa KA, Kozyreva OG, Song J et al. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J* 2006;20:1336-44.
47. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 2009;67:615-23.
48. Okuda T, Haga T, Kanai Y et al. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 2000;3:120-5.
49. O'Regan S, Traiffort E, Ruat M et al. An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1835-40.
50. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:2-9.
51. Tso P, Balint JA. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol* 1986;250:G715-26.
52. Nilsson A, Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J Lipid Res* 2006;47:154-71.
53. Li Z, Vance DE. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res* 2008;49:1187-94.
54. Porter RK, Scott JM, Brand MD. Choline transport into rat liver mitochondria. Characterization and kinetics of a specific transporter. *J Biol Chem* 1992;267:14637-46.
55. Kaplan C, Porter R, Brand M. The choline transporter is the major site of control of choline oxidation in isolated rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1993;321:24-6.
56. O'Donoghue N, Sweeney T, Donagh R et al. Control of choline oxidation in rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1135-9.
57. de Ridder JJ, van Dam K. Control of choline oxidation by rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1975;408:112-22.
58. Cavener DR. GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* 1992;223:811-4.
59. Chern MK, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:561-8.
60. Chern MK, Pietruszko R. Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: Purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochem Cell Biol* 1999;77:179-87.
61. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: Organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1991;81:551-6.

62. Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 1996;271:22831-8.
63. Klee WA, Richards HH, Cantoni GL. The synthesis of methionine by enzymic transmethylation. VII. existence of two separate homocysteine methyltransferases on mammalian liver. *Biochim Biophys Acta* 1961;54:157-64.
64. Garrow TA. Betaine-dependent remethylation. Cambridge University Press, 2001.
65. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1069-75.
66. Ridgway ND, Vance DE. Purification of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* 1987;262:17231-9.
67. Blusztajn JK, Zeisel SH, Wurtman RJ. Synthesis of lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidylethanolamine in bovine brain. *Brain Res* 1979;179:319-27.
68. Johnson PI, Blusztajn JK. Sexually dimorphic activation of liver and brain phosphatidylethanolamine N-methyltransferase by dietary choline deficiency. *Neurochem Res* 1998;23:583-7.
69. Walkey CJ, Yu L, Agellon LB, Vance DE. Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation. *J Biol Chem* 1998;273:27043-6.
70. Michel V, Yuan Z, Ramsuvar S, Bakovic M. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:490-504.
71. Reo NV, Adinezhadeh M, Foy BD. Kinetic analyses of liver phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2002;1580:171-88.
72. Tessitore L, Sesca E, Greco M et al. Sexually differentiated response to choline in choline deficiency and ethionine intoxication. *Int J Exp Pathol* 1995;76:125-9.
73. Noga AA, Vance DE. A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *J Biol Chem* 2003;278:21851-9.
74. Chew TW, Jiang X, Yan J et al. Folate intake, MTHFR genotype, and sex modulate choline metabolism in mice. *J Nutr* 2011;141:1475-81.
75. Resseguie M, Song J, Niculescu MD et al. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB J* 2007;21:2622-32.
76. Resseguie M, da Costa KA, Galanko JA et al. Aberrant estrogen regulation of PEMT results in choline deficiency-associated liver dysfunction. *J Biol Chem* 2011;286:1649-58.

77. Velzing-Aarts FV, Holm PI, Fokkema MR et al. Plasma choline and betaine and their relation to plasma homocysteine in normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1383-9.
78. Ozarda Ilcol Y, Ozbek R, Hamurtekin E, Ulus IH. Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. *J Nutr Biochem* 2005;16:489-99.
79. O'Leary P, Boyne P, Flett P et al. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. *Clin Chem* 1991;37:667-72.
80. Zeisel SH. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr* 2006;26:229-50.
81. Shin OH, Mar MH, Albright CD et al. Methyl-group donors cannot prevent apoptotic death of rat hepatocytes induced by choline-deficiency. *J Cell Biochem* 1997;64:196-208.
82. Holmes-McNary MQ, Loy R, Mar MH et al. Apoptosis is induced by choline deficiency in fetal brain and in PC12 cells. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;101:9-16.
83. Zeisel SH. Choline phospholipids: Signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J* 1993;7:551-7.
84. Li Z, Agellon LB, Vance DE. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *J Biol Chem* 2005;280:37798-802.
85. Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science* 1983;221:614-20.
86. Zeisel SH. Dietary choline: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu Rev Nutr* 1981;1:95-121.
87. Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW. Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos in vitro. *FASEB J* 2002;16:619-21.
88. Shaw GM, Carmichael SL, Yang W et al. Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring. *Am J Epidemiol* 2004;160:102-9.
89. Shaw GM, Finnell RH, Blom HJ et al. Choline and risk of neural tube defects in a folate-fortified population. *Epidemiology* 2009;20:714-9.
90. Zeisel SH. The fetal origins of memory: The role of dietary choline in optimal brain development. *J Pediatr* 2006;149:S131-6.
91. Jones J. Choline availability to the developing rat fetus alters adult hippocampal long-term potentiation. *Dev Brain Res* 1999;118:159-67.
92. Montoya DA, White AM, Williams CL et al. Prenatal choline exposure alters hippocampal responsiveness to cholinergic stimulation in adulthood. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;123:25-32.
93. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.

94. Meck WH, Williams CL. Perinatal choline supplementation increases the threshold for chunking in spatial memory. *Neuroreport* 1997;8:3053-9.
95. Meck WH, Williams CL. Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory. *Neuroreport* 1997;8:2831-5.
96. Niculescu MD, Craciunescu CN, Zeisel SH. Gene expression profiling of choline-deprived neural precursor cells isolated from mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;134:309-22.
97. Zeisel SH, Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr* 1994;14:269-96.
98. Cantoni GL. S-adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Biol Chem* 1953;204:403-16.
99. Eckernas SA, Aquilonius SM. Free choline in human plasma analysed by simple radio-enzymatic procedure: Age distribution and effect of a meal. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:183-7.
100. Zeisel SH, Growdon JH, Wurtman RJ et al. Normal plasma choline responses to ingested lecithin. *Neurology* 1980;30:1226-9.
101. Ozarda Ilcol Y, Uncu G, Ulus IH. Free and phospholipid-bound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns. *Arch Physiol Biochem* 2002;110:393-9.
102. van Wijk N, Watkins CJ, Bohlke M et al. Plasma choline concentration varies with different dietary levels of vitamins B6, B12 and folic acid in rats maintained on choline-adequate diets. *Br J Nutr* 2012;107:1408-12.
103. Abratte CM, Wang W, Li R et al. Choline status is not a reliable indicator of moderate changes in dietary choline consumption in premenopausal women. *J Nutr Biochem* 2009;20:62-9.
104. Abratte CM, Wang W, Li R et al. Folate intake and the MTHFR C677T genotype influence choline status in young mexican american women. *J Nutr Biochem* 2008;19:158-65.
105. Wallace JM, McCormack JM, McNulty H et al. Choline supplementation and measures of choline and betaine status: A randomised, controlled trial in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2012. Publicación electrónica previa a la impresión: doi:10.1017/S000711451100674X.
106. Hung J, Abratte CM, Wang W et al. Ethnicity and folate influence choline status in young women consuming controlled nutrient intakes. *J Am Coll Nutr* 2008;27:253-9.
107. da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH. Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr* 2005;81:440-4.
108. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: A meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.

109. Olthof MR, Brink EJ, Katan MB, Verhoef P. Choline supplemented as phosphatidylcholine decreases fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine concentrations in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2005;82:111-7.
110. Zeisel SH. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. *Mutat Res* 2011. Publicación electrónica previa a la impresión: doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.10.008.
111. Scheibler C. Ueber das betain, eine im safte der zuckerrüben (*beta vulgaris*) vorkommende pflanzenbase. *Berichte deutch chemisch gesellschaft* 1869:292-5.
112. Yancey PH, Clark ME, Hand SC et al. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 1982;217:1214-22.
113. Nolte K, Hanson A, Gage D. Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: Implications for genetic engineering of stress resistance. *J Am Soc Hort Sci* 1997;122:8-13.
114. de Zwart FJ, Slow S, Payne RJ et al. Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. *Food Chem* 2003;83:197-204.
115. Mazzafera P. Trigonelline in coffee. *Phytochemistry* 1991;30:2309-10.
116. Rajasekaran L, Aspinall D, Jones G, Paleg L. Stress metabolism. IX. Effect of salt stress on trigonelline accumulation in tomato. *Can J Plant Sci* 2001;81:487-98.
117. Slow S, Donaggio M, Cressey PJ et al. The betaine content of new zealand foods and estimated intake in the new zealand diet. *J Food Compos Anal* 2005;18:473-85.
118. Craig SA. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 2004;80:539-49.
119. Xu X, Gammon MD, Zeisel SH et al. High intakes of choline and betaine reduce breast cancer mortality in a population-based study. *FASEB J* 2009;23:4022-8.
120. Kowalczyk S, Broer A, Munzinger M et al. Molecular cloning of the mouse IMINO system: An na<sup>+</sup>- and cl<sup>-</sup>-dependent proline transporter. *Biochem J* 2005;386:417-22.
121. Schwahn BC, Hafner D, Hohlfeld T et al. Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. *Br J Clin Pharmacol* 2003;55:6-13.
122. Kempson SA, Montrose MH. Osmotic regulation of renal betaine transport: Transcription and beyond. *Pflugers Arch* 2004;449:227-34.
123. Atkinson W, Elmslie J, Lever M et al. Dietary and supplementary betaine: Acute effects on plasma betaine and homocysteine concentrations under standard and postmethionine load conditions in healthy male subjects. *Am J Clin Nutr* 2008;87:577-85.
124. Wehner F, Olsen H, Tinel H et al. Cell volume regulation: Osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;148:1-80.

125. Petronini PG, De Angelis EM, Borghetti P et al. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem J* 1992;282:69-73.
126. Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM et al. Cloning of a Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem* 1992;267:649-52.
127. Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem* 2010;43:732-44.
128. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
129. Atkinson W, Slow S, Elmslie J et al. Dietary and supplementary betaine: Effects on betaine and homocysteine concentrations in males. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:767-73.
130. Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism* 1993;42:1448-60.
131. Holm PI, Ueland PM, Kvalheim G, Lien EA. Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:286-94.
132. Melse-Boonstra A, Holm PI, Ueland PM et al. Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1378-82.
133. Schwab U, Torronen A, Meririnne E et al. Orally administered betaine has an acute and dose-dependent effect on serum betaine and plasma homocysteine concentrations in healthy humans. *J Nutr* 2006;136:34-8.
134. Holm PI, Hustad S, Ueland PM et al. Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T genotypes and B-vitamin status in a large-scale epidemiological study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1535-41.
135. Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE et al. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *J Nutr* 2008;138:914-20.
136. Lever M, Atkinson W, Slow S et al. Plasma and urine betaine and dimethylglycine variation in healthy young male subjects. *Clin Biochem* 2009;42:706-12.
137. Holm PI, Ueland PM, Vollset SE et al. Betaine and folate status as cooperative determinants of plasma homocysteine in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:379-85.
138. Lever M, Atkinson W, George PM, Chambers ST. Sex differences in the control of plasma concentrations and urinary excretion of glycine betaine in patients attending a lipid disorders clinic. *Clin Biochem* 2007;40:1225-31.



139. Lever M, Sizeland PC, Frampton CM, Chambers ST. Short and long-term variation of plasma glycine betaine concentrations in humans. *Clin Biochem* 2004;37:184-90.
140. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: A meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005;82:806-12.
141. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1567-77.
142. Smolin LA, Benevenga NJ, Berlow S. The use of betaine for the treatment of homocystinuria. *J Pediatr* 1981;99:467-72.
143. Wilcken DE, Wilcken B, Dudman NP, Tyrrell PA. Homocystinuria--the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Engl J Med* 1983;309:448-53.
144. Brouwer IA, Verhoef P, Urgert R. Betaine supplementation and plasma homocysteine in healthy volunteers. *Arch Intern Med* 2000;160:2546-7.
145. Schwab U, Torronen A, Toppinen L et al. Betaine supplementation decreases plasma homocysteine concentrations but does not affect body weight, body composition, or resting energy expenditure in human subjects. *Am J Clin Nutr* 2002;76:961-7.
146. Alfthan G, Tapani K, Nissinen K et al. The effect of low doses of betaine on plasma homocysteine in healthy volunteers. *Br J Nutr* 2004;92:665-9.
147. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 2003;133:1291-5.
148. Olthof MR, van Vliet T, Boelsma E, Verhoef P. Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 2003;133:4135-8.
149. Olthof MR, Verhoef P. Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health. *Curr Drug Metab* 2005;6:15-22.
150. Yue B, Pattison E, Roberts WL et al. Choline in whole blood and plasma: Sample preparation and stability. *Clin Chem* 2008;54:590-3.
151. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: An overview. *J Nutr* 2006;136:1636S-40S.
152. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:S40-4.
153. Mudd SH, Brosnan JT, Brosnan ME et al. Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. *Am J Clin Nutr* 2007;85:19-25.

154. Hsu DW, Lin MJ, Lee TL et al. Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9751-6.
155. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002;132:2333S-5S.
156. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
157. MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E947-55.
158. Carmel R, Jacobsen DW. Homocysteine in health and disease. First ed. Cambridge (United Kingdom): University of Cambridge, 2001.
159. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL et al. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999;100:1161-8.
160. Oh KJ, Churchich JE. Binding of pyridoxal 5-phosphate to cystathionase. *J Biol Chem* 1973;248:7370-5.
161. Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995;56:1324-33.
162. Tsai MY, Yang F, Bignell M et al. Relation between plasma homocysteine concentration, the 844ins68 variant of the cystathionine beta-synthase gene, and pyridoxal-5'-phosphate concentration. *Mol Genet Metab* 1999;67:352-6.
163. Tsai MY, Bignell M, Yang F et al. 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.
164. Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM et al. Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Hum Mutat* 2007;28:856-65.
165. Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997;66:269-313.
166. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
167. Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency?. *Am J Clin Nutr* 2009;89:693S-6S.
168. West AA, Caudill MA. Genetic variation: Impact on folate (and choline) bioefficacy. *Int J Vitam Nutr Res* 2010;80:319-29.

169. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
170. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P et al. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359-65.
171. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14853-8.
172. Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40:619-25.
173. Salat-Batlle J. Tesis doctoral: Factors metabòlics i genètics en la regulació de l'estat en cobalamina, en la població adulta i durant l'embaràs. 2012.
174. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
175. Yang QH, Botto LD, Gallagher M et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: Findings from the third national health and nutrition examination survey DNA bank. *Am J Clin Nutr* 2008;88:232-46.
176. Klerk M, Verhoef P, Clarke R et al. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.
177. Wilson A, Platt R, Wu Q 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.
178. Leclerc D, Wilson A, Dumas R 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.
179. Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS et al. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:197-200.
180. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-6.
181. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S et al. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur J Hum Genet* 2003;11:671-8.
182. 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.
183. Janosikova B, Pavlikova M, Kocmanova D et al. Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* 2003;79:167-75.
184. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM et al. MTRR and MTHFR polymorphism: Link to down syndrome?. *Am J Med Genet* 2002;107:151-5.
185. Evans JC, Huddler DP, Jiracek J et al. Betaine-homocysteine methyltransferase: Zinc in a distorted barrel. *Structure* 2002;10:1159-71.
186. Millian NS, Garrow TA. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:93-8.
187. Szegedi SS, Garrow TA. Oligomerization is required for betaine-homocysteine S-methyltransferase function. *Arch Biochem Biophys* 2004;426:32-42.
188. Park EI, Garrow TA. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. *J Biol Chem* 1999;274:7816-24.
189. Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI et al. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:171-4.
190. Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL et al. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: CDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* 2000;70:66-73.
191. Li F, Feng Q, Lee C et al. Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: Common gene sequence variation and functional characterization. *Mol Genet Metab* 2008;94:326-35.
192. Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 1998;47:1967-70.
193. Wang JA, Dudman NP, Lynch J, Wilcken DE. Betaine:Homocysteine methyltransferase--a new assay for the liver enzyme and its absence from human skin fibroblasts and peripheral blood lymphocytes. *Clin Chim Acta* 1991;204:239-49.
194. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. distribution of homocysteine between competing pathways.. *J Biol Chem* 1984;259:9508-13.
195. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *J Nutr* 1983;113:519-21.
196. Castro C, Breksa AP,3rd, Salisbury EM, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase transcription is inhibited by S-adenosylmethionine. Bethesda, MD: Kluwer Academic, 2002.

197. Collinsova M, Strakova J, Jiracek J, Garrow TA. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice. *J Nutr* 2006;136:1493-7.
198. Teng YW, Mehedint MG, Garrow TA, Zeisel SH. Deletion of betaine-homocysteine s-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol Chem* 2011;286:36258-67.
199. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986;261:1582-7.
200. Chmurzynska A, Malinowska AM. Homocysteine homeostasis in the rat is maintained by compensatory changes in cystathionine beta-synthase, betaine-homocysteine methyltransferase, and phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene transcription occurring in response to maternal protein and folic acid intake during pregnancy and fat intake after weaning. *Nutr Res* 2011;31:572-8.
201. Sullivan LW, Herbert V. Suppression hematopoiesis by ethanol. *J Clin Invest* 1964;43:2048-62.
202. Horne DW, Briggs WT, Wagner C. Ethanol stimulates 5-methyltetrahydrofolate accumulation in isolated rat liver cells. *Biochem Pharmacol* 1978;27:2069-74.
203. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Betaine, ethanol, and the liver: A review. *Alcohol* 1996;13:395-8.
204. Fridman O, Morales AV, Bortoni LE et al. Corticoadrenal activity in rat regulates betaine-homocysteine S-methyltransferase expression with opposite effects in liver and kidney. *J Biosci* 2012;37:115-23.
205. Ratnam S, Wijekoon EP, Hall B et al. Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E933-9.
206. Breksa AP, Garrow TA. Recombinant human liver betaine-homocysteine S-methyltransferase: Identification of three cysteine residues critical for zinc binding. *Biochemistry* 1999;38:13991-8.
207. Hu Y, Chen E, Mu Y et al. BHMT gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate in a chinese population. *Biomed Environ Sci* 2011;24:89-93.
208. Weisberg IS, Park E, Ballman KV et al. Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003;167:205-14.
209. Ananth CV, Elsasser DA, Kinzler WL et al. Polymorphisms in methionine synthase reductase and betaine-homocysteine S-methyltransferase genes: Risk of placental abruption. *Mol Genet Metab* 2007;91:104-10.
210. Heil SG, Lievers KJ, Boers GH et al. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans. *Mol Genet Metab* 2000;71:511-9.

211. Mostowska A, Myka M, Lianeri M et al. Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. *Clin Biochem* 2011; 44:596-600.
212. Morin I, Platt R, Weisberg I et al. Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *Am J Med Genet A* 2003;119A:172-6.
213. Koushik A, Kraft P, Fuchs CS et al. Nonsynonymous polymorphisms in genes in the one-carbon metabolism pathway and associations with colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2408-17.
214. Friesen RW, Novak EM, Hasman D, Innis SM. Relationship of dimethylglycine, choline, and betaine with oxoproline in plasma of pregnant women and their newborn infants. *J Nutr* 2007;137:2641-6.
215. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:219-25.
216. Lee JE, Jacques PF, Dougherty L et al. Are dietary choline and betaine intakes determinants of total homocysteine concentration? *Am J Clin Nutr* 2010;91:1303-10.
217. Holm PI, Bleie O, Ueland PM et al. Betaine as a determinant of postmethionine load total plasma homocysteine before and after B-vitamin supplementation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:301-7.
218. Lever M, George PM, Dellow WJ et al. Homocysteine, glycine betaine, and N,N-dimethylglycine in patients attending a lipid clinic. *Metabolism* 2005;54:1-14.
219. Eussen SJ, Ueland PM, Clarke R et al. The association of betaine, homocysteine and related metabolites with cognitive function in dutch elderly people. *Br J Nutr* 2007;98:960-8.
220. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S et al. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;81:147-53.
221. Caudill MA. Folate and choline interrelationships: Metabolic and potential health implications. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.
222. Wheeler S. Assessment and interpretation of micronutrient status during pregnancy. *Proc Nutr Soc* 2008;67:437-50.
223. Lund CJ, Donovan JC. Blood volume during pregnancy. significance of plasma and red cell volumes. *Am J Obstet Gynecol* 1967;98:394-403.
224. Hytten F. Blood volume changes in normal pregnancy. *Clin Haematol* 1985;14:601-12.
225. Fall CH, Yajnik CS, Rao S et al. Micronutrients and fetal growth. *J Nutr* 2003;133:1747S-56S.
226. Milman N, Bergholt T, Byg KE et al. Reference intervals for haematological variables during normal pregnancy and postpartum in 434 healthy danish women. *Eur J Haematol* 2007;79:39-46.

227. Sweiry JH, Yudilevich DL. Characterization of choline transport at maternal and fetal interfaces of the perfused guinea-pig placenta. *J Physiol* 1985;366:251-66.
228. Milman N, Byg KE, Hvas AM et al. Erythrocyte folate, plasma folate and plasma homocysteine during normal pregnancy and postpartum: A longitudinal study comprising 404 danish women. *Eur J Haematol* 2006;76:200-5.
229. Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM 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.
230. Yan J, Jiang X, West AA et al. Maternal choline intake modulates maternal and fetal biomarkers of choline metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1060-71.
231. Molloy AM, Mills JL, Cox C et al. Choline and homocysteine interrelations in umbilical cord and maternal plasma at delivery. *Am J Clin Nutr* 2005;82:836-42.
232. Braekke K, Ueland PM, Harsem NK et al. Homocysteine, cysteine, and related metabolites in maternal and fetal plasma in preeclampsia. *Pediatr Res* 2007;62:319-24.
233. Zeisel SH, Niculescu MD. Perinatal choline influences brain structure and function. *Nutr Rev* 2006;64:197-203.
234. Badovinac RL, Werler MM, Williams PL et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79:8-15.
235. Federal Register. Food standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid; clarification 1996. Consultado en: Febrero de 2012 Disponible en: <https://www.federalregister.gov/articles/1996/09/05/96-22606/food-standards-amendment-of-standards-of-identity-for-enriched-grain-products-to-require-addition-of>.
236. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: A meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A:952-60.
237. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P et al. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet* 2010;47:809-15.
238. Meck WH, Williams CL. Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats. *Neuroreport* 1997;8:3045-51.
239. Tees RC, Mohammadi E. The effects of neonatal choline dietary supplementation on adult spatial and configural learning and memory in rats. *Dev Psychobiol* 1999;35:226-40.
240. Signore C, Ueland PM, Troendle J, Mills JL. Choline concentrations in human maternal and cord blood and intelligence at 5 y of age. *Am J Clin Nutr* 2008;87:896-902.
241. Villamor E, Rifas-Shiman SL, Gillman MW, Oken E. Maternal intake of methyl-donor nutrients and child cognition at 3 years of age. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26:328-35.

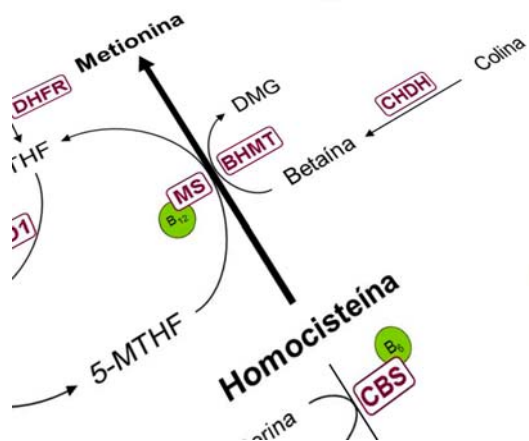
242. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Ramos R et al. Effects of prenatal fish-oil and 5-methyltetrahydrofolate supplementation on cognitive development of children at 6.5 y of age. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1880S-8S.
243. Rohlfis EM, Garner SC, Mar MH, Zeisel SH. Glycerophosphocholine and phosphocholine are the major choline metabolites in rat milk. *J Nutr* 1993;123:1762-8.
244. Chao CK, Pomfret EA, Zeisel SH. Uptake of choline by rat mammary-gland epithelial cells. *Biochem J* 1988;254:33-8.
245. Solanky N, Requena Jimenez A, D'Souza SW et al. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 2010;31:134-43.
246. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-32.
247. Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: A risk factor for the development of nonsevere preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:391,4; discussion 394-6.
248. Dodds L, Fell DB, Dooley KC et al. Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem* 2008;54:326-34.
249. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
250. Murphy MM, Scott JM, Arija V et al. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 2004;50:1406-12.
251. Infante-Rivard C, Rivard GE, Gauthier R, Theoret Y. Unexpected relationship between plasma homocysteine and intrauterine growth restriction. *Clin Chem* 2003;49:1476-82.
252. Gadhok AK, Sinha M, Khunteta R et al. Serum homocysteine level and its association with folic acid and vitamin B12 in the third trimester of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *Clin Lab* 2011;57:933-8.
253. Infante-Rivard C, Rivard GE, Yotov WV et al. Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. 2003;347:19-25.
254. Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D et al. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in chinese women. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1385-91.
255. 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.



256. Holmes VA, Wallace JM, Alexander HD et al. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin Chem* 2005;51:629-34.
257. Willoughby ML, Jewell FG. Folate status throughout pregnancy and in postpartum period. *Br Med J* 1968;4:356-60.
258. Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;25:66-7.
259. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. Protocol de seguiment de l'embaràs a catalunya. 2a edició revisada.2006.
260. Shenkin SD, Starr JM, Deary IJ. Birth weight and cognitive ability in childhood: A systematic review. *Psychol Bull* 2004;130:989-1013.
261. Lawlor DA, Ronalds G, Clark H et al. Birth weight is inversely associated with incident coronary heart disease and stroke among individuals born in the 1950s: Findings from the aberdeen children of the 1950s prospective cohort study. *Circulation* 2005;112:1414-8.
262. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990;301:259-62.
263. Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J et al. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000;133:176-82.
264. Wilcox AJ. On the importance--and the unimportance--of birthweight. *Int J Epidemiol* 2001;30:1233-41.
265. Zeitlin J, Mohangoo A, Cuttini M et al. The european perinatal health report: Comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in europe. *J Epidemiol Community Health* 2009;63:681-2.
266. Ruegger C, Hegglin M, Adams M, Bucher HU. Population based trends in mortality, morbidity and treatment for very preterm- and very low birth weight infants over 12 years. *BMC Pediatr* 2012;12:17.
267. Cavalle-Busquets P, Ballesteros M, Fernandez-Ballart JD et al. Elevated tHcy during early pregnancy increases the risk of impaired placental vascular function and of intrauterine growth retardation. Lisboa (Portugal) ed. 2011.
268. Wallace JM, Bonham MP, Strain J et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the seychelles child development study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:391-7.
269. Onalan R, Onalan G, Gunenc Z, Karabulut E. Combining 2nd-trimester maternal serum homocysteine levels and uterine artery doppler for prediction of preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest* 2006;61:142-8.

270. World Medical Association. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. 2011. Consultado en: Diciembre de 2011 Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>.
271. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. La medición de la clase social en ciencias de la salud. Barcelona: SG Editores, 1995.
272. Bevitel. Assessment of nutritional status by vitamin markers. 2010. Consultado en: Enero de 2012 Disponible en: <http://www.bevital.no/>.
273. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993;39:263-71.
274. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43-53.
275. Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates.. *J Clin Pathol* 1991;44:592-5.
276. 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.
277. Ueland PM, Middtun O, Windelberg A et al. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1737-45.
278. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996;18:188-204.
279. Middtun O, 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.
280. SRNT Subcommittee on Biochemical Verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob Res* 2002;4:149-59.
281. 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.
282. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. Enquesta de salut de catalunya 2011 (ESCAc). 2012. Consultado en: Junio de 2012. Disponible en: <http://www20.gencat.cat/portal/site/salut/menuitem.f33aa5d2647ce0dbe23ffed3b0c0e1a0/?vgnnextoid=0eae131afa762310VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=0eae131afa762310VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnnextfmt=default>.

283. Faupel-Badger JM, Hsieh CC, Troisi R et al. Plasma volume expansion in pregnancy: Implications for biomarkers in population studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1720-3.
284. Antony AC. In utero physiology: Role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr* 2007;85:598S-603S.
285. Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985;5:115-41.
286. Smulders YM, Smith DE, Kok RM et al. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: A case for the methylfolate trap. *Br J Haematol* 2006;132:623-9.
287. Welsch F, Wenger WC, Stedman DB. Choline metabolism in placenta: Evidence for the biosynthesis of phosphatidylcholine in microsomes via the methylation pathway. *Placenta* 1981;2:211-21.
288. Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S 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.
289. Cleal JK, Lewis RM. The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human fetus. *J Neuroendocrinol* 2008;20:419-26.
290. Ronzoni S, Marconi AM, Cetin I et al. Umbilical amino acid uptake at increasing maternal amino acid concentrations: Effect of a maternal amino acid infusate. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:477-83.
291. Ubeda N, Reyes L, Gonzalez-Medina A et al. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: A longitudinal study in spain. *Nutrition* 2011;27:925-30.
292. 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.
293. Metz J, McGrath K, Bennett M et al. Biochemical indices of vitamin B12 nutrition in pregnant patients with subnormal serum vitamin B12 levels. *Am J Hematol* 1995;48:251-5.
294. Malinow MR, Rajkovic A, Duell PB et al. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:228-33.
295. Davies SEC, Woolf DA, Chalmers RA, Rafter JEM. Proton nmr studies of betaine excretion in the human neonate: Consequences for choline and methyl group supply. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1992;3:523.
296. Yang EK, Blusztajn JK, Pomfret EA, Zeisel SH. Rat and human mammary tissue can synthesize choline moiety via the methylation of phosphatidylethanolamine. *Biochem J* 1988;256:821-8.
297. Monsen AL, Schneede J, Ueland PM. Mid-trimester amniotic fluid methionine concentrations: a predictor of birth weight and length. *Metabolism* 2006;55:1186-91.



---

# APORTACIONES CIENTÍFICAS

---



## APORTACIONES CIENTÍFICAS

### CONGRESOS

Salat-Batlle J, Murphy MM, Cavallé-Pusquets P, Albaigés G, Berrocal-Zaragoza MI, **Fernández-Roig S**, Ueland PM, Midttun Ø, Fernandez-Ballart JD. Fluctuations in cobalamin status indicators during pregnancy and cord cobalamin status. 7<sup>th</sup> International Conference on homocysteine metabolism. Prague (Czech Republic). 2009.

Berrocal-Zaragoza MI, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Salat-Batlle J, **Fernández-Roig S**, Ueland PM, Midttun Ø, Quadros EV, Sequeira JM., Fernandez-Ballart JD. Maternal and cord blood folate status are not impaired by folate receptor autoantibody presence during pregnancy and in the cord. 7<sup>th</sup> International Conference on homocysteine metabolism. Prague (Czech Republic).2009

Murphy MM, Berrocal-Zaragoza MI, Cavallé-Busquets P, Salat-Batlle J, **Fernández-Roig S**, EV Quadros, Fernandez-Ballart JD. Investigation of the association between folate receptor autoantibody presence during pregnancy and in the cord with maternal and cord folate status. 3<sup>rd</sup> International Symposium - New frontiers in obesity and nutrition. La Toja – Pontevedra (España). 2009

**Fernández-Roig S**, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, Salat-Batlle J, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD. Comparison of two methods of measuring maternal-foetal exposition to tobacco during pregnancy and its relationship with birth weight. 3<sup>rd</sup> International Symposium - New frontiers in obesity and nutrition. La Toja – Pontevedra (España). 2009

Murphy MM, Salat-Batlle J, Cavallé-Busquets J, **Fernández-Roig S**, Berrocal-Zaragoza MI, Ueland PM, Bjørke Monsen AL, Ballesteros M, Fernandez-Ballart JD. Nutritional, genetic and lifestyle factors have different effects on fluctuations in plasma total cobalamin and holotranscobalamin (holoTC) concentrations during pregnancy. FASEB-SRC – Folic acid, cobalamin and one carbon metabolism. Carefree (Arizona, United States) 2010.

Salat-Batlle J, Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, Fernandez-Ballart JD, **Fernández-Roig S**, Ueland PM, Meyer K, Fredriksen Å, Midttun Ø, Murphy MM. Pregnancy cobalamin status is impaired in the presence of the MTRR524C>T polymorphism but not the TCII776C>G polymorphism. 8th International Conference on homocysteine metabolism. Lisboa (Portugal).2011

Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, Fernandez-Ballart JD, Salat-Batlle J, García-Minguillán CJ, **Fernández-Roig S**, Ueland PM, Meyer K, Fredriksen Å, Midttun Ø, Murphy MM. Elevated tHcy during early pregnancy increases the risk of impaired placental vascular function and of intrauterine growth retardation. 8th International Conference on homocysteine metabolism. Lisboa (Portugal).2011

Murphy M, Garcia-Minguillan CJ, Cavallé-Busquets P, **Fernández-Roig S**, Bueno O, Ueland PM, Meyer K, Ballesteros M, Salat-Batlle J, Berrocal-Zaragoza MI, Fernandez-Ballart JD. Low riboflavin (B<sub>2</sub>) status is associated with higher homocysteine during pregnancy and is a risk factor for gestational hypertension in a longitudinal study. FASEB-SRC – Folic acid, cobalamin and one carbon metabolism. Crete (Grecia) 2012.

## ESTANCIA PREDOCTORAL

Enero – Abril 2011: Estancia predoctoral al laboratorio de Biología Molecular que dirige el profesor Edward V. Quadros en el SUNY (State University of New York) – Downstate Medical Center de Brooklyn en Nueva York. Financiado por: CiberObn (Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03)) - Instituto de Salud Carlos III.

### Participación en las líneas de investigación:

- E88del mutation in Cbl receptor and Cbl-MMA relationship, during pregnancy.
- DNA methylation in cobalamin deficient mice.

### Publicación:

**Fernández-Roig S**, Lai SH, Murphy MM, Fernandez-Ballart J, Quadros EV. Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCblR/CD320 knockout Mouse. Nutr Metab 2012;May 18;9(1):41.

## PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

Miembro del grupo **RETIC**: Alimentación saludable en la prevención primaria de enfermedades crónicas: la red PREDIMED – (NODO NURETA). **Centro de adscripción**: Fundación Privada *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*. **Entidad financiadora**: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Convocatoria RETIC–Centros de Investigación Biomédica en Red. **Referencia de la concesión**: RD06/0045/0001. **Duración**: desde 2007 hasta 2010. **Investigador/a principal**: Dr. Jordi Salas-Salvadó.

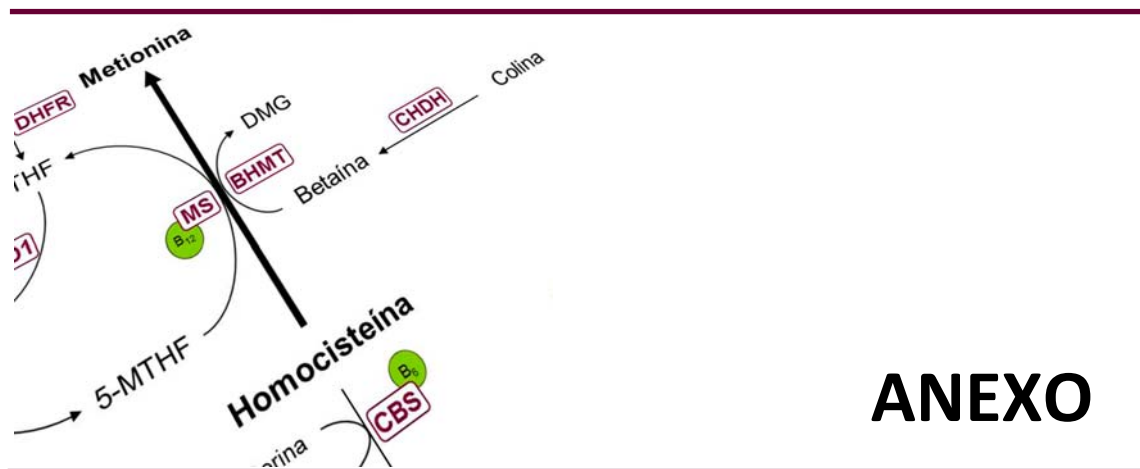
Miembro de grupo **CIBERobn** – Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03). **Centre adscripción**: Fundación Privada *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*. **Entidad financiadora**: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Convocatoria CIBER–Centros de Investigación Biomédica en Red. **Referencia de la concesión**: CB07/03/2004. **Duración**: desde 2009 hasta a - **Investigador/a principal**: Dr. Jordi Salas-Salvadó.

Miembro de grupo de Investigación consolidado – Generalitat de Catalunya (Expediente 2009/SGR/1237) **GRUPO**: NUTRCRSM – *Nutrició, Alimentació, Creixement i Salut Mental*. **Centro de adscripción**: Fundación Privada *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*. **Duración**: desde 2009 hasta 2013. **Investigador/a principal**: Dr. Jordi Salas-Salvadó.

Miembro del proyecto: Contribución de la capacidad de metilación paterna y materna a la función vascular placentaria y el desarrollo fetal. **Entidad financiadora**: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) FIS. **Referencia de la concesión**: 10/00335. **Duración**: desde 2011 hasta a 2014. **Investigador/a principal**: Michelle Murphy.







**ANEXO**



## ENCUESTA 1 SOBRE HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA

ANOTE LAS RESPUESTAS EN LOS ESPACIOS CORRESPONDIENTES A CADA PREGUNTA.  
 Estos datos servirán a la Universitat Rovira i Virgili para realizar un estudio comparativo entre diferentes poblaciones. En los resultados nunca aparecerá su nombre.

### USO DE SUPLEMENTOS DE VITAMINAS / MINERALES

Por diferentes motivos, los suplementos de vitaminas y minerales recomendados no se toman siempre: por olvido, por sentimiento de que no son necesarios, por no encontrarse bien, porque dan molestias, etc. Por favor, conteste sinceramente estas preguntas para ayudarnos a valorar la realidad del uso de los suplementos.

- ¿Ha tomado por iniciativa propia o recetado por un médico algún tipo de suplemento vitamínico / mineral?

**Nunca he tomado**       **Si he tomado**

En el caso que si, escriba el nombre del preparado e indique las veces a la semana que lo ha tomado marcando el cuadrado. Marque el cuadrado correspondiente a los meses que lo ha tomado.

**Ejemplo**, una mujer que ha tomado cada día FOLIDOCE durante los primeros 3 meses, escribiría:

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

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

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

- ¿Tomó hierro en los 3 meses antes de quedarse embarazada?      **Sí**       **No**

## DESAYUNO (durante el embarazo)

	Sí	No
¿Tiene la costumbre de desayunar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Desayuna cereales inflados habitualmente (p.ej. tipo Kelloggs / Nestlé etc) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Toma café con cafeína?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Toma café descafeinado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## TABACO

- ¿Es fumadora pasiva (expuesta al humo habitualmente en casa o en el trabajo) ?  
 Sí  No
- ¿Es fumadora activa?  
 Sí  No

Sólo para fumadoras en los últimos 5 años

	0 cigs/día	1-5 cigs/día	6-10 cigs/día	> 10 cigs/día
Actualmente fumo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fumaba durante los 12 meses antes del embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
He dejado durante el embarazo durante los meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## ALCOHOL

	Nunca / Ocasionalmente	< 3 copes / setmana	Cada día como aperitivo y/o con las comidas	> 7 copas / semana
Actualmente bebo alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En los 12 meses antes del embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
He dejado de beber alcohol durante el embarazo durante los meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- ¿Ha tomado algún otro tipo de sustancia tóxica (p.ej. marihuana, cocaína, heroína, etc...) en los últimos 5 años?

Sí  No

En el caso de que sí haya tomado alguna sustancia tóxica, especifique cuales:

	Ocasionalmente	Regularmente
Actualmente tomo sustancias tóxicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En los 12 meses antes del embarazo tomaba sustancias tóxicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
Lo he dejado durante el embarazo durante los meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### **ACTIVIDAD FÍSICA (durante el embarazo)**

- ¿Qué actividad física hace en el trabajo, estudio o trabajo de casa?

- Mi trabajo es básicamente de estar sentada y caminar poco (estudiante, docente, conductora de vehículos, dependienta, administrativa).....

- En mi trabajo ando bastante pero no hago ningún esfuerzo vigoroso (ama de casa, fábrica, vendedora, carterera).....

- Mi trabajo es básicamente de mucha actividad física (deportista).....

- ¿Qué actividad hace en el tiempo libre?

*Si varía con la estación, escoger el grupo más representativo (sólo 1 grupo).*

- Lectura, televisión y actividades que no requieran actividad física importante.....

- Caminar, ir en bicicleta, jardinería (no se incluye el transporte de ir y volver del trabajo).....

- Correr, esquiar, gimnástica, juegos de pelota o deportes vigorosos regularmente.....

- Entrenamiento deportivo regular para competición.....

- ¿Cuántas veces por semana realiza las actividades referidas en la pregunta anterior?

\_\_\_\_\_

- Durante los últimos 12 meses

	Nunca	Esporádicamente	Habitualmente
¿Ha tenido la costumbre de tomar el Sol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## PLANIFICACIÓN DEL EMBARAZO

- ¿Ha buscado / planificado este embarazo? Sí  No
- Durante los 6 meses antes del embarazo

	Ninguno	DIU	Anticonceptivos orales	Pegados anticonceptivos	Anillo vaginal	Preservativo
¿Que método anticonceptivo ha utilizado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- ¿Ciclos sin tomar anticonceptivos antes del embarazo? \_\_\_\_\_  
 (Número de reglas desde que dejó de tomar anticonceptivos hasta que se quedó embarazada)

## DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

- Cual es su trabajo actual y que nivel de estudios ha completado

	Mare	Pare
Trabajo actual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nivel de estudios	Primarios sin finalizar	<input type="checkbox"/>
	Primarios (ESO, EGB,...)	<input type="checkbox"/>
	Secundarios (BUP, Bachillerato, FP,...)	<input type="checkbox"/>
	Superiores (Universitarios)	<input type="checkbox"/>
	No aplicable (Familia monoparental)	<input type="checkbox"/>

- Numero de personas que forman la unidad familiar \_\_\_\_\_
- Ingresos netos anuales totales en el hogar

**Ejemplo**, si la mujer tiene un sueldo de 20000 €, el hombre uno de 18000€ y hay un abuelo que vive con la familia i recibe una pensión de 6000 €

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

Menos de 9000 €	>9000 € - 19000 €	>19000 € - 25000 €	>25000 € - 35000 €	Más de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anote cualquier duda relacionada con esta encuesta:



## ENCUESTA 2 SOBRE HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA

ANOTE LAS RESPUESTAS EN LOS ESPACIOS CORRESPONDIENTES A CADA PREGUNTA.

Estos datos servirán a la Universitat Rovira i Virgili para realizar un estudio comparativo entre diferentes poblaciones. En los resultados nunca aparecerá su nombre.

### USO DE SUPLEMENTOS DE VITAMINAS / MINERALES

Por diferentes motivos, los suplementos de vitaminas y minerales recomendados no se toman siempre: por olvido, por sentimiento de que no son necesarios, por no encontrarse bien, porque dan molestias, etc. Por favor, conteste sinceramente estas preguntas para ayudarnos a valorar la realidad del seguimiento de los suplementos.

- ¿Ha tomado por iniciativa propia o recetado por un médico algún tipo de suplemento vitamínico / mineral?

**Nunca he tomado**  **Si he tomado**

En el caso que sí, escriba el nombre del preparado e indique las veces a la semana que lo ha tomado. Rellene el cuadrado correspondiente a los meses del embarazo que lo ha tomado.

**Ejemplo**, una mujer que ha tomado la mayoría de los días FERPLEX durante los meses 6, 7, 8 y 9, escribiría:

Nombre del preparado	¿Cuántas veces a la semana?	Meses del embarazo			
		6	7	8	9
<b>HIERRO</b> ¿Cuál?: FERPLEX	<input type="checkbox"/> Cada día <input checked="" type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces) <input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Nombre del preparado	¿Cuántas veces a la semana?	Meses del embarazo			
		6	7	8	9
<b>HIERRO</b> ¿Cuál?: _____	<input type="checkbox"/> Cada día <input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces) <input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>ÁCIDO FÓLICO</b> ¿Cuál?: _____	<input type="checkbox"/> Cada día <input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces) <input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>MULTI-VITAMINAS</b> ¿Cuál?: _____	<input type="checkbox"/> Cada día <input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces) <input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Si ha dejado de tomar el hierro, ¿cuál ha sido el motivo o motivos?

- Olvido  Le causaba molestias  
 No el consideraba muy importante para la salud  Otros (especificar) \_\_\_\_\_

## DESAYUNO (durante el embarazo)

	Sí	No
¿Tiene la costumbre de desayunar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Desayuna cereales inflados habitualmente (p.ej. tipo Kelloggs / Nestlé etc) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Toma café con cafeína?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Toma café descafeinado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## TABACO

- ¿Es fumadora pasiva (expuesta al humo habitualmente en casa o en el trabajo)?  
 Sí  No
- ¿Es fumadora activa?  
 Sí  No

## Sólo para fumadoras en los últimos 5 años

	0 cigs/día	1-5 cigs/día	6-10 cigs/día	> 10 cigs/día
Actualmente fumo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fumaba durante los 12 meses antes del embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
Ha dejado de fumar durante el embarazo durante los meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## ALCOHOL

	Nunca / Ocasionalmente	< 3 copas / semana	Cada día como aperitivo y/o con las comidas	> 7 copas / semana
Actualmente bebe alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En los 12 meses antes del embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
Ha dejado de beber alcohol durante el embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- ¿Ha tomado algún otro tipo de sustancia tóxica (p.ej. marihuana, cocaína, etc...) en los últimos 5 años?

Sí  No

En el caso de que sí haya tomado alguna sustancia tóxica, especifique cuales:

	Ocasionalmente	Regularmente
Actualmente toma sustancias tóxicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En los 12 meses antes del embarazo tomaba sustancias tóxicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Antes de los 3 meses	Entre los 3 y los 6 meses	Después de los 6 meses
Lo ha dejado durante el embarazo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**ACTIVIDAD FÍSICA (durante el embarazo)**

- ¿Qué actividad física hace en el trabajo, estudio o trabajo de casa?

- Mi trabajo es básicamente de estar sentada y caminar poco (estudiante, docente, conductora de vehículos, dependienta, administrativa).....
- En mi trabajo ando bastante pero no hago ningún esfuerzo vigoroso (ama de casa, fábrica, agricultora, vendedora, cartera.....).....
- Mi trabajo es básicamente de mucha actividad física (deportista).....

- ¿Qué actividad hace en el tiempo libre?

*Si varía con la estación, escoger el grupo más representativo (sólo 1 grupo).*

- Lectura, televisión y actividades que no requieran actividad física importante.....
- Caminar, ir en bicicleta, jardinería (no se incluye el transporte de ir y volver del trabajo).....
- Correr, esquiar, gimnástica, juegos de pelota o deportes vigorosos regularmente.....
- Entrenamiento deportivo regular para competición.....

- ¿Cuántas veces por semana realiza las actividades referidas en la pregunta anterior?

\_\_\_\_\_

- Durante los últimos 12 meses

	Nunca	Esporádicamente	Habitualmente
¿Ha tenido la costumbre de tomar el Sol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS (SOLO SI NO SE DISPONE DE LA ENCUESTA 1)**

- Cual es su trabajo actual y que nivel de estudios ha completado

	Mare	Pare
Trabajo actual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nivel de estudios	Primarios sin finalizar <input type="checkbox"/>	Primarios sin finalizar <input type="checkbox"/>
	Primarios (ESO, EGB,...) <input type="checkbox"/>	Primarios (ESO, EGB,...) <input type="checkbox"/>
	Secundarios (BUP, Bachillerato, FP,...) <input type="checkbox"/>	Secundarios (BUP, Bachillerato, FP,...) <input type="checkbox"/>
	Superiores (Universitarios) <input type="checkbox"/>	Superiores (Universitarios) <input type="checkbox"/>
	No aplicable (Familia monoparental) <input type="checkbox"/>	No aplicable (Familia monoparental) <input type="checkbox"/>

- Numero de personas que forman la unidad familiar \_\_\_\_\_
- Ingresos netos anuales totales en el hogar

**Ejemplo**, si la mujer tiene un sueldo de 20000 €, el hombre uno de 18000€ y hay un abuelo que vive con la familia i recibe una pensió de 6000 €

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

Menos de 9000 €	>9000 € - 19000 €	>19000 € - 25000 €	>25000 € - 35000 €	Más de 35000 €
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anote cualquier duda relacionada con esta encuesta: