



REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES

Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo

Dipòsit Legal: T.187-2014

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

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

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

Carlos Jesús García-Minguillán del Campo

**REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL
ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B₂ E
INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA
METIONINA EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y
EN GESTANTES**

TESIS DOCTORAL

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

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus 2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



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

HACEN CONSTAR:

Que este trabajo titulado “Regulaciónb genético-ambiental del estado nutricional de la vitamina B₂ e influencia sobre el ciclo de la metionina en una población adulta y en gestantes” que presenta Carlos Jesús García-Minguillán del Campo 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.

Dra. Michelle M. Murphy

Prof. Joan D. Fernandez-Ballart

Reus, 15 de julio de 2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

*“Que la comida sea tu alimento y el alimento
tu medicina”*

Hipócrates

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

RESUMEN

La riboflavina o vitamina B₂ tiene un papel principal en una amplia gama de reacciones biológicas de oxidación-reducción y es de gran relevancia en el metabolismo monocarbonado, que es un proceso crucial para el intercambio de un carbono en el que participan dos ciclos inter-dependientes: el ciclo de los folatos, que actúa como donador o receptor en unidades de un carbono y el ciclo de la metionina que interviene en la vía de remetilación de la homocisteína a metionina. Dos enzimas claves en este ciclo son la MTHFR y MTRR, que son dependientes de B₂. Un biomarcador del correcto funcionamiento del metabolismo monocarbonado es la homocisteína.

El embarazo tiene una gran influencia sobre la concentración de la homocisteína total plasmática (tHcy) de dos maneras: la tHcy se ve reducida observándose su mínimo en el segundo trimestre del embarazo y es un estado fisiológico en el que se produce una demanda extra en los nutrientes implicados en el metabolismo monocarbonado, como es el caso del folato, las vitaminas B₁₂ y B₂.

Los principales objetivos de esta tesis son investigar cómo el estado en B₂ y folato afecta a la asociación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy y como el estado en B₂ y B₁₂ afecta a la asociación entre los polimorfismos *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T y la tHcy en tres grupos distintos: 1) en una muestra representativa de una población adulta no expuesta a suplementos vitamínicos del tipo B ni a la fortificación obligatoria con ácido fólico, 2) una muestra de mujeres en edad fértil no embarazadas no expuesta a suplementos vitamínicos del tipo B ni a la fortificación obligatoria con ácido fólico y 3) un estudio longitudinal de embarazo (NutCIR).

En los tres grupos el ser homocigótico para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T se asoció con una mayor tHcy y un menor folato eritrocitario. Cuando se estudió la tHcy según el estado en B₂ en función del genotipo se observó que un peor estado en B₂ se asociaba con una mayor tHcy en los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T. Al estudiar el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático y la B₂ eritrocitaria se observó que

un peor estado en B₂ se asociaba con una mayor tHcy a pesar de presentar un estado alto en folato.

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy en función del estado en B₂ se observó que los participantes portadores del alelo mutante G presentaban una mayor tHcy cuando se encontraban en un estado alto en B₂. Este efecto se veía agravado cuando el estado en B₁₂ era bajo.

Al estudiar el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy en función del estado en B₂ eritrocitaria, un mejor estado en B₂ se asociaba con una menor tHcy en los portadores del alelo mutante T, a excepción del estudio NUTCIR. Estos resultados se veían acentuados cuando el estado en B₁₂ era alto.

A modo de resumen se podría concluir que: el estado en B₂ modifica el efecto de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy de manera diferente según el estado en folato o B₁₂.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Michelle M. Murphy, con la que aprendí la importancia de ser estricto y meticuloso en todo momento, y al Prof. Joan D. Fernandez-Ballart, gracias al cual me introduje en el mundo de la estadística y el uso del SPSS, por confiar en mí para que formara parte de su equipo y por dirigirme en esta tesis doctoral en la Unidad de Medicina Preventiva i Salud Pública.

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, Ramón Miralles, Gerard Albaigès y Mónica Ballesteros.

Al personal del laboratorio central, a las auxiliares y enfermeras de extracciones del *Hospital Universitari Sant Joan de Reus*, en especial a Isabel por estar siempre dispuesta a echar una mano sin esperar nada a cambio, lo que nos facilitó muchísimo la vida, especialmente cuando se cambió el hospital de ubicación.

Al personal del laboratorio de investigación del *Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona* y del Biobanco - *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*, en especial a Lidia con la que hice la transformación de "pollastret" a niño mimado del *Biobanc* y con las que tenía unas conversaciones muy entretenidas sobre fútbol, en especial del Barça.

Al Dr. Ceruelo del CAP de Morell y a la Dra. Ríos del CAP de Cambrils sin la colaboración de los cuales no habría sido posible realizar el estudio poblacional.

A las colaboraciones con BeVital de Bergen (Prof. Per Ueland) y Trinity College de Dublín (Prof. Scott y la Prof. Molloy) y a sus sabios consejos sobre el enfoque de los análisis estadísticos.

A todos los participantes de los estudios HOMFOL y GENUP y las mujeres embarazadas del estudio NutCIR ya que sin su participación altruista este trabajo no hubiera sido posible.

Al financiamiento de:

- Instituto de Salud Carlos III, FIS: PI 00/0954; 02/1131; 03/0870; 10/00335
- CIBERobn [Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB07/03/2004)]
- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España: SAF: 2005-05096
- Italfarmaco (2005-2008)
- AGAUR: 2009 SGR 1237
- *Institut de Investigació Sanitària Pere i Virgili: 2010/IISPV/21*

A mis compañeros de trabajo de campo Silvia, Olalla y Pol con los que he compartido buenos y malos momentos.

A la doctora Judith Salat-Batlle con la que pude contar desde el primer día y ayudó a calmar más de una vez a la fiera que llevo dentro y a la doctora Maribel Berrocal-Zaragoza con la que congenié desde el primer momento y terminó la faena empezada por Judith.

A Patricia con la que sorprendentemente nació una buena amistad, a pesar del poco tiempo que estuvo en la universidad y con la que podía desconectar del trabajo entre bocado y bocado.

Finalmente dar las gracias a mis padres por apoyarme en mis decisiones a pesar de no entender muy bien este mundo y Alicia, mi incordio particular, por aguantarme a las buenas y a las malas y por estar dispuesta a dejarlo todo por apoyarme en mis aspiraciones de futuro.

Tabla de contenido

Índice de tablas	16
Índice de figuras y gráficas	18
Abreviaturas	21
Nomenclatura de enzimas	22
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Generalidades sobre la vitamina B ₂	25
1.1.1. Descubrimiento y características	25
1.1.2. Funciones enzimáticas	27
1.1.3. Fuentes y requerimientos	28
1.1.4. Técnicas de valoración del estado nutricional en riboflavina	29
1.1.4.1. Métodos microbiológicos	30
1.1.4.2. Métodos fluorimétricos	30
1.1.4.3. Métodos cromatográficos	30
1.1.4.4. Electroforesis capilar	31
1.1.4.5. Métodos funcionales	31
1.1.5. Deficiencia	33
1.2. Metabolismo monocarbonado	35
1.2.1. Folato	35
1.2.2. Cobalamina	38
1.2.3. Vitamina B ₂	39
1.2.4. Vitamina B ₆	40
1.2.5. Homocisteína	41
1.2.6. MTHFR	45
1.2.6.1. <i>MTHFR</i> 677 C>T	46

1.2.6.2. <i>MTHFR</i> 1024 A>C	51
1.2.7. MTRR	53
1.3. Embarazo	55
1.4. Resumen de la situación actual en el campo y aportaciones de esta tesis	57
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
3. MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.1. Participantes	66
3.1.1. Estudio poblacional	66
3.1.2. Estudio longitudinal en una muestra de gestantes (NutCIR)	68
3.2. Procesado y análisis de muestra	70
3.2.1. Lavado y separación de eritrocitos	71
3.2.2. Obtención de leucocitos	72
3.2.3. Extracción del ADN	72
3.2.4. Determinaciones bioquímicas y genéticas	73
3.2.4.1. Determinación de homocisteína	73
3.2.4.2. Determinación de folato plasmático y eritrocitario	74
3.2.4.3. Determinación de cobalamina	74
3.2.4.4. Determinación de creatinina	74
3.2.4.5. Determinación de EGRAC	75
3.2.4.6. Determinación de EGOTAC	77
3.2.4.7. Determinación genética	78
3.3. Métodos estadísticos	79
3.3.1. Estudio poblacional	79
3.3.2. Mujeres en edad fértil no embarazadas y no suplementadas con vitaminas del grupo B	83
3.3.3. Estudio longitudinal en una muestra de gestantes (NutCIR)	87

4. ESTUDIO TRANSVERSAL EN UNA POBLACIÓN ADULTA NO SUPLEMENTADA CON VITAMINAS DEL GRUPO B	93
4.1. Resultados	95
4.1.1. Estado en riboflavina de la población	101
4.1.2. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	103
4.1.3. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	106
4.1.4. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	108
4.2. Discusión	113
4.2.1. Estado en riboflavina de la población	118
4.2.2. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	120
4.2.3. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	123
4.2.4. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	124
5. MUJERES EN EDAD FÉRTIL NO EMBARAZADAS Y NO SUPLEMENTADAS CON VITAMINAS DEL GRUPO B	127
5.1. Resultados	129
5.1.1. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	136
5.1.2. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	138
5.1.3. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	140
5.2. Discusión	144
5.2.1. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	147
5.2.2. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	149
5.2.3. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	150

6. ESTUDIO LONGITUDINAL EN UNA MUESTRA DE GESTANTES (NutCIR)	153
6.1. Resultados	155
6.1.1. Evolución del estado en riboflavina durante el embarazo	163
6.1.2. Evolución de la THcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina eritrocitaria	165
6.1.3. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	167
6.1.4. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	172
6.1.5. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	176
6.2. Discusión	181
6.2.1. Evolución del estado en riboflavina durante el embarazo	185
6.2.2. Evolución de la THcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina eritrocitaria	187
6.2.3. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria	188
6.2.4. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos	191
6.2.5. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos	192
7. DISCUSIÓN GLOBAL	197
7.1. <i>MTHFR</i> 677 C>T	200
7.2. <i>MTRR</i> 66 A>G	202
7.3. <i>MTRR</i> 524 C>T	202
8. CONCLUSIONES	207
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213
10. APORTACIONES CIENTÍFICAS	231
10.1. Congresos	231
10.1.1. Pósters	231
10.1.2. Presentaciones orales	232

10.2. Participaciones en proyectos	233
ANEXOS	235
Anexo 1. Encuestas del estudio NutCIR	237
A1.1. Encuesta de hábitos y estilo de vida de las 20 SG	237
A1.2. Encuesta de hábitos y estilo de vida de las 32 SG	241
A1.3. Encuesta de frecuencia de consumo alimentario 1	245
A1.4. Encuesta de frecuencia de consumo alimentario 2	248
Anexo 2. Representación esquemática del procesado de las muestras	252
Anexo 3. Soluciones para el procesado de muestras	253
A3.1. Ácido ascórbico	253
A3.2. Suero fisiológico	253
A3.3. Solución de hemólisis	253
A3.4. Solución de buffer de fosfatos	253
Anexo 4. Preparación de las muestras control	254
Anexo 5. Soluciones para la determinación de EGRAC	255
A5.1. Solución tampón fosfato 0,25 M	255
A5.2. Flavín adenín dinucleótido	255
A5.3. Nicotinamida adenina dinucleótido	256
A5.4. Glutación	256

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Momentos claves en el descubrimiento de la riboflavina	25
Tabla 2. Contenido en riboflavina de algunos alimentos	28
Tabla 3. Ingesta recomendada de riboflavina según sexo y grupo de edad y estado fisiológico	29
Tabla 4. Resumen de la situación actual y aportaciones de esta tesis	57
Tabla 5. Características de la muestra de la población adulta (n = 771).....	97
Tabla 6. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según sexo y edad.....	98
Tabla 7. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según genotipo	99
Tabla 8. Distribución de los genotipos.....	101
Tabla 9. Comportamiento de la tHcy según <i>MTHFR</i> 677 C>T y estado en riboflavina eritrocitaria y folato plasmático	109
Tabla 10. Comportamiento de la tHcy según <i>MTRR</i> 66 A>G y estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática	110
Tabla 11. Comportamiento tHcy según <i>MTRR</i> 524 C>T y estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática	111
Tabla 12. Características de la muestra.....	132
Tabla 13. Distribución de los genotipos.....	133
Tabla 14. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según genotipo en mujeres en edad fértil no embarazadas	135
Tabla 15. Características de las participantes y sus embarazos.....	160
Tabla 16. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según <i>MTHFR</i> 677 C>T	162
Tabla 17. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según <i>MTRR</i> 66 A>G.....	163
Tabla 18. Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según <i>MTRR</i> 524 C>T	164

Tabla 19. Distribución de los genotipos..... 165

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Estructura de la riboflavina y sus coenzimas	26
Figura 2. Metabolismo monocarbonado.....	37
Figura 3. Diseño del reclutamiento de los participantes en el estudio poblacional... 66	
Figura 4. Diseño del reclutamiento de las participantes en el estudio NutCIR..... 68	
Figura 5. Diseño del estudio NutCIR..... 68	
Figura 6. Esquema de obtención de las diferentes fracciones sanguíneas y las distintas determinaciones bioquímicas obtenidas a partir del tubo con EDTA-K ₃ 70	
Figura 7. Representación esquemática de la ubicación de las muestras, los reactivos y los controles en el COBAS	75

Estudio transversal en una población adulta no suplementada con vitaminas del grupo B

Gráfica 1. Estado en riboflavina según sexo	102
Gráfica 2. Estado en riboflavina según el sexo y el grupo de edad.....	102
Gráfica 3. Efecto de <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria.	104
Gráfica 4. Efecto de <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria	104
Gráfica 5. Efecto de <i>MTRR</i> 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria.	105
Gráfica 6. Efecto de <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en folato plasmático.....	106
Gráfica 7. Efecto de <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática.....	107
Gráfica 8. Efecto de <i>MTRR</i> 524 C>T sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática.....	108

Mujeres en edad fértil no embarazadas y no suplementadas con vitaminas del grupo B

Gráfica 9. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria.	136
Gráfica 10. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria.....	137
Gráfica 11. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria.....	138
Gráfica 12. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en folato plasmático.....	139
Gráfica 13. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática	139
Gráfica 14. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática	140
Gráfica 15. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y folato plasmático.....	141
Gráfica 16. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática.....	142
Gráfica 17. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática.....	143

Estudio longitudinal en una muestra de gestantes (NutCIR)

Gráfica 18. Evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo	166
Gráfica 19. Efecto de la concentración de folato plasmático a <12 SG sobre el EGRAC a lo largo del embarazo	167
Gráfica 20. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina.....	168
Gráfica 21. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina según el estado en folato plasmático al inicio del embarazo.	169

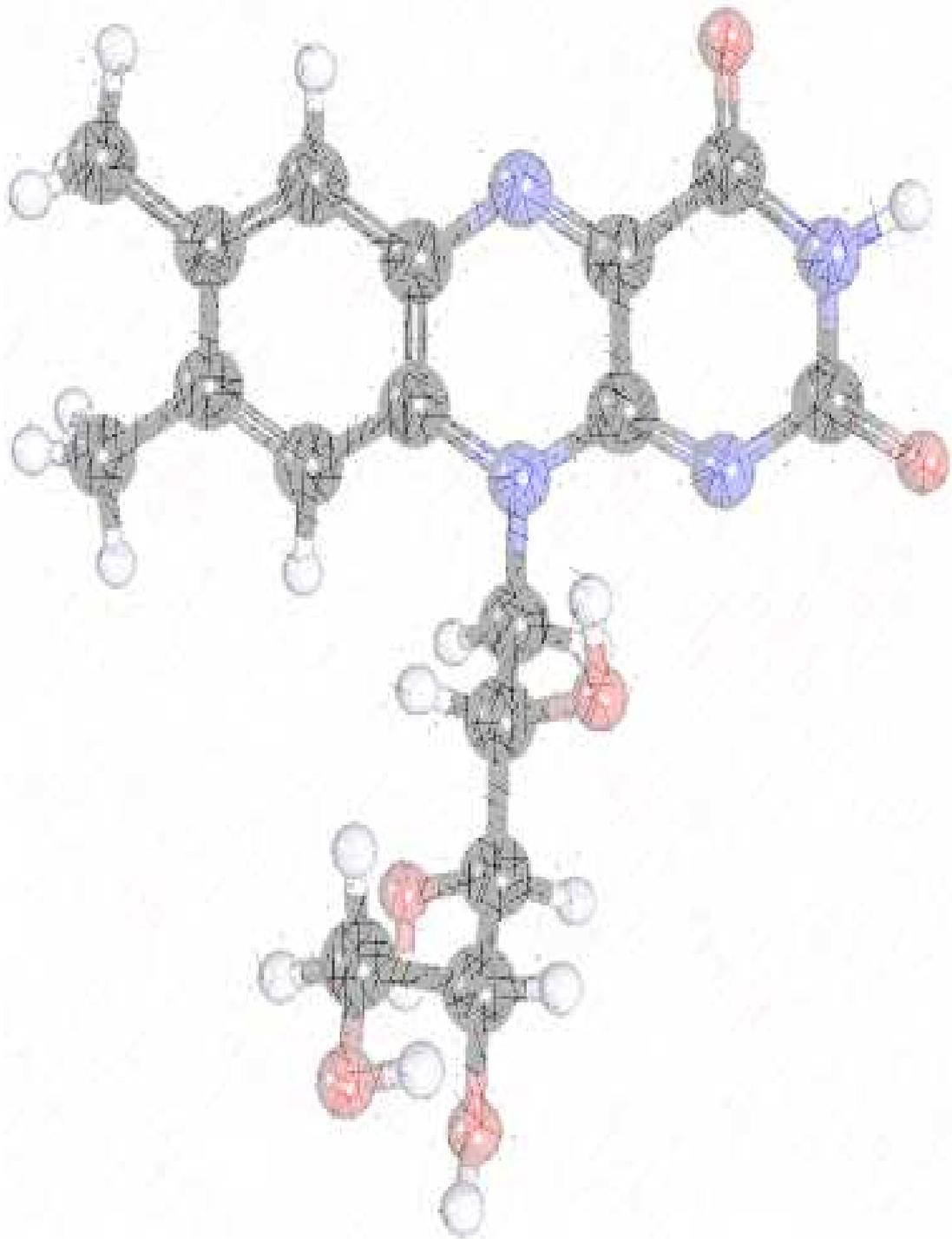
Gràfica 22. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo	171
Gràfica 23. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G sobre tHcy según riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo.....	172
Gràfica 24. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 524 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo sobre tHcy.....	173
Gràfica 25. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T según estado en folato plasmático al inicio del embarazo y a las 24–27 SG sobre tHcy	175
Gràfica 26. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G según estado en cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy	176
Gràfica 27. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para <i>MTRR</i> 524 C>T según estado en cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy	177
Gràfica 28. Efecto de ser homocigótica para <i>MTHFR</i> 677 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo y folato plasmático al inicio del embarazo y a las 24–27 SG sobre tHcy.....	180
Gràfica 29. Efecto de ser homocigótica y heterocigótica para <i>MTRR</i> 66 A>G según estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy	181
Gràfica 30. Efecto de ser homocigótica y heterocigótica para <i>MTRR</i> 524 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy	182

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CH ₂ THF	5,10-metilentetrahidrofolato
CH ₃ THF	5-metiltetrahidrofolato
EC	Electroforesis capilar
EDTA-K ₃	Ácido etilendiamintetraacético tripotásico
EGOTAC	Coficiente de activación de la glutamato-oxalacetato transaminasa eritrocitaria
EGRAC	Coficiente de activación de la glutatión reductasa eritrocitaria
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GSH	Glutatión bisulfito
GSSG	Glutatión
Hcy	Homocisteína
HPLC	Cromatografía de alta eficacia o alta resolución
ILE	Interrupción legal del embarazo
IMC	Índice de masa corporal
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NutCir	Nutrición y crecimiento intrauterino retardado
PBS	Solución buffer de fosfatos
SAH	S-Adenosilhomocisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SEGO	Sociedad española de ginecología y obstetricia
THcy	Concentración de homocisteína total plasmática en ayunas
THF	Tetrahidrofolato

NOMENCLATURA DE ENZIMAS

Nomenclatura de enzimas		
Nomenclatura	EC	Nombre de la enzima
MDH	1.1.1.37	Malato deshidrogenasa
Succinato deshidrogenasa	1.3.5.1	Succinato deshidrogenasa
MAO	1.4.3.4	Monoamino oxidasa
MTHFR	1.5.1.20	Metilentetrahidrofolato reductasa
LDP-Glc	1.8.1.4	Dihidrolipoil deshidrogenasa
GSH reductasa	1.8.1.7	Glutation reductasa
MTRR	1.16.1.8	Metionina sintasa reductasa
Xantina oxidasa	1.17.3.2	Xantina oxidasa
MT	2.1.1	Metil transferasa
BHMT	2.1.1.5	Betaina-homocisteina metiltransferasa
MS	2.1.1.13	Metionina sintasa
GNMT	2.1.1.20	Glicina N-metiltransferasa
SHMT	2.1.2.1	Serina hidroximetiltransferasa
MAT	2.5.1.6	Metionina adenosiltransferasa
GOT	2.6.1.1	Glutamato-oxalacetato transaminasa
RFK	2.7.1.26	Riboflavoquinasa
FADS	2.7.7.2	FAD sintasa
AdoHcyasa	3.3.1.1	Adenosilhomocisteinasa
CBS	4.2.1.22	Cistationina β -sintasa
Cistationasa	4.4.1.1	Cistationina γ -liasa



INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

1.1. GENERALIDADES SOBRE LA VITAMINA B₂

1.1.1. Descubrimiento y características

Desde 1879 se conocía la existencia de un pigmento amarillo aislado de la leche por Alexander Wynter Blyth, al que se denominó lactocromo pero no fue hasta el siglo XX que se pudo determinar la composición química y sus propiedades. En 1926 Goldberger y colaboradores demostraron que la pelagra se asociaba con la falta de vitaminas y denominaron a ese pigmento amarillo, térmicamente estable, factor antipelagra. Un año más tarde, en 1927, el *British Committee on Accesory Food Factors* definió la vitamina B₂ como el componente más termoestable del factor antipelagra. En 1933 la riboflavina, o vitamina B₂, fue aislada por varios grupos y recibió un nombre u otro dependiendo del origen lactoflavina (leche), ovoflavina (huevo), hepatoflavina (hígado) y uroflavina (orina). Un año antes en 1932 Warburg y Christian en Alemania descubrieron la llamada enzima amarilla de la levadura, que era esencial para la respiración celular y que resultó ser la riboflavina⁽¹⁾.

Pocos años más tarde, en 1937, Theorell descubrió la estructura de una coenzima de la riboflavina, la flavin mononucleótido (FMN) y un año más tarde en 1938 Warburg y Christian aislaron el grupo prostético más abundante el flavin adenino dinucleótido (FAD)⁽²⁾.

Tabla 1. Momentos claves en el descubrimiento de la riboflavina

Año	Investigador	Observación
1879	Blyth	Aislamiento de la leche del lactocromo
1926	Goldberger	Se relacionó el factor amarillo con la pelagra, y se denominó factor antipelagra
1932	Warburg & Christian	Descubren la llamada enzima amarilla de la levadura
1933	Varios	Varios grupos aíslan la B ₂ de diferentes fuentes
1937	Theorell	Descubre la estructura de la FMN
1938	Warburg & Christian	Descubren la estructura de la FAD

La riboflavina o vitamina B₂ o 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil)isoaloxazina es una vitamina hidrosoluble. El grupo 5'-hydroximetil de la cadena lateral ribitil es el que reacciona para formar un éster ortofosfato en el caso de FMN, este éster puede alargarse, para formar una estructura más compleja conocida como FAD (figura 1).

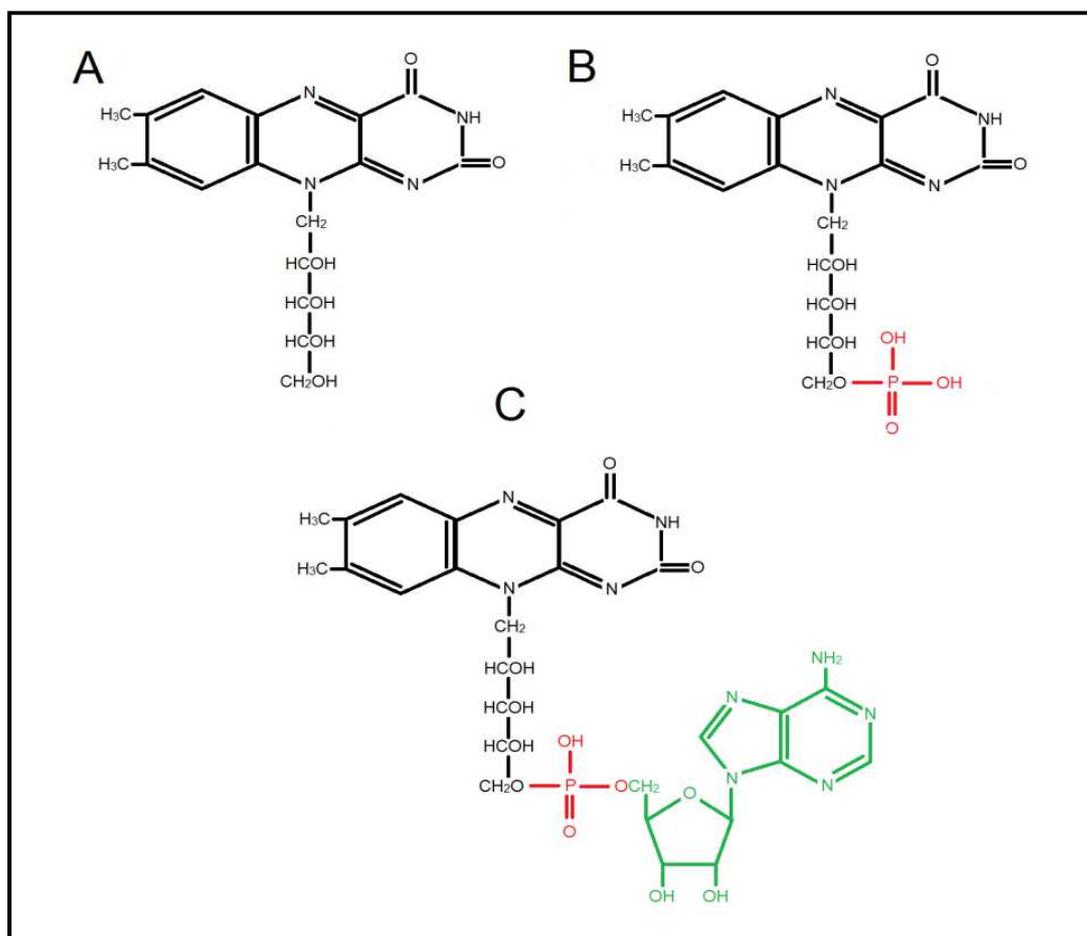


Figura 1. Estructura de la riboflavina y sus coenzimas. A: riboflavina, B: FMN, C: FAD.

El paso de riboflavina a FMN se lleva a cabo mediante la flavoquinasa o ATP:riboflavin 5'-fosfotransferasa (EC 2.7.1.26) que se encuentra en el citosuelo y en niveles más elevados en el hígado y en intestino⁽³⁾. La enzima que cataliza el paso de FMN a FAD es la FAD sintasa o ATP:FMN adenililtransferasa (EC 2.7.7.2) que se encuentra también situada principalmente en el citosuelo⁽⁴⁾.

1.1.2. Funciones enzimáticas

La riboflavina, mediante sus formas biológicamente activas FMN y FAD actuando como coenzimas, tiene un papel principal en una amplia gama de reacciones biológicas de oxidación-reducción.

Las flavinas pueden actuar como agentes oxidantes gracias a su capacidad de aceptar un par de átomos de hidrogeno y participar en la producción de energía en la cadena respiratoria. La succinato deshidrogenasa es una flavoproteína ligada a la membrana interna mitocondrial, que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones y que se encarga del paso de succinato a fumarato⁽⁵⁾ y la hidrolipoil deshidrogenasa, que es una flavoproteína, forma parte del complejo enzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa que cataliza la reacción de 2-oxoglutarato a succinil-CoA y dióxido de carbono, la quinta reacción del ciclo de Krebs⁽⁶⁾.

La riboflavina también tiene un papel antioxidante mediante el glutatión y el ácido úrico.

La glutatión reductasa es una enzima dependiente de FAD que participa en las reacciones de óxido-reducción del glutatión, un agente protector del organismo contra las especies reactivas de oxígeno⁽⁷⁾.

El ácido úrico es uno de los antioxidantes solubles más efectivos y la xantina oxidasa, una enzima dependiente de FAD, es la que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico. Esta enzima juega también un papel importante en el catabolismo de purinas^(8, 9).

La monoamino oxidasa (MAO), otra flavoproteína, es una oxidorreductasa que participa en el catabolismo de la serotonina, adrenalina y la noradrenalina⁽¹⁰⁾.

La riboflavina también participa en la fosforilación de las formas inactivas de vitamina B₆ a su forma activa la piridoxal fosfato (PLP)⁽¹¹⁾.

También tiene un papel primordial en el metabolismo monocarbonado. Este papel de la riboflavina es en el que se centrará esta tesis y se explica con más detalle en el apartado 1.2.

1.1.3. Fuentes y requerimientos

La mejor fuente de riboflavina son las levaduras. La leche y los productos lácteos, las semillas y el germen de los cereales, los músculos de los animales (sobre todo las vísceras), el pescado y los huevos también son buenas fuentes⁽¹²⁾.

La leche, los productos lácteos y las carnes son la principal fuente de riboflavina en las dietas occidentales⁽¹³⁾. También las frutas y los vegetales son una fuente moderada de riboflavina aunque su consumo por sí solo no es suficiente para cubrir todas las necesidades.

En la tabla 2 se puede observar el contenido en riboflavina de algunos alimentos.

Tabla 2. Contenido en riboflavina de algunos alimentos⁽¹²⁾

Alimento	mg de B₂/ 100 g.	Alimento	mg de B₂/ 100 g.
Leche entera	0,18	Espinacas hervidas	0,24
Huevo fresco	0,44	Brócoli hervido	0,12
Carne de ternera	0,18 – 0,24	Manzana sin piel	0,03
Hígado de ternera	3,42	Naranja	0,04
Carne de cerdo	0,17 – 0,27	Almendras	0,81
Hígado de pollo	2,00	Vino tinto	0,03
Atún	0,12	Cerveza	0,02
Queso camembert	0,49	Levadura para pastel	5,47

Se considera que la ingesta mínima recomendada es de 1,2 mg/día en adultos. En mujeres embarazadas a medida que avanza el embarazo los requerimientos de riboflavina aumentan. En el periodo de lactancia también aumentan los

requerimientos⁽¹⁴⁾. En la tabla 3 se puede observar la ingesta diaria recomendada según sexo y grupo de edad y estado fisiológico.

Tabla 3. Ingesta recomendada de riboflavina según sexo y grupo de edad y estado fisiológico⁽¹⁴⁾

	Edad (años)	B₂ (mg/día)
Hombres	9 – 13	0,9
	14 – 18	1,3
	>18 – 70	1,3
	> 70	1,3
Mujeres	9 – 13	0,9
	14 – 18	1,0
	>18 – 70	1,1
	> 70	1,1
Embarazo		1,4
Lactancia		1,6

En los alimentos la riboflavina se encuentra principalmente en forma de FAD, aunque también hay pequeñas cantidades de FMN y de riboflavina libre. Las formas esterificadas son hidrolizadas por fosfatasas no específicas a riboflavina libre antes de ser absorbidas en el intestino delgado proximal por un sistema facilitado saturable⁽¹³⁾. Una vez absorbida la riboflavina se vuelve a fosforilar para formar FMN y FAD que son las formas principales de riboflavina en el plasma y en los tejidos⁽¹⁵⁾.

1.1.4. Técnicas de valoración del estado nutricional en riboflavina

A continuación se describirán brevemente los métodos más habituales para la evaluación del estado nutricional en riboflavina.

1.1.4.1 Métodos microbiológicos

El *Lactobacillus casei* es el organismo más adecuado para la determinación de la concentración de riboflavina. Antes de proceder a la incubación se tienen que liberar las flavinas y eliminar los ácidos grasos. La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 18 horas. La concentración se determina mediante turbidimetría⁽¹⁶⁾.

La turbidimetría es una técnica que presenta una alta sensibilidad pero es inespecífica.

1.1.4.2 Métodos fluorimétricos

La fluorimetría determina la cantidad de luz que desprende una sustancia fluorescente en solución bajo la acción de luz ultravioleta, o de cualquier otra longitud de onda.

Para llevar a cabo la fluorimetría es necesario tratar las muestras previamente con ácido tricloroacético para separar las flavinas de las proteínas. Posteriormente, el FAD se hidroliza a FMN. Se realiza la lectura de la fluorescencia antes y después de añadir hidrosulfito sódico para eliminar interferencias⁽¹⁷⁾.

La fluorimetría al igual que los métodos microbiológicos es un método que presenta una alta sensibilidad pero es inespecífico.

1.1.4.3 Métodos cromatográficos

La cromatografía de alta eficacia o de alta resolución (HPLC) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Hoy en día son los métodos más utilizados ya que permiten tanto la separación como la cuantificación de la riboflavina y sus coenzimas en todo tipo de substratos (sangre, orina, alimentos, medicamentos, etc.).

Se han desarrollado varios métodos para determinar la riboflavina o sus coenzimas mediante HPLC aunque la más utilizada es la de fase reversa⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

1.1.4.4 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación que se basa en la diferente relación masa/carga de las moléculas. La separación se lleva a cabo en un tubo de menos de 50 µm de diámetro, de ahí que reciba el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene las moléculas a separar y el tampón que conduce la corriente.

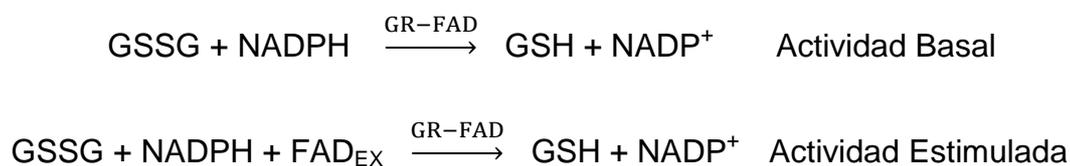
Recientemente se han desarrollado un método de EC acoplado a un detector de fluorescencia inducida por láser capaz de determinar la riboflavina y sus coenzimas a muy bajas concentraciones⁽²¹⁾.

En comparación con la HPLC tiene la ventaja que requiere menos cantidad de muestra, menor tiempo de separación, se obtiene una mejor resolución y el consumo de solventes orgánicos es inferior⁽²²⁾.

1.1.4.5 Métodos funcionales

El coeficiente de activación de la glutatión reductasa eritrocitaria o EGRAC por sus siglas en inglés es un método para determinar el estado funcional en riboflavina.

El EGRAC es un método funcional que consiste en la reducción de la glutatión oxidada (GSSG) a su forma reducida (GSH) mediante la glutatión reductasa [GR (EC 1.8.1.7)] que tiene FAD como cofactor. El NADPH se oxida a NADP⁺ y se monitoriza a 340 nm. El EGRAC se calcula como la actividad de la GR estimulada con su grupo prostético FAD (actividad estimulada) dividida por la actividad sin FAD exógeno (actividad basal)⁽²³⁾.



Si el valor de EGRAC es 1 quiere decir que el enzima está saturado y valores más elevados de EGRAC implica que es necesario FAD exógeno para saturar la enzima. Hecho que indica un peor estado en riboflavina.

El punto de corte con el que se tendría que definir el estado de deficiencia en riboflavina no se ha definido de una forma estricta con criterios funcionales y esto implica que se utilicen diferentes puntos de corte según qué criterio se siga.

Según el criterio clásico propuesto por McCormick se considera que valores de EGRAC superiores a 1,4 corresponden a deficiencia de riboflavina, los valores entre 1,2 y 1,4 son considerados borderline y los valores de EGRAC inferiores a 1,2 son los que corresponden a los estados óptimos de riboflavina⁽¹⁵⁾. Pero últimamente se ha propuesto en varios estudios como punto de corte para definir el estado de deficiencia en riboflavina $EGRAC > 1,3$ ⁽²⁴⁻²⁷⁾ e incluso se han publicado estudios donde se considera que valores de $EGRAC > 1,2$ se corresponden con una deficiencia en riboflavina⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Sería recomendable definir un punto de corte unificado basado en criterios funcionales para así poder comparar más adecuadamente los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

Nosotros para la realización de esta tesis doctoral hemos decidido aplicar el criterio clásico propuesto por McCormick ya que nos permite diferenciar entre un estado de deficiencia en riboflavina y un estado borderline.

Para realizar la determinación de EGRAC es necesario un tratamiento previo de la muestra en fresco lo que hace que se tenga que tener previsto en el diseño de la obtención de muestras del estudio. El EGRAC se determina en eritrocitos lavados. Para obtener los eritrocitos una vez separado el plasma sanguíneo de la fracción restante de eritrocitos y leucocitos se depositan los eritrocitos en suero fisiológico y se centrifuga en frío. Este proceso de lavado se tiene que repetir varias veces. Una vez terminado el proceso de lavado los eritrocitos se diluyen y lisan en agua Mili-Q (relación 1/5) y se conservan a -80°C . Todo este proceso se tiene que realizar sobre hielo.

El hecho que este proceso requiera que se tenga que tener previsto de antemano en el diseño del estudio y que la preparación de la muestra sea mucho más laboriosa y requiera más tiempo que en otros métodos como HPLC o EC hace que este método sea menos utilizado.

Se ha decidido utilizar este método porque a pesar de ser más lenta y más laboriosa la preparación de la muestra tiene como ventaja que es un indicador del estado funcional en riboflavina de los tejidos. Al tratarse de muestras eritrocitarias implica que los resultados sean indicativos del estado en riboflavina a más largo término y reflejan mejor el estado en riboflavina ya que no son tan fluctuantes como los obtenidos en plasma. El EGRAC es un buen indicador estado de saturación en riboflavina de los tejidos a excepción de cuando se presenta deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una anomalía poco frecuente en España (0,1% - 0,5% de la población) ⁽³¹⁾. En esta anomalía la glutatión reductasa está saturada con FAD independientemente del estado en riboflavina ⁽³²⁾.

Todo esto hace que algunos autores definan a los valores de EGRAC como un *gold standard*.

Los pasos para llevar a cabo este método se explican detalladamente en el apartado 3.2.4.5 de materiales y métodos.

1.1.5. Deficiencia

En algunas especies animales la riboflavina es sintetizada por enterobacterias, pero en el humano esta síntesis no es suficiente para cubrir las necesidades diarias.

La deficiencia clínica de riboflavina es muy poco frecuente y se conoce como arriboflavinosis y es más habitual en países en vía de desarrollo con ingestas bajas en carnes y en otros alimentos básicos de consumo diario ⁽³³⁾.

Los síntomas de la arriboflavinosis son pocos específicos y aparecen sólo después de tres o cuatro meses de carencia de riboflavina y se asocian con estomatitis angular, que ocasiona grietas en la piel que se irradian desde la boca y algunas veces se extienden hasta la membrana mucosa y con queilosis. Las lesiones pueden ser rojas e inflamadas o secas y cicatrizadas. A veces, también se desarrolla glositis, o inflamación de la lengua, que comporta una atrofia papilar y la denominada lengua magenta. Anormalidades oculares como enrojecimiento, fotofobia y lagrimeo también se han relacionado con la deficiencia de riboflavina ⁽³³⁾. Cuando se ha inducido experimentalmente la deficiencia en riboflavina se ha

detectado dermatitis escrotal o vulvar en hombres y mujeres respectivamente. Generalmente, la zona afectada presenta un intenso prurito y tiende a descamarse⁽³⁴⁾.

A pesar de que la deficiencia clínica de riboflavina es muy poco habitual en países considerados del “primer mundo” varios estudios han encontrado deficiencia subclínica en países como Francia o Reino Unido.

En 1999 Preziosi y colaboradores publicaron un estudio en el que entre otros se evaluaba el estado nutricional en riboflavina. Para ello se seleccionaron al azar del listín telefónico de 12 pueblos de la región francesa de Val-de-Marne 1108 individuos entre 2 y 65 años. En el grupo de edad de entre 18 y 65 años observaron que el EGRAC medio en los que tomaban un desayuno adecuado era 1,32 y en el que no lo tomaban 1,36⁽³⁵⁾.

En el Reino Unido, en el año 2001, se publicó el *National Diet and Nutrition Surveys* llevado a cabo entre 2000 y 2001 y en el que se seleccionaron 1131 participantes de entre 19 y 60 años de edad al azar del censo de 152 distritos postales diferentes considerados representativos de toda la población británica. En él, se reveló que en el grupo de edad de entre los 19 y los 24 años, el 82% de los hombres y el 77% de las mujeres presentaban una deficiencia subclínica en riboflavina cuando se aplicaba el punto de corte de $EGRAC > 1,3$. También se observó que con la edad, el porcentaje de la población que presentaba deficiencia subclínica de riboflavina era inferior ya que en el grupo de edad de entre 50 y 60 años el porcentaje disminuía al 54% en hombres y al 50% en mujeres. De este estudio también se desprendía que el EGRAC medio de la población británica masculina de entre 19 y 60 años era de 1,38 y del 1,40 en la población femenina⁽³⁶⁾.

Unos años más tarde, en 2007, Gariballa y Ullegaddi llevaron a cabo otro estudio en Reino Unido en el que se estudiaba el estado nutricional en riboflavina en 96 pacientes mayores de 65 años que habían sufrido un accidente cerebrovascular isquémico. En este estudio cuando se aplicaba el mismo punto de corte que en el *National Diet and Nutrition Surveys* ($EGRAC > 1,3$) el 51% de los participantes eran deficientes en riboflavina⁽³⁷⁾. Este porcentaje de participantes que presentan

deficiencia de riboflavina es similar al encontrado en el grupo de entre 50 y 60 años de edad del *National Diet and Nutrition Surveys*.

Estos estudios revelan que el valor medio de EGRAC de la población adulta de dos países como Francia y Reino Unido es superior a 1,3. Como ya se ha mencionado anteriormente un EGRAC > 1,3 se considera que corresponde a un estado deficiente en riboflavina. Estos resultados implican un bajo estado en riboflavina en países donde no era de esperar, por lo que son preocupantes.

1.2. METABOLISMO MONOCARBONADO

El metabolismo monocarbonado (figura 2) es un proceso muy complejo que es crucial para el intercambio de un carbono que es necesario para una gran cantidad de procesos celulares en los que se incluye la síntesis de purinas y pirimidinas, metionina y el metabolismo de la glicina y la serina⁽³⁸⁾.

Dos ciclos claves e inter-dependientes participan en el metabolismo monocarbonado: el ciclo de los folatos que actúa como donador o receptor en unidades de un carbono y el ciclo de la metionina que interviene en la vía de remetilación de la homocisteína a metionina.

Ambos ciclos interseccionan en un punto de actuación en común, en la enzima metionina sintasa [MS (2.1.1.13)] que tiene como cofactor la cobalamina y cataliza el paso de 5-metiltetrahydrofolato (CH₃THF) a tetrahydrofolato (THF) conjuntamente con el paso de homocisteína a metionina⁽³⁹⁾.

1.2.1. Folato

El término folato se usa para describir un grupo de compuestos derivados del ácido pteroilglutámico. La estructura básica está compuesta por un anillo de pteridina unido al ácido p-aminobenzoico y a un ácido glutámico. La forma totalmente oxidada de esta molécula es la que se conoce como ácido fólico.

A través del paso por las distintas etapas del ciclo de los folatos va sufriendo diferentes sustituciones bioquímicas que hacen aparecer las diferentes formas reducidas, el THF, el 5,10-metilentetrahydrofolato (CH₂THF) y el CH₃THF.

La forma mayoritaria en el torrente sanguíneo es el CH_3THF ⁽⁴⁰⁾ que pasa a THF conjuntamente con el paso de homocisteína a metionina mediante la MS que tiene como cofactor la cobalamina⁽³⁹⁾. El THF pasa a CH_2THF junto con el paso de L-serina a glicina mediante la serina hidroximetiltransferasa [SHMT (2.1.2.1)] que tiene piridoxina como cofactor⁽⁴¹⁾. Este CH_2THF pasa a CH_3THF mediante la metilentetrahidrofolato reductasa [MTHFR (1.5.1.20)], que tiene FAD como cofactor. En este paso se genera un grupo metilo⁽⁴²⁾. Este grupo metilo es utilizado por la metionina MS⁽³⁹⁾.

Los derivados del ácido fólico juegan un papel importante en el metabolismo monocarbonado actuando como donador o receptor de grupos metilos involucrados en la síntesis o degradación de aminoácidos, como la serina la metionina o la homocisteína y en la síntesis de tiamina y purinas⁽⁴³⁾.

Un déficit en folato implica una reducción de todas las formas de folato del ciclo de los folatos con lo que se produciría una reducción en la transferencia de grupos metilos necesarios para remetilar la homocisteína produciendo un aumento de su concentración. Una elevada concentración de la homocisteína total plasmática (tHcy) se ha asociado con varias complicaciones en el embarazo como defectos del tubo neural^(44, 45).

La suplementación con ácido fólico se ha demostrado eficaz contra la aparición de defectos del tubo neural⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Este fue el principal motivo por el que Estados Unidos decidió aplicar una política de fortificación de la harina con ácido fólico desde 1998⁽⁴⁹⁾. Esta política consiste en añadir 140 μg de ácido fólico por cada 100 gramos de producto y ha provocado un aumento en la concentración de folato plasmático^(50, 51) y una disminución media del 10% de la tHcy⁽⁵²⁾.

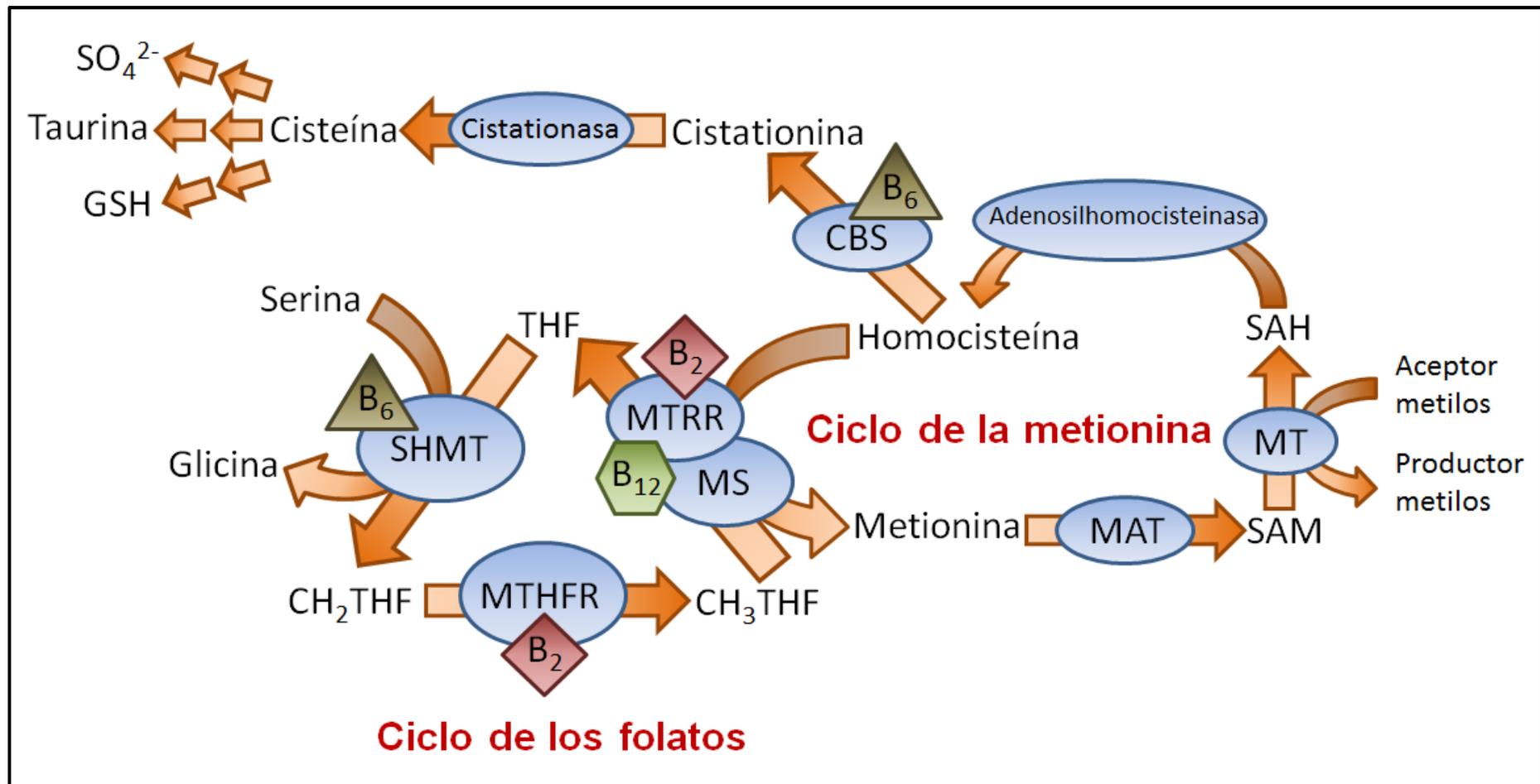


Figura 2. Metabolismo monocarbonado. *SHMT*: Serina hidroximetiltransferasa; *MTHFR*: Metilentetrahidrofolato reductasa; *MS*: Metionina sintasa; *MTRR*: Metionina sintasa reductasa; *CBS*: Cistionina β-sintasa; *MAT*: Metionina adenosiltransferasa; *MT*: Metiltransferasa; *THF*: tetrahidrofolato; *CH₂THF*: 5,10-metilentetrahidrofolato; *CH₃THF*: 5-metiltetrahidrofolato; *GSH*: Glutatión; *SO₄²⁻*: Sulfato inorgánico; *SAH*: S-Adenosilhomocisteína; *SAM*: S-Adenosilmetionina.

Existen dos puntos de unión entre el ciclo de los folatos y la riboflavina. Estos dos puntos son la MTHFR y la metionina sintasa reductasa [MTRR (1.16.1.8)] que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾. La MTHFR necesita FAD como cofactor y la MTRR es una flavoproteína.

El folato se considera el mayor determinante de la tHcy⁽⁵⁴⁾ pero una deficiencia en riboflavina podría provocar un mal funcionamiento del ciclo de los folatos, a pesar de presentar una buena concentración en folato, con lo que no se llevaría a cabo correctamente la remetilación de homocisteína a metionina. Este mal funcionamiento provocaría un aumento de la tHcy.

1.2.2. Cobalamina

El término cobalamina o vitamina B₁₂ hace referencia a todos los compuestos organometálicos con un átomo central de cobalto y un anillo de corrina. Al átomo central de cobalto puede estar unido un grupo 5'-desoxiadenosil (desoxiadenosilcobalamina o adenosilcobalamina), metil (metilcobalamina), ciano (cianocobalamina) o hidroxil (hidroxicobalamina)⁽⁵⁵⁾.

En el citosuelo la cobalamina actúa como cofactor de MS que como ya hemos visto es la enzima que se encarga de catalizar el paso de CH₃THF a THF junto con el paso de homocisteína a metionina⁽³⁹⁾ que además de estar implicada en la correcta síntesis de ADN⁽⁵⁶⁾ también es clave para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) necesaria para el mantenimiento de la capacidad de metilación⁽³⁹⁾.

El ciclo catalítico de la MS se completa con la transferencia de un grupo metilo de la metilcob(III)alamina a la homocisteína, formándose metionina y cob(I)alamina⁽⁵⁷⁾. La cob(I)alamina es un intermedio lábil y cada aproximadamente 2000 ciclos catalíticos se oxida a cob(II)alamina⁽⁵⁸⁾. La metionina sintasa reductasa [MTRR (1.16.1.8)] es una flavoproteína que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina⁽⁵³⁾.

La deficiencia en cobalamina puede provocar lo que se conoce como la trampa de metilos⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Esta teoría explica porque una deficiencia en cobalamina puede

manifestarse como una deficiencia funcional en folato a pesar de presentar un buen estado en éstos que se ve reflejada con un aumento en tHcy.

Una deficiencia en cobalamina impediría un correcto funcionamiento de MS con lo que no se produciría el paso de CH_3THF a THF. Por otra parte, la reacción de MTHFR es irreversible con lo que CH_2THF pasa a CH_3THF . De esta manera el folato celular está atrapado en forma de CH_3THF ya que no puede pasar a THF ni puede volver a CH_2THF ⁽⁵⁹⁾. Además, la reducción de la actividad de la MS debida a la deficiencia en cobalamina impide la remetilación de la homocisteína. Con lo que el resultado es un aumento en la tHcy. Esta teoría ha sido avalada por varios estudios⁽⁶²⁻⁶⁴⁾.

Existe un punto de unión indirecto entre la concentración en riboflavina y la concentración en cobalamina. Este punto es la MTRR que es una flavoproteína que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es ésta la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾.

Una deficiencia en riboflavina podría provocar un mal funcionamiento de MTRR con lo que a pesar de presentar una buena concentración en cobalamina, ésta una vez desactivada, no podría volver a ser activada. Este mal funcionamiento provocaría un aumento de la tHcy.

1.2.3. Vitamina B₂

La riboflavina o vitamina B₂ mediante sus formas biológicamente activas FMN y FAD actuando como coenzimas, tiene un papel principal en una amplia gama de reacciones biológicas.

En los últimos años se ha despertado un interés por estudiar el papel que juega el estado en riboflavina en una enzima clave para el ciclo de los folatos, la MTHFR que tiene FAD como cofactor y cataliza el paso de CH_2THF a CH_3THF . En este paso se genera un grupo metilo⁽⁴²⁾ que es utilizado por la MS⁽³⁹⁾.

A pesar del aumento en el número de estudios que investigan el efecto del estado en riboflavina sobre el ciclo de los folatos, el papel del estado en riboflavina en el

metabolismo monocarbonado no ha sido explorado totalmente. La riboflavina no interviene en el ciclo del metabolismo monocarbonado solamente como cofactor de MTHFR mediante su forma activa FAD. También interviene mediante la MTRR, que es una flavoproteína y cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾. La MS es la enzima que tienen en común los dos ciclos claves e inter-dependientes que participan en el metabolismo monocarbonado: el ciclo de los folatos y el ciclo de la remetilación de homocisteína a metionina.

Aunque hasta ahora no se le ha dado una gran importancia al papel que juega el estado en riboflavina en el metabolismo monocarbonado, el hecho que dos enzimas claves para este metabolismo que intervienen en diferentes reacciones implicadas en la generación y el transporte de grupos metilo dependan de riboflavina hace pensar que un buen estado en riboflavina sea básico para su correcto funcionamiento.

En tiempo de debate sobre si se tendría que aplicar una política de fortificación de la harina con ácido fólico en España, sería prudente no tan sólo la determinación del estado nutricional en folato de la población, sino también el estado nutricional en riboflavina.

1.2.4. Vitamina B₆

La vitamina B₆ es un conjunto de seis vitámeros, tres derivados de la piridina [piridoxina (PN), piridoxamina (PM), piridoxal (PL)] y sus ésteres fosforilados [piridoxina-5'-fosfato (PNP), piridoxamina 5'-fosfato (PMP) y piridoxal 5'-fosfato (PLP)].

La forma fisiológicamente activa y el principal componente en el plasma humano es el PLP.

El papel más conocido del PLP en el metabolismo monocarbonado es el de la vía de la transulfuración de la metionina, donde la homocisteína condensa con la serina

para formar cistationina en una reacción catalizada por un enzima dependiente de vitamina B₆ la cistationina β-sintasa [CBS (4.2.1.22)].

No obstante la PLP también participa en reacciones vinculadas al ciclo de los folatos. La SHMT tiene PLP como cofactor y cataliza el paso de L-serina a glicina conjuntamente con el paso de THF a CH₂THF⁽⁴¹⁾. Este CH₂THF es el substrato de MTHFR que cataliza una reacción en la que se genera un grupo metilo que es utilizado por la metionina sintasa⁽³⁹⁾.

La vitamina B₆ interviene en diferentes reacciones del metabolismo monocarbonado, estas diferentes reacciones están implicadas en la generación y el transporte de grupos metilo. Lo que hace pensar que un buen estado en vitamina B₆ sea básico para su correcto funcionamiento.

1.2.5. Homocisteína

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que es metabolizado por dos vías diferentes: la remetilación a metionina y la transulfuración a cisteína⁽⁶⁵⁾.

En la vía de la transulfuración la homocisteína condensa con la serina para formar la cistationina en una reacción catalizada por un enzima dependiente de vitamina B₆, la CBS. Esta cistationina se hidroliza mediante la cistationina γ-liasa (4.4.1.1) para formar cisteína y α-cetobutirato. El exceso de cisteína es oxidado a taurina y sulfato inorgánico (SO₄²⁻)^(65, 66).

Hay dos vías de remetilación de la homocisteína a metionina. Una es en la que se obtiene el grupo de la betaína. La reacción con la betaina tiene lugar básicamente en el hígado y en el riñón y está catalizada por la betaina-homocisteína metiltransferasa [BHMT (2.1.1.5)]⁽⁶⁷⁾.

La segunda vía de remetilación de la homocisteína está relacionada con el ciclo de los folatos ya que éste está relacionado con la MS que es la enzima que cataliza la remetilación de homocisteína a metionina. Esta vía a diferencia de la anterior tiene lugar en todos los tejidos⁽³⁹⁾.

En esta vía la MS transfiere un grupo metilo de la metilcob(III)alamina a la homocisteína, formándose metionina y cob(I)alamina⁽⁵⁷⁾. Este grupo metilo proviene de la conversión de forma irreversible de CH₂THF a CH₃THF que es catalizada por MTHFR, que requiere FAD como cofactor⁽⁴²⁾. La cob(I)alamina es un intermedio lábil y cada aproximadamente 2000 ciclos catalíticos se oxida a cob(II)alamina⁽⁵⁸⁾. La cob(II)alamina se remetila reductivamente para formar metilcob(III)alamina mediante la MTRR^(53, 68).

Gran parte de la metionina es transformada posteriormente a SAM que es el principal donador de grupos metilos mediante la metionina adenosiltransferasa [MAT (2.5.1.6)]⁽⁶⁹⁾. El producto de estas reacciones de metilación es la S-Adenosilhomocisteína (SAH) que es posteriormente hidrolizada por la adenosilhomocisteinasa (3.3.1.1) para formar homocisteína nuevamente⁽⁷⁰⁾.

La priorización entre una vía u otra en función de la concentración de metionina en la dieta sugiere que hay una coordinación entre las dos vías.

Se han propuesto dos posibles mecanismos de discriminación entre una vía u otra, el de la inhibición y el de la concentración de CH₃THF.

En el mecanismo de la inhibición SAM actúa como inhibidor alostérico de MTHFR que es la encargada de catalizar el paso de CH₂THF a CH₃THF, en esta reacción se obtiene un grupo metilo necesario para la metilación homocisteína a metionina. SAM también actúa como activador de CBS, que tiene B₆ como cofactor y es la primera enzima de la vía de la transulfuración^(71, 72). Esto implica que se suprime la creación de CH₃THF esencial para la vía de la remetilación y se ve favorecido el primer paso de la vía de la transulfuración.

El segundo mecanismo es el de la concentración de CH₃THF. La glicina N-metiltransferasa [GNMT (2.1.1.20)] cataliza el paso de un grupo metilo de SAM al grupo amino de la glicina formando sarcosina⁽⁷³⁾ y esta reacción está inhibida por CH₃THF⁽⁷⁴⁾.

Se han observado que existen varios factores genéticos, fisiológicos, de estilo de vida y de procesamiento de la muestra que influyen sobre la tHcy.

Se ha investigado bastante el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy. Este polimorfismo se explica más detalladamente en el apartado 1.2.6.1 ya que es uno de los polimorfismos estudiados especialmente en esta tesis. Pero a modo de introducción decir que ser homocigótico para este polimorfismo se asocia con una mayor tHcy cuando se acompaña con una dieta pobre en folato⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾ y se ha considerado uno de los mayores determinantes de la tHcy⁽⁷⁷⁾. Los polimorfismos *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T, que también serán estudiados especialmente en esta tesis y se detallan en el apartado 1.2.7, también pueden aumentar la tHcy pero el posible papel de estos dos polimorfismos ha sido investigado mucho menos.

Como factores fisiológicos destacan la edad, el sexo, la función renal y el embarazo.

La tHcy aumenta con la edad y se considera que se duplica entre la infancia hasta la tercera edad⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Los hombres presentan una mayor tHcy que las mujeres, de media unos 2 $\mu\text{mol/L}$, pero esta diferencia con las mujeres se va reduciendo a partir de la menopausia^(82, 83). La tHcy depende de la función renal y de la síntesis de creatinina. Hay que tener en cuenta que la concentración de creatinina es indicador de la función renal^(84, 85). Durante el embarazo la tHcy se ve reducida observándose su mínimo en el segundo trimestre del embarazo⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾. Esta reducción es debida en parte a la hemodilución y la disminución de la albúmina sérica⁽⁸⁸⁾, a la influencia del estradiol⁽⁹⁰⁾ y al aumento en la función renal⁽⁹¹⁾.

Como factores de estilo de vida destacar el consumo de vitaminas del tipo B, fumar, y el consumo de café o de alcohol.

Un mejor estado en folato se ha asociado con una menor tHcy. También un mejor estado en cobalamina, piridoxina y riboflavina se han asociado con una mejora en tHcy en algunos casos, aunque estas tres vitaminas han sido mucho menos estudiadas que el folato^(50, 80, 92-98). El fumar y el consumo de café o alcohol también se han asociado con una mayor tHcy^(83, 96, 97, 99).

También se ha observado que la tHcy en plasma o suero sanguíneo incrementa cuando el tiempo de separación de las células sanguíneas aumenta⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Esto es

debido a la liberación continua de Hcy de los eritrocitos⁽¹⁰²⁾. A temperatura ambiente el aumento es de 1 μM /hora o lo que es lo mismo un incremento del 10% a la hora en una muestra tipo con una tHcy de 10 $\mu\text{mol/L}$ ⁽¹⁰³⁾. Este aumento de tHcy se puede reducir si se mantienen las muestras refrigeradas y se centrifugan de inmediato⁽¹⁰⁴⁾. Debido a la preparación del suero que se tiene que dejar entre 30 y 60 minutos a temperatura ambiente para permitir la coagulación, las concentraciones en éste son superiores a las obtenidas en plasma.

Una homocisteína elevada se ha asociado con aumento de complicaciones cardiovasculares en varios estudios y metaanálisis.

En un metaanálisis llevado a cabo por Boushey y colaboradores en 1995 en el que se analizaron los datos de 27 estudios en los que se analizaba la relación entre la tHcy y problemas vasculares, se encontró que un incremento de 5 $\mu\text{mol/L}$ de tHcy se asocia con un incremento del 60% y el 80% de padecer complicaciones cardiovasculares en hombres y en mujeres respectivamente⁽¹⁰⁵⁾. En otro metaanálisis que llevaron a cabo Refsum y colaboradores basado en 80 estudios clínicos y epidemiológicos con un total de más de 10000 participantes llegaron a la conclusión que una tHcy elevada era un factor de riesgo para complicaciones cardiovasculares⁽¹⁰⁶⁾.

Pintó y colaboradores en 2001 publicaron un estudio en el que participaron 76 hombres de Cataluña en el que encontraron que una mayor tHcy se asocia con un mayor riesgo de enfermedades coronarias prematuras⁽¹⁰⁷⁾.

Junto a este aumento de complicaciones cardiovasculares una tHcy elevada también se ha asociado con varias complicaciones en el embarazo⁽¹⁰⁸⁾. Entre ellas defectos del tubo neural en especial en presencia del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾, desprendimiento prematuro de placenta⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾, crecimiento intrauterino retardado⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾ y preeclampsia⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾.

Hasta ahora la gran mayoría de estudios que han evaluado los posibles factores que influyen sobre la tHcy se han concentrado principalmente en investigar el papel de los folatos y el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T. Pero existen incongruencias entre los diferentes estudios. No todos los estudios muestran una relación entre

MTHFR 677 C>T y una tHcy elevada o las complicaciones sobre la salud objetivo de los diferentes estudios. Parece que aparte de las diferencias básicas que pueden existir entre los estudios también hay otros factores que no se han estudiado tanto hasta la fecha que pueden ser la causa de estas diferencias.

Como hemos visto en este mismo apartado el estado en riboflavina a través de su papel como cofactor de *MTHFR* y de *MTRR* que es una flavoproteína también puede jugar un papel crucial en el metabolismo de la homocisteína.

Debido a la evidencia de que la riboflavina afecta a la tHcy y de que el estado en esta vitamina podría afectar la estructura o función de diferentes enzimas implicados en el metabolismo monocarbonado en esta tesis, no sólo se estudiara el papel de los folatos y el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy, sino que también se estudiará el papel del estado en riboflavina y como éste puede afectar al comportamiento del metabolismo monocarbonado a través de las dos enzimas de este metabolismo que son dependientes de riboflavina, la *MTHFR* y la *MTRR*.

1.2.6. MTHFR

Como se ha visto anteriormente la *MTHFR* cataliza la conversión de CH_2THF a CH_3THF y presenta FAD como cofactor. La reducción de CH_2THF mediante la *MTHFR* libera un grupo metilo que se utiliza por la MS para la conversión de la homocisteína a metionina⁽⁴²⁾. Esta conversión es crucial para controlar la concentración de homocisteína intracelular y mantener los niveles adecuados de SAM, que es el donador universal de metilos que se usan en todas las reacciones de metilación de lípidos, proteínas y DNA⁽¹²¹⁾.

La *MTHFR* de los mamíferos son dímeros de unos 70 kDa, cada subunidad que contiene un lugar para enlazar de forma no covalente un FAD. La estructura contiene un dominio N-terminal catalítico y un dominio C-terminal regulador donde se une el inhibidor alostérico SAM y regula la actividad de la enzima según la concentración de metionina celular⁽⁷¹⁾.

La estructura de MTHFR es el primer ejemplo que se conoció de barril $\beta_8\alpha_8$ que se une a FAD, ya que lo más habitual en este tipo de estructuras es unirse a FMN. La cadena incluye 273 residuos y como es común en este tipo de estructuras el cofactor se une a un C-terminal de una de las cadenas β . Los residuos a los que se une FAD se agrupan en los extremos de las cadenas en barril β_3 , β_4 y β_5 y a lo largo de la hélice α_5 ⁽⁴²⁾.

Hasta el momento se han encontrado varias mutaciones en *MTHFR* aunque los dos polimorfismos más estudiados han sido el *MTHFR* 677 C>T y el *MTHFR* 1298 A>C.

1.2.6.1. *MTHFR* 677 C>T

El polimorfismo *MTHFR* 677 C>T es bastante común y se produce en el exón 4. Consiste en el cambio de una citosina por una timina en la posición 677, lo que provoca la substitución del codón alanina por valina (A222V)⁽⁷⁸⁾.

La frecuencia del alelo T en la población global se encuentra en el 32% pero esta frecuencia varía entre regiones siendo superior en los países del sur de Europa, donde el porcentaje de los homocigóticos para este polimorfismo llega al 20% en Sicilia y al 14% en España^(77, 122).

Esta mutación provoca una disminución de la afinidad de la proteína por FAD y un aumento de la termolabilidad de la enzima lo que conlleva una disminución de su actividad enzimática⁽¹²³⁾. La disminución de la actividad de la enzima llega a ser del 68% en el caso de la variante TT⁽¹²⁴⁾.

En un estudio llevado a cabo por Frosst y colaboradores en 1995 se demostraba que esta pérdida de la actividad enzimática provocaba un aumento de tHcy⁽⁷⁸⁾.

Desde entonces varios estudios han investigado el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy y en ellos la presencia de la enzima mutante se ha asociado con un aumento en la tHcy. En 1998 otro estudio publicado por Weisberg y colaboradores en el que participaron 785 hombres, miembros del *European Atherosclerosis Research Study II (EARS II)*, entre 22 y 25 años procedentes de 14 universidades de 12 países europeos diferentes se demostraba el efecto del

polimorfismo sobre la tHcy en diferentes poblaciones europeas. En este estudio encontraron un gradiente norte-sur de tHcy en los homocigóticos, en los que los valores más altos se encontraban en Italia y Grecia⁽⁷⁷⁾. Tres años más tarde, Pintó y colaboradores realizaron un estudio en el que participaron 76 hombres de Cataluña y en el también encontraron que ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T se asocia con una homocisteína elevada⁽¹⁰⁷⁾.

También se han realizado varios estudios en el que se analiza el papel del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy en embarazadas.

Kim y colaboradores en 2004 publicaron un estudio que se llevó a cabo en Corea en el que participaron 177 mujeres embarazadas de entre la 24 y 28 semanas de gestación. En este estudio encontraron que las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban una mayor tHcy que las salvajes para este mismo polimorfismo⁽⁷⁶⁾. Años más tarde, en 2007, Barbosa y colaboradores publicaron un estudio llevado a cabo en Brasil en el que participaron 405 embarazadas a las que se les extraía una muestra sanguínea en el momento que ingresaban en el hospital con trabajo de parto. Este grupo también encontró una mayor tHcy en las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T que en las salvajes⁽⁷⁵⁾.

Debido a que la concentración en folato es esencial para el correcto funcionamiento *MTHFR*, ya que esta enzima cataliza el paso de CH₂THF a CH₃THF, también se ha investigado como la concentración de folato puede modificar el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la actividad de la enzima. En estos estudios se ha observado que una menor concentración de folato se ha asociado con una mayor tHcy.

En un estudio llevado a cabo en Estados Unidos por Jacques y colaboradores entre 1994 y 1996 con 365 participantes de entre 25 y 69 años de edad se demostraba que los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaban una mayor tHcy sólo cuando se encontraban en un peor estado en folato; si se encontraban en el rango alto de folato este aumento no se producía⁽¹²⁵⁾. Ese mismo año también en Estados Unidos, Ma y colaboradores llevaron a cabo un estudio con 293 participantes, de entre 40 y 84 años, del estudio *Physicians' Health Study* en el que se observó que

los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaban una mayor tHcy, en especial cuando el estado en folato era bajo⁽¹²⁶⁾.

Hay que tener en cuenta que cuando se realizaron estos estudios todavía no se había implantado la política de fortificación de la harina con ácido fólico⁽⁴⁹⁾.

En otro estudio realizado en 2008, una vez ya se había implantado la política de fortificación de la harina con ácido fólico, por Yang y colaboradores en el que participaban 6793 personas del estudio NHANES III se comprobó que los participantes que se encontraban en un peor estado en folato y eran homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaban una mayor tHcy⁽¹²⁷⁾.

En estudios realizados en otros países como el llevado a cabo en Irlanda del Norte por Brown y colaboradores en 2004 con 407 participantes de entre 20 y 26 años se demostró que los homocigóticos para este polimorfismo que presentaban un peor estado en folato tenían mayor tHcy⁽¹²⁸⁾. Más recientemente en 2011, Holmes y colaboradores llevaron a cabo un metaanálisis con 237 estudios y un total de 59995 participantes en el que se observó que el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy era mayor en las poblaciones con un peor estado en folato⁽¹²⁹⁾.

Por qué los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentan una mayor tHcy cuando el estado en folato es bajo puede explicarse por el hecho que el folato ayuda a estabilizar la unión entre MTHFR y su cofactor FAD. En un estudio realizado por Guenther y colaboradores en 1999 se observó que la variante termolábil del enzima perdía más fácilmente la unión con su cofactor FAD. Si se añadía folato o derivados de éste se reducía la pérdida del cofactor mediante la estabilización del enlace y de esta manera también se reducía la menor actividad de la enzima⁽⁴²⁾.

El 2006 fue un momento clave para revelar la importancia del estado nutricional en riboflavina sobre la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy.

Hasta ese momento la solución al problema del aumento de tHcy debido a ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T había sido la suplementación con ácido fólico. El ácido fólico podía solucionar este aumento de tHcy debido a la pérdida de actividad de la enzima de dos maneras diferentes. Una mediante la estabilización de

la unión entre MTHFR y su cofactor FAD⁽⁴²⁾ y otra mediante un bypass de este punto del ciclo. La mayor parte de la suplementación con ácido fólico se absorbe como CH₃THF que es el producto final de la reacción de MTHFR. De esta forma se salta este punto del ciclo y se reduce el efecto de ser homocigótico para *MTHFR 677 C>T*.

Pero en este año McNulty y colaboradores publicaron un estudio que había tenido lugar en Irlanda del Norte. En este estudio con 680 participantes de entre 18 y 65 años, los participantes fueron divididos entre grupo de intervención, a los que se les daba durante 12 semanas 1,6 mg de riboflavina diaria y grupo control a los que se les daba placebo. La suplementación con riboflavina aumentaba la concentración en riboflavina por igual en los tres genotipos, pero sólo en el caso de los homocigóticos para *MTHFR 677 C>T* se observaba una reducción del 22% de la tHcy⁽²⁶⁾.

Este estudio proponía una mejor estrategia para lidiar con el problema de la mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR 677 C>T* demostrando que mejorando el estado nutricional en riboflavina se podía solucionar el problema atacando directamente a su punto de origen.

Varios estudios han analizado la relación entre el estado en riboflavina y la tHcy en los homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR 677 C>T*.

En 2000 Hustad y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que participaron 423 personas de Noruega, comprendidas entre los 19 y 69 años, en el que demostraban que la riboflavina plasmática es un factor determinante independiente de tHcy⁽⁸⁰⁾. Siete años más tarde en 2007 otro estudio llevado a cabo en Noruega por Holm y colaboradores con 10601 participantes de entre 50 y 64 años se observó que una deficiencia en riboflavina se asociaba con una mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR 677 C>T*⁽¹³⁰⁾.

Otros dos estudios llevados a cabo en Estados Unidos analizaron la relación entre el estado en riboflavina y la tHcy en los homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR 677 C>T*.

En 2002 Jacques y colaboradores publicaron un estudio en el que participaban 450 individuos del estudio *Framingham Offspring Study* en el que encontraron que el estado en riboflavina afectaba al metabolismo de la homocisteína pero sólo en el

grupo de homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T que presentaban un peor estado en folato⁽¹³¹⁾. Unos años más tarde en 2009 Caudill y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que participaron 60 varones adultos de entre 18 y 55 años de California. En este estudio observaron que un peor estado en riboflavina conllevaba una mayor tHcy en los individuos TT para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en un peor estado en folato⁽¹³²⁾.

Los resultados de estos estudios parecen inconsistentes. Los tres primeros estudios llevados a cabo en Europa encuentran que un peor estado en riboflavina se asocia con una mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T, en cambio, en los dos últimos estudios que tuvieron lugar en Estados Unidos este efecto del estado en riboflavina se limita a cuando el estado en folato es peor con lo que la riboflavina no parece ser el factor limitante. La explicación más plausible para esta divergencia entre los resultados obtenidos en los estudios de Europa y los de Estados Unidos es la política de fortificación.

A diferencia de Europa, en Estados Unidos existe una política de fortificación de la harina con ácido fólico desde 1998 y una política de reposición de riboflavina en la harina desde 1943, aunque esta última es menos conocida⁽⁴⁹⁾. Esta política de fortificación de la harina con ácido fólico ha provocado que aumente la concentración de folato^(50, 51) y de una disminución media del 10% de la tHcy⁽⁵²⁾.

Esta diferencia entre los dos continentes podría ser el motivo por el cual los resultados obtenidos en Europa sólo sean reproducibles en Estados Unidos en los participantes que se encuentran en un peor estado en folato.

Recientemente se han publicado varios estudios donde se investigaba la relación entre el estado en riboflavina y el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la hipertensión arterial. Merchant y colaboradores en 2005 publicaron un estudio con 955 mujeres embarazadas seropositivas de Tanzania en el que se observó que las mujeres que tomaban suplementos vitamínicos, que contenían riboflavina entre otras vitaminas, tenían un 38% menos de riesgo de desarrollar hipertensión gestacional⁽¹³³⁾. Años más tarde Horigan y colaboradores, en el 2009, publicaron un estudio llevado a cabo en Irlanda del Norte con 181 participantes en el que encontraron que la suplementación con riboflavina ayudaba a disminuir la presión

arterial en los individuos homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T. En este estudio también se observó que la suplementación con riboflavina reducía la tHcy⁽¹³⁴⁾. Años más tarde, en 2012, se publicó otro estudio llevado a cabo también en Irlanda del Norte por Wilson y colaboradores con 83 participantes, en el que se observó que la suplementación con riboflavina era una buena estrategia para disminuir la presión arterial en un grupo de riesgo, como es el caso de los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T⁽¹³⁵⁾.

En todos los casos se observó que una suplementación con riboflavina disminuía la presión arterial en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T. El mecanismo por el cual se produce esta disminución no está claro, ni si quiera se sabe si es a través de la tHcy o es independiente de ésta.

Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T se ha asociado con enfermedades coronarias⁽¹³⁶⁻¹⁴⁰⁾, hipertensión arterial^(135, 141-143) y con complicaciones del embarazo como defectos en el tubo neural⁽¹⁴⁴⁾, abortos espontáneos recurrentes^(145, 146) y mayor riesgo de síndrome de Down^(147, 148).

Se han encontrado incongruencias entre los resultados obtenidos en estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy o diferentes enfermedades sin tener en cuenta el estado en riboflavina. El hecho de considerar solamente el estado en folato podría no ser suficiente. El estado nutricional en riboflavina podría explicar las incongruencias entre estos estudios.

1.2.6.2. *MTHFR* 1298 A>C

El polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C se produce en el exón 7 y consiste en el cambio de un ácido glutámico por una alanina (E429A)⁽¹²⁴⁾. Esta mutación provoca una disminución de la afinidad de la proteína por FAD lo que conlleva una disminución de la actividad enzimática de ésta, aunque no se ha encontrado una termolabilidad de la enzima como en el caso de *MTHFR* 677 C>T. La disminución de la actividad de la enzima es menor que en el caso de la mutación 677 C>T, a pesar de eso, la disminución llega a ser del 45% en el caso de la variante CC^(124, 149, 150).

El alelo C se encuentra en el 30 % de la población europea⁽¹²⁴⁾.

Cuando se investigó el efecto del polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C sobre tHcy se obtuvieron resultados dispares.

Weisberg y colaboradores en 2000 llevaron a cabo un estudio en Estados Unidos en el que participaron 198 individuos del estudio *NHLBI Family Heart Study*. En este estudio encontraron que los portadores del alelo mutante no presentaban una mayor tHcy que los salvajes para este polimorfismo⁽¹⁴⁹⁾. Años más tarde, en 2003, Botto y colaboradores en Italia llevaron a cabo un estudio con 68 participantes en el que tampoco se observó relación entre el polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C y la tHcy⁽¹⁵¹⁾.

En cambio en Portugal, en un estudio del 2002, Castro y colaboradores llevaron a cabo un estudio con 117 participantes de entre 20 y 69 años, en el que se observó que los homocigóticos para *MTHFR* 1298 A>C presentaban una mayor tHcy que los salvajes para el mismo polimorfismo⁽¹⁵²⁾. En otro estudio realizado en la India por Markan y colaboradores entre el 2003 y 2006 con 286 participantes encontraron que ser homocigótico se asociaba con una mayor tHcy⁽¹⁴²⁾.

Estas incongruencias entre los resultados obtenidos en los estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C y la tHcy podrían explicarse por el diferente estado nutricional en riboflavina.

El polimorfismo 1298 CC se ha asociado con enfermedades coronarias^(153, 154), hipertensión arterial⁽¹⁴²⁾ y abortos espontáneos⁽¹⁴⁶⁾.

Se ha observado que el alelo 677 T se encuentra casi siempre en cis con el alelo 1298 A y el alelo 1298 C con el 677 C, o lo que es lo mismo que los individuos con la variante 677 TT presentan solamente la variante 1298 AA^(124, 150, 155).

Esto haría que los resultados derivados del estudio del polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C podrían verse influenciados por el hecho que todos los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T son a su vez salvajes para este polimorfismo. Debido a esta relación que podría falsear los resultados nos limitaremos a estudiar el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T.

1.2.7. MTRR

Se ha visto que la relación entre MTHFR y tHcy depende del estado nutricional en folato y según algunos estudios del estado nutricional en riboflavina. Otro punto clave del metabolismo monocarbonado, el de intersección de los dos ciclos inter-dependientes que participan en el metabolismo monocarbonado, es la MS que tiene como cofactor la cobalamina. Pero la MS también depende de MTRR, que podría estar afectada por el estado nutricional en riboflavina.

La MTRR es una flavoproteína de 78-KDa que contiene FAD y FMN de forma equimolar y cataliza la metilación reductiva de cob(II)alamina, siendo la SAM el donador de metilos^(53, 68).

La MTRR transfiere los electrones derivados de la oxidación de NADPH a través de sus centros activos (FAD y FMN) a su pareja redox la MS⁽⁶⁸⁾ que es la enzima que se encarga de catalizar el paso de homocisteína a metionina⁽³⁹⁾. La cob(I)alamina capta un grupo metilo del de CH₃THF formando metilcob(III)alamina como intermedio y THF. El ciclo catalítico de la MS se completa con la transferencia de un grupo metilo de la metilcob(III)alamina a la homocisteína, formándose metionina y cob(I)alamina⁽⁵⁷⁾. La cob(I)alamina es un intermedio lábil y cada aproximadamente 2000 ciclos catalíticos se oxida a cob(II)alamina⁽⁵⁸⁾.

La cob(II)alamina se remetila reductivamente para formar metilcob(III)alamina. En este mecanismo de reactivación se forma un complejo entre la MS y MTRR y los electrones derivados de la oxidación de NADPH catalizada por MTRR se transfieren a la forma inactiva de MS^(53, 68). Esta transferencia de electrones en el complejo MS-MTRR facilita la transferencia de un grupo metilo de AdoMet a MS, de esta forma se regenera la metilcob(III)alamina⁽¹⁵⁶⁾.

Otra función menos conocida y más novedosa de MTRR es actuar como chaperona de MS ya que ayuda a estabilizar la forma apoMS favoreciendo la formación de holoMS⁽¹⁵⁷⁾.

Se han identificado varios polimorfismos del gen *MTRR* pero los más estudiados son el *MTRR* 66 A>G y el *MTRR* 524 C>T.

El polimorfismo *MTRR* 66 A>G se produce en el exón 22 y consiste en el cambio de una alanina por una glicina en la posición 66, lo que provoca la substitución del codón metionina por isoleucina (M22I)⁽¹⁵⁸⁾.

La frecuencia del alelo G en la población oscila entre el 30% de los hispanos y el 50% de los caucásicos^(158, 159).

Varios estudios han investigado el efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre tHcy con resultados dispares.

En el año 2001, Gaughan y colaboradores publicaron un estudio llevado a cabo en Irlanda del Norte con 601 hombres de entre 30 y 49 años de edad en el que encontraron que el ser homocigótico para *MTRR* 66 A>G se asociaba con un aumento de tHcy⁽¹⁶⁰⁾. Años más tarde, Vaughn y colaboradores realizaron un estudio con 362 mujeres de Florida de entre 20 y 30 años. En este estudio no encontraban diferencias significativas entre la tHcy según el polimorfismo *MTRR* 66 A>G pero si veían una tendencia a una mayor tHcy en las portadoras del alelo mutante G⁽¹⁶¹⁾. Y un año más tarde en el 2005, en un estudio realizado en Francia de Guéant-Rodriguez y colaboradores con 778 participantes también se encontraron que una mayor tHcy en los homocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G⁽¹⁶²⁾.

En cambio, Jacques y colaboradores publicaron un estudio en 2003 con 562 participantes de Estados Unidos en el que no encontraban efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy⁽¹⁶³⁾. Ese mismo año, se publico otro estudio realizado por Kluijtmans y colaboradores con 489 jóvenes de entre 20 y 25 años de Irlanda del Norte en el que no se encontró efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy⁽¹⁶⁴⁾. También ese mismo año se publicaron otros dos estudios más, uno llevado a cabo en Italia por Botto y colaboradores con 68 participantes⁽¹⁵¹⁾ y otro llevado a cabo por Brilakis y colaboradores en Estados Unidos con 504 pacientes de entre 27 y 77 años en los que no encontraban diferencia en la tHcy según genotipo de *MTRR* 66 A>G⁽¹⁶⁵⁾.

Estas incongruencias entre los resultados obtenidos en los estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y la tHcy podrían explicarse por el diferente estado nutricional en riboflavina y en cobalamina.

Este polimorfismo se ha asociado con mayor riesgo de padecer enfermedades coronarias prematuras⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁹⁾, espina bífida^(158, 170, 171) y aumento del riesgo de padecer síndrome de Down^(172, 173).

El polimorfismo *MTRR* 524 C>T es un polimorfismo muchísimo menos estudiado que el 66 AG y consiste en el cambio de una citosina por una timina en la posición 524, lo que provoca la sustitución del codón serina por leucina (S175L). Esta mutación afecta a la región interdominio⁽¹⁷⁴⁾.

La frecuencia del alelo T en una pequeña población en un grupo control es del 62%⁽¹⁷⁵⁾.

En ambas mutaciones el potencial reductor de los cofactores flavínicos no se ve prácticamente afectado, lo que se ve afectada es la afinidad por su pareja reductora la MS con lo que la reacción es de tres a cuatro veces menos eficiente⁽¹⁷⁴⁾.

1.3. EMBARAZO

El embarazo es uno de los factores fisiológicos que más influencia tiene sobre la tHcy. Esta influencia tiene lugar por dos vías distintas.

Una vía es que a lo largo de la gestación la tHcy se ve reducida observándose su mínimo en el segundo trimestre del embarazo⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾. Esta reducción es debida en parte a la hemodilución y la disminución de la albumina sérica⁽⁸⁸⁾, a la influencia del estradiol⁽⁹⁰⁾ y al aumento en la función renal⁽⁹¹⁾ que se produce durante el embarazo.

Otra vía es que también hay que tener en cuenta que el embarazo es un estado fisiológico en el que se produce una demanda extra en los nutrientes implicados en el eje polimorfismo-tHcy, como es el caso del folato, la cobalamina y la riboflavina.

Estos hechos nos hacen pensar que el estrés del propio embarazo podría alterar, dependiendo del momento en el que se encuentre la gestación, de una forma diferente la relación de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T con la tHcy según el estado en riboflavina.

Para poder dilucidar si el embarazo altera la relación de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T con la tHcy se tiene que comparar esta relación con la relación de estos mismos polimorfismos con la tHcy en una población no embarazada. Para reducir al máximo posibles factores confusores que podrían enmascarar esta relación lo idóneo es comparar con una población de mujeres no embarazadas no menopáusicas, del mismo rango de edad y de la misma área geográfica.

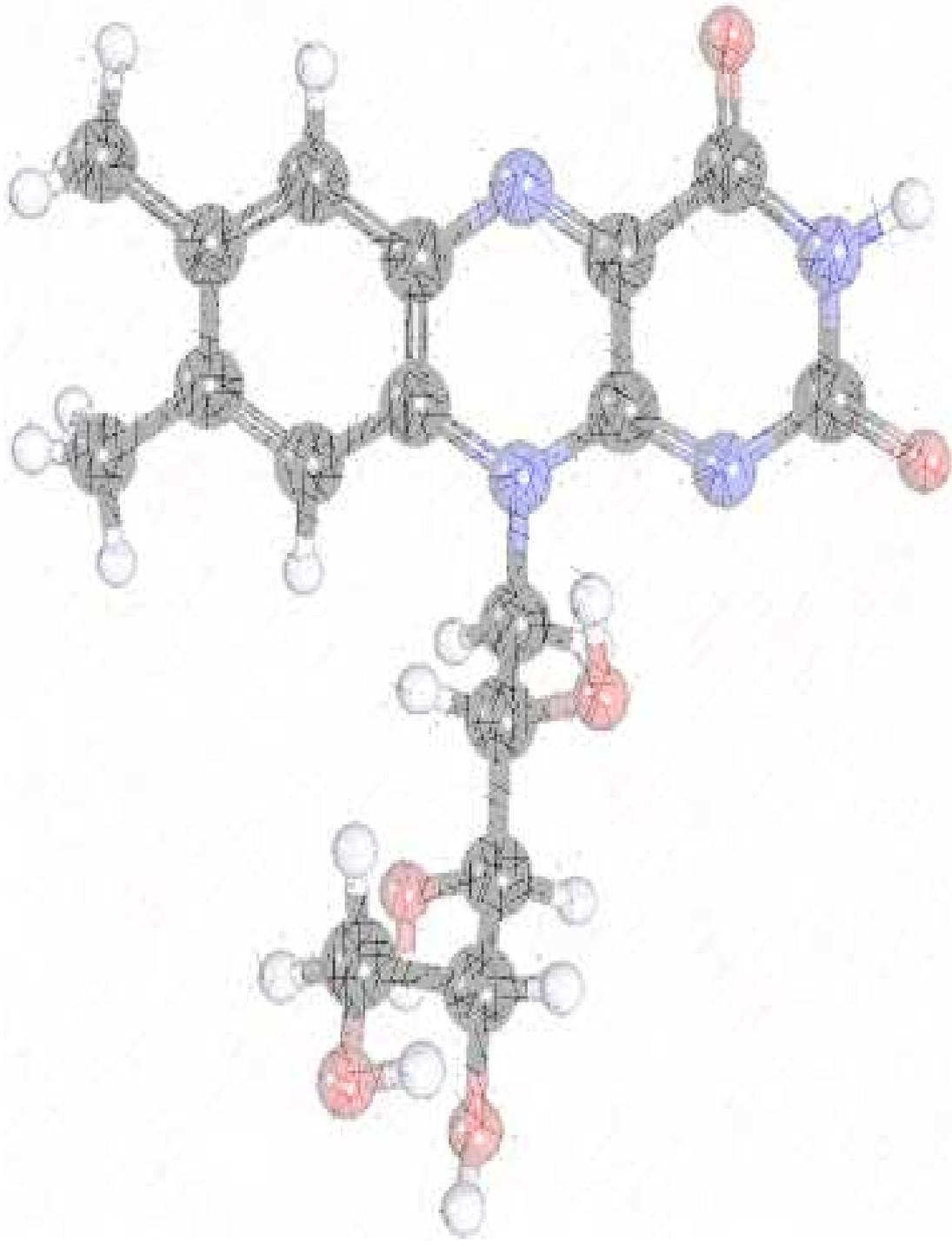
1.4. RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL EN EL CAMPO Y APORTACIONES DE ESTA TESIS

Tabla 4. Resumen de la situación actual en el campo y aportaciones de esta tesis

Conocido	Desconocido	Contribución
Existen algunos estudios que han investigado el comportamiento de tHcy en función de <i>MTHFR</i> 677 C>T en diferentes etapas del embarazo ^(76, 80, 176, 177) .	El comportamiento de tHcy en función de <i>MTHFR</i> 677 C>T según el estado en riboflavina de forma longitudinal desde el primer trimestre del embarazo hasta el final en un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico. Como el estado en folato afecta a este comportamiento	Apartado 6.1.3 Apartado 6.1.5
Estudios previos del comportamiento de tHcy en la presencia del alelo mutante para el polimorfismo <i>MTRR</i> 66 A>G han dado resultados dispares ^(151, 160-165) . Se ha descrito una mayor tHcy en la presencia del alelo mutante para el polimorfismo <i>MTRR</i> 524 C>T ⁽¹⁷⁸⁾ .	El comportamiento de tHcy en función de <i>MTRR</i> 66 A>G o <i>MTRR</i> 524 C>T según el estado en riboflavina en una población grande de un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico. Como el estado en cobalamina afecta a este comportamiento.	Apartado 4.1.2 Apartado 4.1.4
La riboflavina plasmática disminuye a lo largo del embarazo ^(179, 180) .	El comportamiento del indicador funcional de estado en riboflavina de forma longitudinal desde el primer trimestre del embarazo en una muestra grande de gestantes en un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico. Y el comportamiento de ésta en función del estado en folato.	Apartado 6.1.1
La tHcy disminuye durante el embarazo alcanzando su mínimo en el segundo trimestre ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ .	Como el estado en riboflavina influye sobre la evolución longitudinal de tHcy desde el primer trimestre del embarazo hasta el final en un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico.	Apartado 6.1.2

(Continúa en la página siguiente)

Conocido	Desconocido	Contribución
Cuando se está en un peor estado en riboflavina ser homocigótico para <i>MTHFR</i> 677 C>T se asocia con mayor tHcy ^(26, 80, 130, 132, 163, 181-183) .	No está claro si este efecto es independiente del estado en folato.	Apartado 4.1.2 Apartado 4.1.4
No se ha asociado la presencia del alelo mutante para el polimorfismo <i>MTRR</i> 66 A>G con una mayor tHcy ⁽¹⁷³⁾ .	El comportamiento de tHcy en función de <i>MTRR</i> 66 A>G o <i>MTRR</i> 524 C>T según el estado en riboflavina de forma longitudinal desde el primer trimestre del embarazo en una muestra grande de gestantes en un país desarrollado sin fortificación obligatoria con ácido fólico. Como el estado en cobalamina afecta a este comportamiento	Apartado 6.1.3 Apartado 6.1.5



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipòtesis principal

La riboflavina juega un papel crucial en el correcto funcionamiento de las enzimas MTHFR y MTRR, dos enzimas claves para la remetilación de la homocisteína a metionina. Un estado de deficiencia de riboflavina podría alterar la tHcy.

El efecto de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy podría variar según el estado en riboflavina.

Hipòtesis secundarias

El efecto de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy no depende sólo del estado en riboflavina sino también en el estado en los substratos de las enzimas que codifican; folato en el caso de MTHFR y cobalamina en el de MTRR.

La gestación es un estado fisiológico en el que se produce una demanda extra en los nutrientes implicados en el eje polimorfismo-tHcy. Este estrés podría alterar, dependiendo de la relación de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T con la tHcy y según el estado en riboflavina.

Objetivos

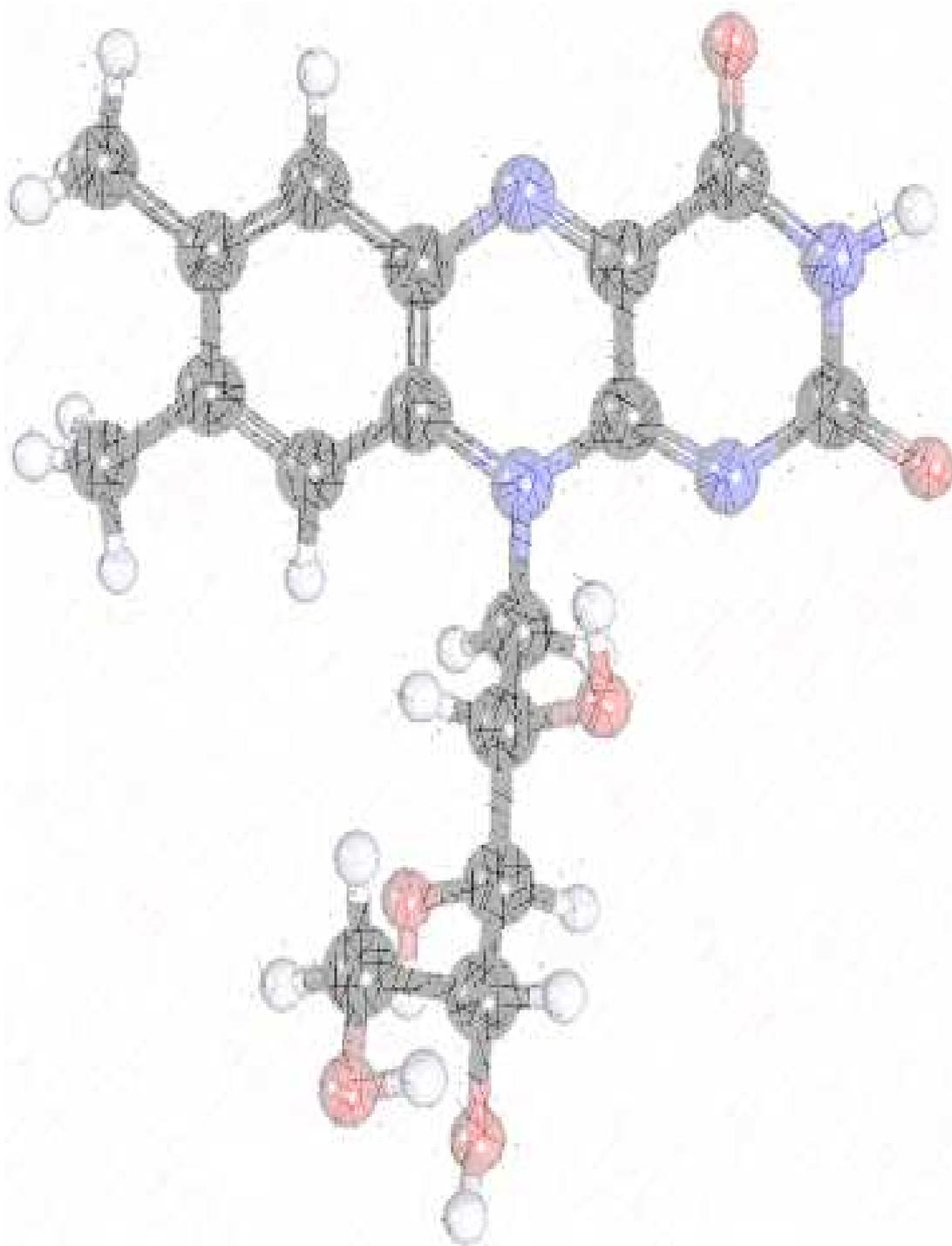
Investigar en una muestra representativa de una población adulta no expuesta a suplementos vitamínicos del tipo B ni a la fortificación obligatoria con ácido fólico.

1. La frecuencia de los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T y el estado nutricional en riboflavina en función de los diferentes genotipos.
2. La relación entre *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T y tHcy en función del estado en riboflavina.

3. Como el estado en los substratos de las enzimas afecta la relación riboflavina-polimorfismos-homocisteína según *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.
4. Repetir los análisis del objetivo 1 a 3 en las mujeres de edad fértil no embarazadas.

Investigar en un estudio longitudinal de embarazo:

1. La evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo y su relación con los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.
2. La evolución de la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en riboflavina, folato y cobalamina.
3. La relación entre *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T y tHcy en función del estado en riboflavina a lo largo del embarazo.
4. Como el estado en los substratos de las enzimas afecta la relación riboflavina-polimorfismos-homocisteína según *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T a lo largo del embarazo.



MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

3.1. PARTICIPANTES

3.1.1. Estudio poblacional

Es un estudio transversal llevado a cabo entre los años 1998 y 2002 en la *Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública* (MPiSP) de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* (FMCS) de la *Universitat Rovira i Virgili* (URV) en colaboración con los centros de atención primaria (CAP) de los municipios en los que el estudio tuvo lugar.

Los participantes formaban parte de una muestra representativa de la población adulta, de entre 18 y 75 años, estratificada por edad y sexo.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: uso de suplementos vitamínicos del grupo B, función renal alterada, uso de medicamentos que contengan como principio activo el ácido valproico o el metotrexato que afectan al metabolismo de los folatos, estar embarazada, haber dado a luz en los últimos 6 meses o estar en periodo de lactancia, tomar inhibidores de la bomba de protones.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética del *Hospital Universitari Sant Joan de Reus* (HUSJR) y de la fundación Jordi Gol i Gorina. A todos los participantes se les informó de la naturaleza del estudio y firmaron un consentimiento informado siguiendo las pautas de la declaración de Helsinki⁽¹⁸⁴⁾.

En la figura 3 se puede observar el proceso de reclutamiento de los participantes. Los participantes se seleccionaron de forma aleatoria a través del padrón de 1996 de los tres municipios en los que tuvo lugar el estudio. Se seleccionaron al azar 1563 posibles participantes a los que se les envió una carta informativa. Posteriormente se contactó de forma telefónica con ellos. Fue imposible contactar con 238 individuos debido a errores en los datos de registro (dirección, teléfono, etc.), cambios de residencia, defunción, etc. Se excluyeron las 101 personas que cumplieron los criterios de exclusión, mencionados anteriormente, 391 declinaron formar parte del estudio y 32 no acudieron a la cita concertada.

Finalmente participaron en el estudio 771 individuos, el 66% de los seleccionados elegibles.

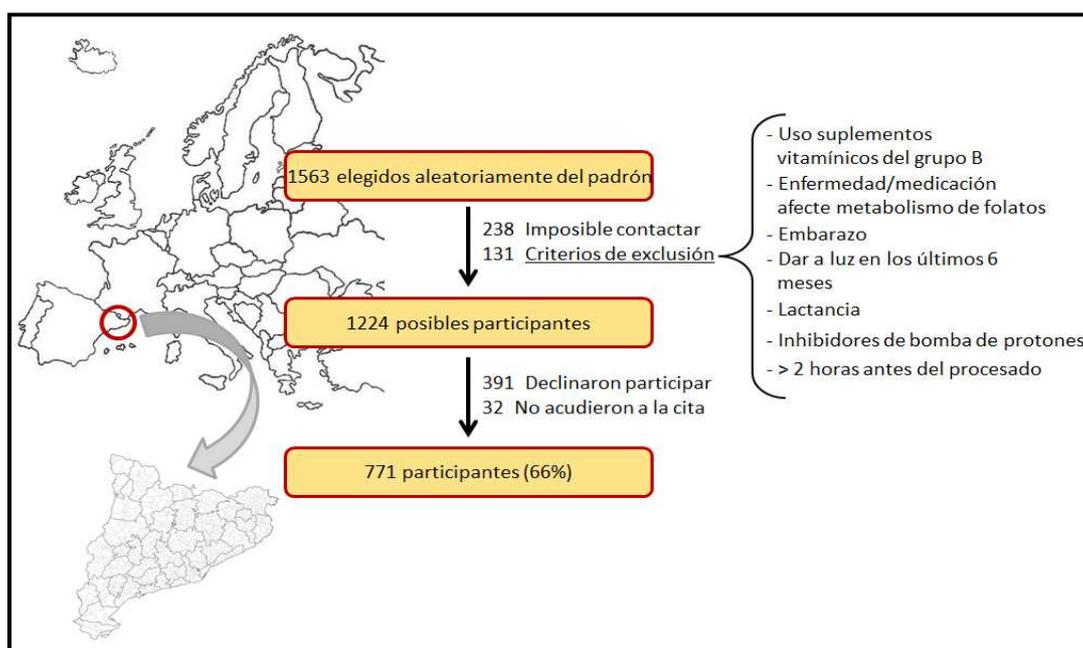


Figura 3. Diseño del reclutamiento de los participantes en el estudio poblacional.

A todos los participantes se les realizó una revisión médica en la que se les registró diferentes medidas antropométricas entre ellas el peso y la altura. También se les preguntó sobre hábitos y estilo de vida.

Los participantes completaron un registro dietético de tres días, dos laborables no consecutivos y uno de fin de semana. La cantidad de alimentos consumida se estimó mediante una entrevista con una dietista y con la ayuda de un álbum de fotografías de alimentos y de medidas caseras.

En ayunas y por punción de la vena antecubital se les extrajeron 20 mL de sangre (10 mL en un tubo con ácido etilendiamintetraacético tripotásico (EDTA-K₃) y 10 mL en un tubo sin anticoagulante). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento. Este procesamiento se programó para antes de 2 horas después de su extracción, ya que con el tiempo los eritrocitos liberan Hcy, siendo mayor esta liberación a temperatura ambiente, lo que provocaría un falso aumento de su concentración⁽¹⁸⁵⁾. Por este motivo posteriormente se eliminaron 30 individuos más debido a que transcurrió más de 2 horas entre la extracción y el procesamiento de la muestra.

3.1.2. Estudio longitudinal en una muestra de gestantes (NutCIR)

NutCIR (Nutrición y Crecimiento Intrauterino Retardado) es un estudio longitudinal que se lleva a cabo desde el 2004 en la MPiSP de la FMCS de la URV en colaboración con los servicios de Obstetricia y Ginecología del HUSJR y del *Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona* (HUJXXIII). A las mujeres que controlaban su embarazo en alguno de estos dos servicios se les ofreció participar si en la primera visita prenatal estaban de menos de 12 semanas de gestación. Los criterios de exclusión fueron: padecer alguna enfermedad crónica que afectase el estado nutricional o que requiriera algún tipo de intervención dietética, como puede ser la diabetes o la celiaquía, tomar medicamentos que interfirieran con el metabolismo de los folatos (como ácido valproico o metotrexato) y embarazos múltiples.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación Clínica de los dos hospitales. A todas las participantes se les informó sobre la naturaleza del estudio y firmaron un consentimiento tal y como establece la declaración de Helsinki⁽¹⁸⁴⁾.

En la figura 4 se puede observar el proceso de reclutamiento de las participantes. A los servicios de Obstetricia y Ginecología de los dos hospitales acudieron 1484 gestantes. Por los criterios de exclusión anteriormente citados 875 gestantes no fueron candidatas a participar. De las 609 posibles participantes 29 declinaron la invitación a participar en el estudio y 9 no acudieron a la primera cita, con lo que el número final de participantes fue de 571 gestantes, el 94% de las elegibles. De estas 571 gestantes se eliminaron 53 más (2 gestaciones múltiples, 2 muertes fetales, 6 abandonos del estudio, 35 abortos espontáneos, 8 ILE) con lo que el número total de nacidos vivos fue 518.

El diseño del estudio NutCIR se puede observar de forma esquemática en la figura 5.

El estudio conlleva la obtención de 6 muestras sanguíneas (5 maternas y 1 de cordón umbilical), 2 encuestas de hábitos y estilo de vida y en dos ocasiones una encuesta de frecuencia de consumo alimentario validada⁽¹⁸⁶⁾.

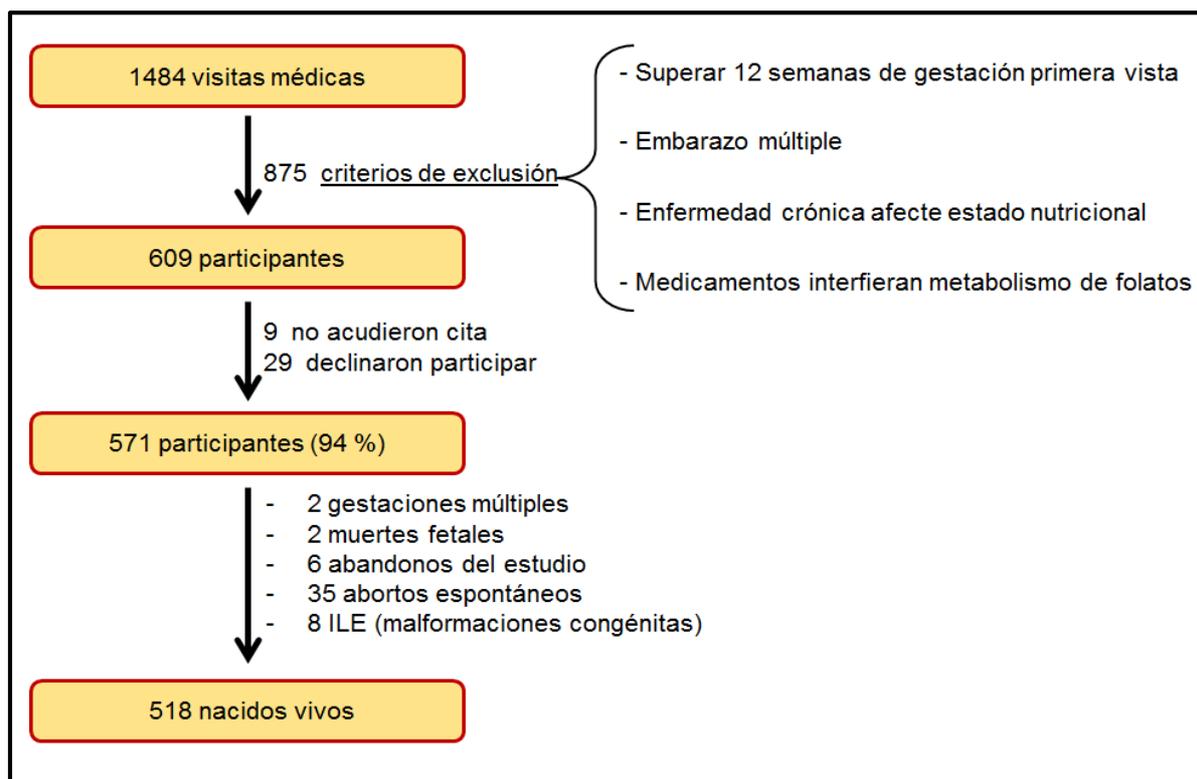


Figura 4. Diseño del reclutamiento de las participantes en el estudio NutCIR.

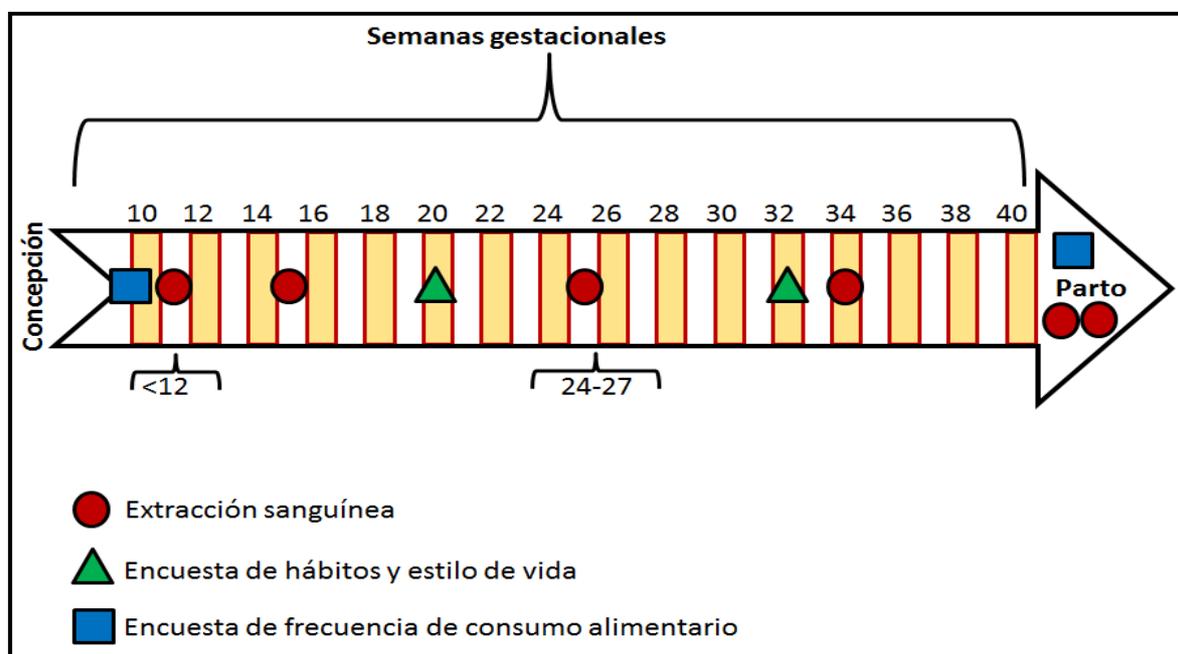


Figura 5. Diseño del estudio NutCIR.

Las cuatro primeras muestras se hicieron coincidir con las programadas de forma rutinaria según el protocolo de seguimiento del embarazo ⁽¹⁸⁷⁾ del *Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya*, la quinta se extraía cuando la mujer ingresaba en el hospital con trabajo de parto y la sexta extracción es de sangre de cordón umbilical. La primera extracción sanguínea se realizó antes de las 12 semanas de gestación (SG), la segunda a las 15 SG, la tercera entre las 24 y 27 SG y la cuarta a las 34 SG. En cada extracción se obtenían 20 mL de sangre (un tubo de 10 mL de EDTA-K₃ y otro de 10 mL sangre sin anticoagulante). Todas las extracciones se realizaron en ayunas, excepto la quinta (trabajo de parto).

Las dos encuestas de hábitos y estilo de vida se realizaron en la semana 20 y en la semana 32 mediante una entrevista. Entre otros datos se registraba el uso de suplementos vitamínicos (preparado, dosis y pauta) y el hábito de consumo de tóxicos. Se entregó una encuesta de frecuencia de consumo alimentario a las participantes al entrar en el estudio para que la autocompletaran para registrar los hábitos dietéticos durante el primer trimestre del embarazo y la otra encuesta de frecuencia de consumo se realizó el día después del parto cubriendo la segunda mitad del embarazo (ver anexo 1).

A las gestantes se les recetó 400 µg diarios de ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). El compuesto prescrito a las participantes también contenía 2 µg de cianocobalamina.

Para esta tesis se han utilizado los datos obtenidos de las extracciones sanguíneas correspondientes a las <12, 24-27 y 34 SG y de las dos encuestas de hábitos y estilo de vida que se realizaron a las 20 y 32 SG.

3.2. PROCESADO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

Los procedimientos normalizados de trabajo utilizados preveían que antes de que transcurriesen dos horas desde la extracción de la muestra sanguínea se iniciaría el proceso de obtención de las diferentes fracciones sanguíneas necesarias para las distintas determinaciones bioquímicas.

El tubo con EDTA-K₃ se utilizó para obtener plasma sanguíneo y el tubo sin anticoagulante para obtener suero. En el anexo 2 se describe todo el proceso y en la Figura 6 se detalla de forma esquemática la obtención de las diferentes fracciones sanguíneas a partir del tubo con EDTA-K₃.

Las muestras se centrifugaron a 1800 x g durante 15 minutos a 4°C. El plasma sanguíneo resultante se congeló en alícuotas de 1 mL a -80°C hasta el momento de su posterior utilización para determinaciones bioquímicas.

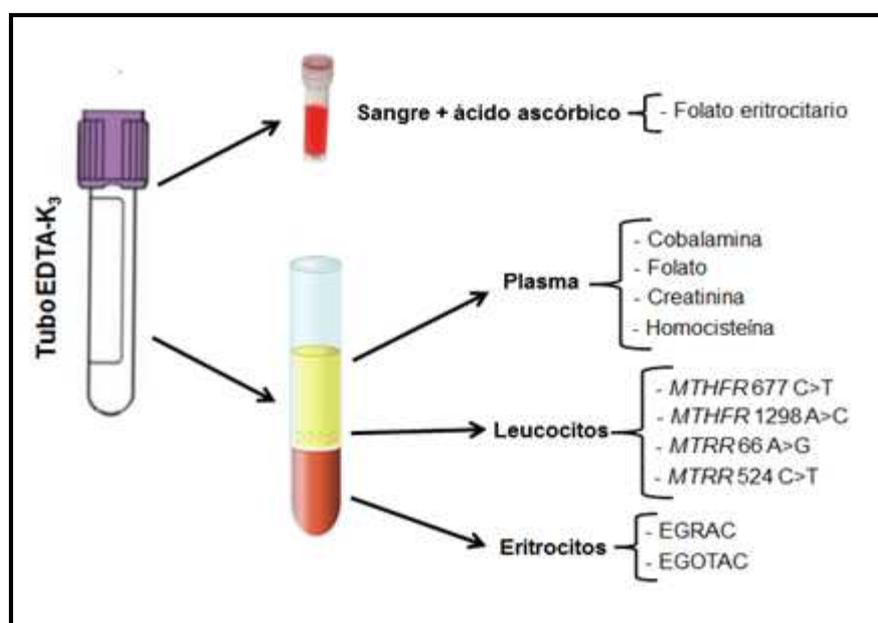


Figura 6. Esquema de obtención de las diferentes fracciones sanguíneas y las distintas determinaciones bioquímicas obtenidas a partir del tubo con EDTA-K₃.

Antes de centrifugar el tubo con EDTA-K₃ se procedió a la conservación de eritrocitos en ácido ascórbico, en dilución 1:10, para la determinación microbiológica de folatos eritrocitarios según el método descrito por Molloy y Scott⁽¹⁸⁸⁾. Esta alícuota fue conservada a -80°C en alícuotas de 250 µL hasta su posterior utilización.

3.2.1 Lavado y separación de eritrocitos

Una vez separado el plasma sanguíneo, para la posterior determinación de EGRAC, de la fracción restante de eritrocitos y leucocitos del tubo de EDTA-K₃ se depositaron 500 µL de eritrocitos en 5 mL de suero fisiológico (ver anexo 3). Para

proceder al lavado de los eritrocitos se centrifugó a 280 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y se añadió nuevamente 5 mL de suero fisiológico. Este proceso de lavado se repitió tres veces. Una vez terminado el proceso de lavado los eritrocitos se diluyeron y lisaron con agua Mili-Q (relación 1/5) y se conservaron en alícuotas de 350 µL a -80°C. Todo este proceso se realiza sobre hielo.

Una vez descongelada la muestra para su determinación la muestra no se puede volver a congelar. Estas muestras no pueden verse sometidas al proceso de congelación-descongelación ya que se ve afectada la actividad enzimática.

3.2.2 Obtención de leucocitos

Una vez separado el plasma sanguíneo y los eritrocitos, del restante del tubo de EDTA-K₃ se obtuvo la fracción de leucocitos. Para lograr la fracción de leucocitos se le añadió solución buffer de fosfatos (PBS) al restante del tubo de EDTA-K₃ (ver anexo 3). Una vez homogeneizado por inversión (no menos de nueve veces) todo el contenido se vierte en 50 mL de solución de hemólisis (ver anexo 3) y se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido este periodo se centrifugó a 2200 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se descartó y se procedió al lavado de los leucocitos con solución de hemólisis, una vez limpio el botón de leucocitos se resuspendió en 20 mL de solución de hemólisis y se centrifugó nuevamente a 2200 x g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se descartó y el botón de leucocitos una vez eliminado el exceso de solución de hemólisis se resuspendió en 900 µL de PBS y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización para la obtención de ADN.

3.2.3. Extracción del ADN

Es un proceso que consta de tres etapas y que se realizó mediante el kit de extracción *Puregene* (*Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA*) a partir de los leucocitos congelados en PBS.

La primera etapa es la de la lisis celular. Esta etapa se llevó a cabo a partir de los leucocitos ya descongelados que se traspasaron a un tubo con 10 mL de *Cell Lysis Solution* (ref. D-5F2, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). Esta solución se dejó reposar a temperatura ambiente y en ausencia de luz el tiempo necesario para que las células se lisaran. El tiempo de lisis depende de la concentración de leucocitos, pero normalmente era de aproximadamente un mes.

La segunda etapa consiste en la precipitación proteica. Las células ya lisadas se mezclaron con 3,33 mL de *Protein Precipitation Solution* (ref. D-5F3, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) y se incubó durante 15 minutos en hielo. Acto seguido se procedió a la centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se mezcló con 10 mL de isopropanol frío. Se mezcló por inversión suavemente hasta obtener la medusa de ADN. Una vez obtenida la medusa de ADN se volvió a centrifugar a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se añadieron 10 mL de etanol al 70% en frío y se volvió a centrifugar a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C. Una vez finalizada esta nueva centrifugación se descartó otra vez el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente durante un periodo de 30 a 40 minutos.

La tercera y última etapa es la hidratación del ADN. Al botón de ADN se le añade 1200 µL de *DNA Hydration Solution* (ref. D-5F4, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) y se deja hidratar en agitación y a temperatura ambiente entre 3 y 4 días. Para la prevención de la contaminación por hongos se le añadió una gota de cloroformo. El criotubo se conservó a 4°C hasta el momento de la determinación genética.

3.2.4. Determinaciones bioquímicas y genéticas

3.2.4.1.- Determinación de homocisteína

En las muestras procedentes del estudio poblacional se determinó mediante inmunoensayo de polarización de la fluorescencia utilizando el kit *IMx Homocysteine* (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA).

En las muestras del estudio NutCIR se determinó mediante HPLC acoplada a un detector de masas en los laboratorios de Bevital (*Bevital AS, Bergen, Noruega*).

3.2.4.2.- Determinación de folatos plasmáticos y eritrocitarios.

La determinación de los folatos eritrocitarios y plasmáticos se llevó a cabo mediante un ensayo microbiológico con *Lactobacillus casei*⁽¹⁸⁸⁾.

Las muestras del estudio poblacional se determinaron en el departamento de bioquímica del Trinity Collage de Dublín (*Trinity Collage, Dublín, Irlanda*).

Las muestras del estudio NutCIR se determinaron en los laboratorios de Bevital (*Bevital AS, Bergen, Noruega*) mediante el mismo método adaptado para posibilitar su robotización.

3.2.4.3.- Determinación de cobalamina

La determinación de la cobalamina se llevó a cabo mediante un ensayo microbiológico con *Lactobacillus leichmannii*⁽¹⁸⁹⁾.

Las muestras del estudio poblacional se determinaron en el departamento de bioquímica del Trinity Collage de Dublín (*Trinity Collage, Dublín, Irlanda*).

Las muestras del estudio NutCIR se determinaron en los laboratorios de Bevital (*Bevital AS, Bergen, Noruega*) mediante el mismo método adaptado para posibilitar su robotización.

3.2.4.4.- Determinación de creatinina

En las muestras procedentes del estudio poblacional se determinó mediante el método de Jaffé modificado utilizando un analizado COBAS Mira (*Roche, Basel, Switzerland*) y el kit de QCA (*ref. 998891, Química Clínica Aplicada S.A., Amposta, España*).

En las muestras del estudio NutCIR se determinó mediante HPLC acoplada a un detector de masas en los laboratorios de Bevital (*Bevital AS, Bergen, Noruega*).

3.2.4.5.- Determinación de EGRAC

Como se ha explicado anteriormente el EGRAC es marcador del estado funcional en riboflavina consistente en medir la actividad de la GR activada con FAD y dividirla por la actividad generada sin FAD exógeno.

Tanto las muestras del estudio poblacional como las del estudio NutCIR se determinaron siguiendo la técnica de Mount⁽²³⁾ y utilizando un analizador COBAS Mira (*Roche, Basel, Switzerland*).

Según el criterio clásico propuesto por McCormick se considera que valores de EGRAC superiores a 1,4 corresponden a deficiencia de riboflavina, los valores entre 1,2 y 1,4 son considerados borderline y los valores de EGRAC inferiores a 1,2 son los que corresponden a los estados óptimos de riboflavina⁽¹⁵⁾.

A continuación se describe el proceso que se siguió para determinar el EGRAC.

Cada día, antes de iniciar el análisis de las muestras, se realizaban dos determinaciones por triplicado de una muestra control de concentración conocida (ver anexo 4). Si la variación del valor de lectura entre ambas tandas o con el valor de referencia era superior al 10% no se proseguía con las determinaciones de las muestras y se revisaban todos los reactivos y tampones.

Se repetía el proceso hasta obtener una variación dentro de los límites aceptados.

Las muestras se descongelaron sobre hielo. En el caso del estudio NutCIR todas las muestras procedentes de una misma participante se analizaban juntas en una misma tanda. Junto con las muestras sobre hielo también se descongela una alícuota de FAD de concentración 100 μM (ver anexo 5).

Durante la descongelación de las muestras se preparaban los reactivos y tampones necesarios para la determinación. Primero se preparaba el tampón fosfato (TF) mezclando el TF A (K_2HPO_4) y el TF B (KH_2PO_4) en una relación aproximada de 4:1 hasta obtener una solución tampón de pH de 7,4 (ver anexo 5). Posteriormente se

preparaba el NADPH de concentración 2 mM con TF (ver anexo 5). Este reactivo se preparaba protegido de la luz ya que el NADPH es sensible a ésta.

Después se preparaba el GSSG a una concentración de 20 mM con TF (ver anexo 5).

Por último se preparaba el agente reactivo (RA) que se obtiene mezclando el TF con agua milli-Q (22,5 mL TF con 17,5 mL H₂O).

Una vez descongeladas las muestras se preparaban las alícuotas para la determinar la actividad basal y la actividad estimulada. La alícuota para determinar la actividad basal consistía en 90 µL de H₂O milli-Q y 10 µL de muestra y para la estimulada en 88 µL de H₂O milli-Q y 10 µL de muestra y 2 µL de FAD.

Las muestras se incubaban en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se comprobaba que no hubiera ninguna burbuja de aire dentro de la muestra que pudiese falsear los resultados.

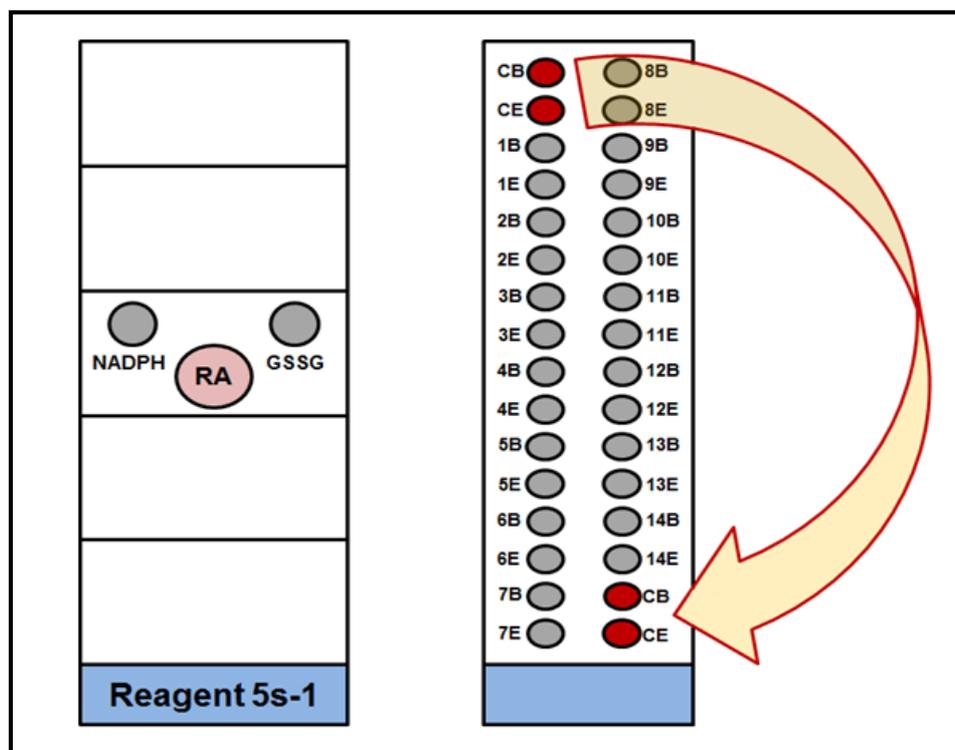


Figura 7. Representación esquemática de la ubicación de las muestras, los reactivos y los controles en el COBAS Mira. *CB*: Control Basal; *CE*: Control Estimulado; *nB*: Muestra Basal; *nE*: Muestra Estimulada.

La primera muestra de cada tanda era el control diario que una vez determinado pasa a ocupar el último lugar de la tanda (figura 7). Si el valor conocido de esta muestra difería más de un 10% entre la primera y la última lectura o con el valor de la lectura de la tanda control, la tanda no se aceptaba como válida.

Para que se llevara a cabo la reacción (ver apartado 1.1.4.5) eran necesarios 4 μL de muestra, 356 μL de H_2O milli-Q, 20 μL de NADPH y 20 μL de GSSG. Esta reacción se producía por triplicado y a 37°C. Tras una incubación de 10 minutos se procedía a la lectura de la absorbancia a 340 nm.

El coeficiente se obtuvo mediante la división de la media de las lecturas de la muestra estimulada por la media de las lecturas de las muestras basales.

Esta técnica presentó un coeficiente de variación interensayo de 3,95% y un coeficiente de variación intraensayo de 2,66%.

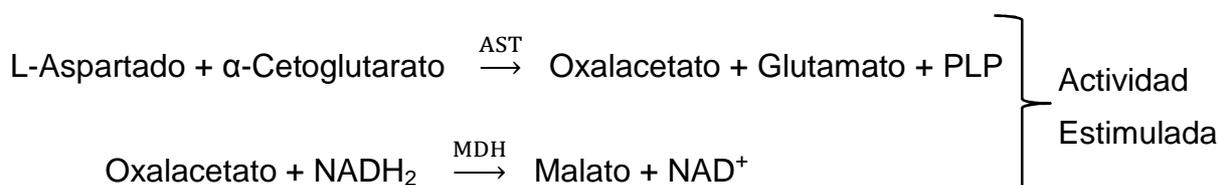
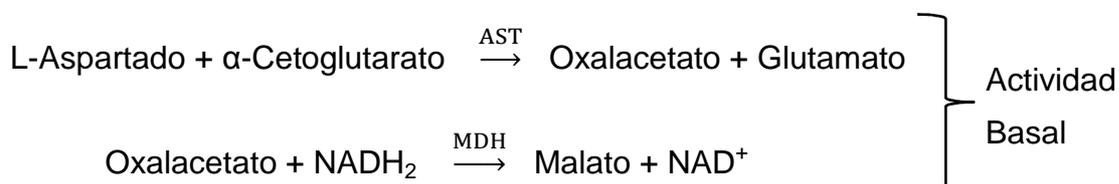
3.2.4.6.- Determinación de EGOTAC

El coeficiente de activación de la glutamato-oxalacetato transaminasa eritrocitaria o EGOTAC según sus siglas en inglés es un método para determinar el estado funcional en piridoxina o vitamina B₆.

Este método consistente en medir la actividad de la glutamato-oxalacetato transaminasa [GOT (EC 2.6.1.1)] también llamada amino aspartato transferasa (AST) activada con piridoxal-5'-fosfato (PLP), una de las formas activas de la vitamina B₆, y dividirla por la actividad generada sin PLP exógeno.

Este método conlleva dos reacciones acopladas. En la primera la AST que tiene piridoxina como cofactor cataliza la transferencia de un grupo amino del aspartato al cetoglutarato obteniéndose oxalacetato y glutamato. Para la segunda reacción es necesaria la participación de la malato deshidrogenasa [MDH (EC 1.1.1.37)] que

cataliza la reducción del oxalacetato a malato siendo NADH_2 el donador de electrones. El NADH_2 se oxida a NAD^+ y se monitoriza a 340 nm.



La EGOTAC de las muestras se determinaron siguiendo la técnica de Mount⁽²³⁾ y utilizando un analizador COBAS Mira (*Roche, Basel, Switzerland*).

El valor de EGOTAC sólo está disponible de las muestras de la población, los valores de las muestras del estudio NutCIR estaban todavía pendientes de determinar en el momento del redactado de esta tesis doctoral.

3.2.4.7.- Determinación genética

Se determinaron los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas del ciclo de los folatos que tienen riboflavina como cofactor, *MTHFR* 677 C>T y *MTHFR* 1298 A>C, o son flavoproteínas, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

Todas las determinaciones genéticas se realizaron en los laboratorios de Bevital (*Bevital AS, Bergen, Noruega*) a excepción del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T del estudio poblacional que se realizó siguiendo la técnica de Frosst⁽⁷⁸⁾ en los laboratorios de la FMCS.

3.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA) versión 20.0 para Windows. El nivel de significación utilizado fue de $p < 0,05$ para contrastes bilaterales.

Las variables cuantitativas se describen con media e intervalo de confianza al 95% y las variables cualitativas como porcentaje e intervalo de confianza al 95%.

A las variables de los parámetros bioquímicos se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los valores. A las variables que no presentaban una distribución normal se les aplicó una transformación logarítmica. Entonces se describen con medias geométricas e intervalo de confianza al 95%.

Para comparar las medias entre grupos se utilizó el análisis de la varianza. Para mantener el riesgo de error tipo I en el nivel deseado ($p < 0,05$) se aplicó la corrección de Bonferroni en el caso de realizar comparaciones múltiples.

Diremos que existe interacción cuando la relación entre el polimorfismo y la concentración de tHcy es diferente según el estado en riboflavina. Se explora la presencia de interacción mediante los denominados términos de interacción introducidos como variable independiente en modelos de regresión lineal múltiple.

3.3.1. Estudio poblacional

Es necesario definir qué puntos de cortes utilizamos cuando hablamos de estado en riboflavina eritrocitaria, folato y cobalamina plasmática.

Para la descripción del estado nutricional en riboflavina eritrocitaria la asignación de los participantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según los valores de EGRAC propuestos por McMormick. Se considera que valores de EGRAC iguales o superiores a 1,4 corresponden a deficiencia de riboflavina, los valores entre 1,2 y 1,4 son considerados borderline y los valores de EGRAC iguales o inferiores a 1,2 son los que corresponden a los estados óptimos de riboflavina⁽¹⁵⁾

Para los análisis del estado en riboflavina según genotipo la asignación de los participantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según terciles de EGRAC.

El estado bajo en riboflavina corresponde al tercil alto de EGRAC ($\geq 1,41$), el medio al tercil medio de EGRAC ($\geq 1,23 < 1,41$) y el estado alto en riboflavina corresponde al tercil bajo de EGRAC ($< 1,23$).

La asignación de los participantes a grupo de estado en folato se realiza según terciles de folato plasmático. El estado bajo en folato corresponde al tercil bajo ($< 9,1$ nmol/L), el estado medio en folato al tercil medio ($\geq 9,1 < 14,7$ pmol/L) y el estado alto corresponde al tercil alto ($\geq 14,7$ pmol/L).

La asignación de los participantes a grupo de estado en cobalamina se realiza según terciles de cobalamina plasmática. El estado bajo en cobalamina corresponde al tercil bajo (< 300 pmol/L), el estado medio en cobalamina al tercil medio ($\geq 300 < 403$ pmol/L) y el estado alto corresponde al tercil alto (≥ 403 pmol/L).

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T
 - variable dependiente:** IntHcy
 - variable independiente:** Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.
 - variables de ajuste:** cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.
- Cuando se estudió en función de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T
 - variable dependiente:** IntHcy
 - variable independiente:** Ser portador del alelo mutante G o T respecto a no serlo.
 - variables de ajuste:** cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portador del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portador del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático (según terciles) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática (según terciles) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portador del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portador del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Para investigar la posible existencia de una interacción entre la riboflavina eritrocitaria y el genotipo sobre la tHcy se utilizaron regresiones lineales múltiples.

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

- Cuando se estudió en función de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portador del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portador del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

Cuando se investigaba esta posible interacción en función del estado en cobalamina (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portador del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portador del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro de estudio.

3.3.2. Mujeres en edad fértil no embarazadas y no suplementadas con vitaminas del grupo B

La asignación de las participantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según terciles de EGRAC. El estado bajo en riboflavina corresponde al tercil alto de EGRAC ($\geq 1,51$), el medio al tercil medio de EGRAC ($\geq 1,29 < 1,51$) y el estado alto en riboflavina corresponde al tercil bajo de EGRAC ($< 1,29$).

El estado en cobalamina plasmática se estudiará en función de valores superiores o inferiores a la mediana de cobalamina. Se define estar por debajo de la mediana de cobalamina como estado bajo en cobalamina (< 326 pmol/L) y estar por encima de la mediana de cobalamina como estado alto en cobalamina (≥ 326 pmol/L).

El estado en folato plasmático se estudiará en función de valores superiores o inferiores a la mediana de folato. Se define estar por debajo de la mediana de folato como estado bajo en folato ($< 10,2$ nmol/L) y estar por encima de la mediana de folato como estado alto en folato ($\geq 10,2$ nmol/L).

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

- Cuando se estudió en función de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portadora del alelo mutante G o T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portadora del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portadora del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática (según valores por encima o por debajo de la mediana) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portadora del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portadora del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Para investigar la posible existencia de una interacción entre la riboflavina eritrocitaria y el genotipo sobre la tHcy se utilizaron regresiones lineales múltiples.

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T versus no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

- Cuando se estudió en función de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Cuando se investigaba esta posible interacción en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

Cuando se investigaba esta posible interacción en función del estado en cobalamina (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro de estudio.

3.3.3. Estudio longitudinal en una muestra de gestantes (NutCIR)

Para estudiar cómo evolucionaba el estado en riboflavina eritrocitaria durante el embarazo se utilizó un análisis de la varianza de medidas repetidas con corrección post-hoc de Bonferroni.

Es necesario indicar a qué punto del embarazo nos referimos cuando hablamos de estado en riboflavina eritrocitaria, folato y cobalamina plasmáticos.

Para la descripción del estado nutricional en riboflavina eritrocitaria a lo largo del embarazo la asignación de los participantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según los valores de EGRAC propuestos por McMormick. Se considera que valores de EGRAC superiores a 1,4 corresponden a deficiencia de riboflavina, los valores entre 1,2 y 1,4 son considerados borderline y los valores de EGRAC inferiores a 1,2 son los que corresponden a los estados óptimos de riboflavina⁽¹⁵⁾.

Para los análisis del estado en riboflavina según genotipo la asignación de los participantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según terciles de EGRAC.

El porcentaje de mujeres que toman suplementos vitamínicos que contengan riboflavina es muy bajo, así pues, el estado en riboflavina debería de variar solamente por el efecto del embarazo, que se supone es el mismo en todas, con lo que no es de esperar que una mujer que empiece el embarazo en el tercil alto lo acabe en el tercil bajo de riboflavina y viceversa.

Teniendo en cuenta esto la asignación de las gestantes a grupo de estado en riboflavina se realiza según los terciles de EGRAC que presentaban las mujeres en el primer punto, es decir <12 SG. El estado bajo en riboflavina corresponde al tercil alto de EGRAC ($\geq 1,17$), el medio al tercil medio de EGRAC ($\geq 1,17 < 1,09$) y el estado alto en riboflavina corresponde al tercil bajo de EGRAC ($< 1,09$).

El estado en cobalamina plasmática se estudiará en función de valores superiores o inferiores a la mediana de cobalamina. La asignación de las gestantes al grupo por encima o por debajo de la mediana de cobalamina plasmática se realiza con los valores que presentaban las mujeres al inicio del embarazo (<12 SG). El motivo de escoger este punto es el mismo que en el caso del estado en riboflavina. Se define estar por debajo de la mediana de cobalamina como estado bajo en cobalamina (<372 pmol/L) y estar por encima de la mediana de cobalamina como estado alto en cobalamina (≥ 372 pmol/L).

El estado en folato plasmático se estudiara en función de valores superiores o inferiores a la mediana de folato. La asignación de las gestantes al grupo por encima o por debajo de la mediana de folato plasmático se realiza en dos puntos diferentes, uno al inicio del embarazo (<12 SG) y otro en el segundo trimestre (24–27 SG). El efecto de la suplementación con ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo podría desaparecer una vez se deja de tomar, por eso aplicamos dos puntos diferentes uno durante la suplementación con ácido fólico y otro una vez ha finalizado la suplementación con éste.

A los <12 SG se define estar por debajo de la mediana de folato como estado bajo en folato (<27,9 nmol/L) y estar por encima de la mediana de folato como estado alto en folato ($\geq 27,9$ nmol/L).

A los 24–27 SG se define estar por debajo de la mediana de folato como estado bajo en folato (<11,3 nmol/L) y estar por encima de la mediana de folato como estado alto en folato ($\geq 11,3$ nmol/L).

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria (según terciles) a lo largo del embarazo se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

- Cuando se estudió en función de *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T*

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portadora del alelo mutante G o T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR 677 C>T*, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy durante la gestación en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótico para *MTHFR 677 C>T* respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en cobalamina plasmática (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portador del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portador del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy a lo largo de la gestación en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Para investigar cómo el genotipo influía sobre la tHcy durante el embarazo en función del estado en cobalamina plasmática (según valores por encima o por debajo de la mediana) y en riboflavina eritrocitaria (según terciles) se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

variable dependiente: IntHcy

variable independiente: Ser portador del alelo mutante G para *MTRR* 66 A>G o ser portador del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo.

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad,

partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Para investigar la posible existencia de una interacción entre la riboflavina eritrocitaria y el genotipo sobre la tHcy a lo largo del embarazo se utilizaron regresiones lineales múltiples. Las variables de ajustes son las variables correspondientes a cada punto del embarazo (<12 SG, 24–27 SG y 34SG).

- Cuando se estudió en función de *MTHFR* 677 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

- Cuando se estudió en función de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Cuando se investigaba esta posible interacción a lo largo del embarazo en función del estado en folato plasmático (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

Cuando se investigaba esta posible interacción a lo largo del embarazo en función del estado en cobalamina plasmática (según valores por encima o por debajo de la mediana) se utilizaron regresiones lineales múltiples.

variable dependiente: IntHcy

variables independientes: Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo, EGRAC y el término de interacción entre genotipo y EGRAC [(Ser portadora del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T respecto a no serlo) x (EGRAC)].

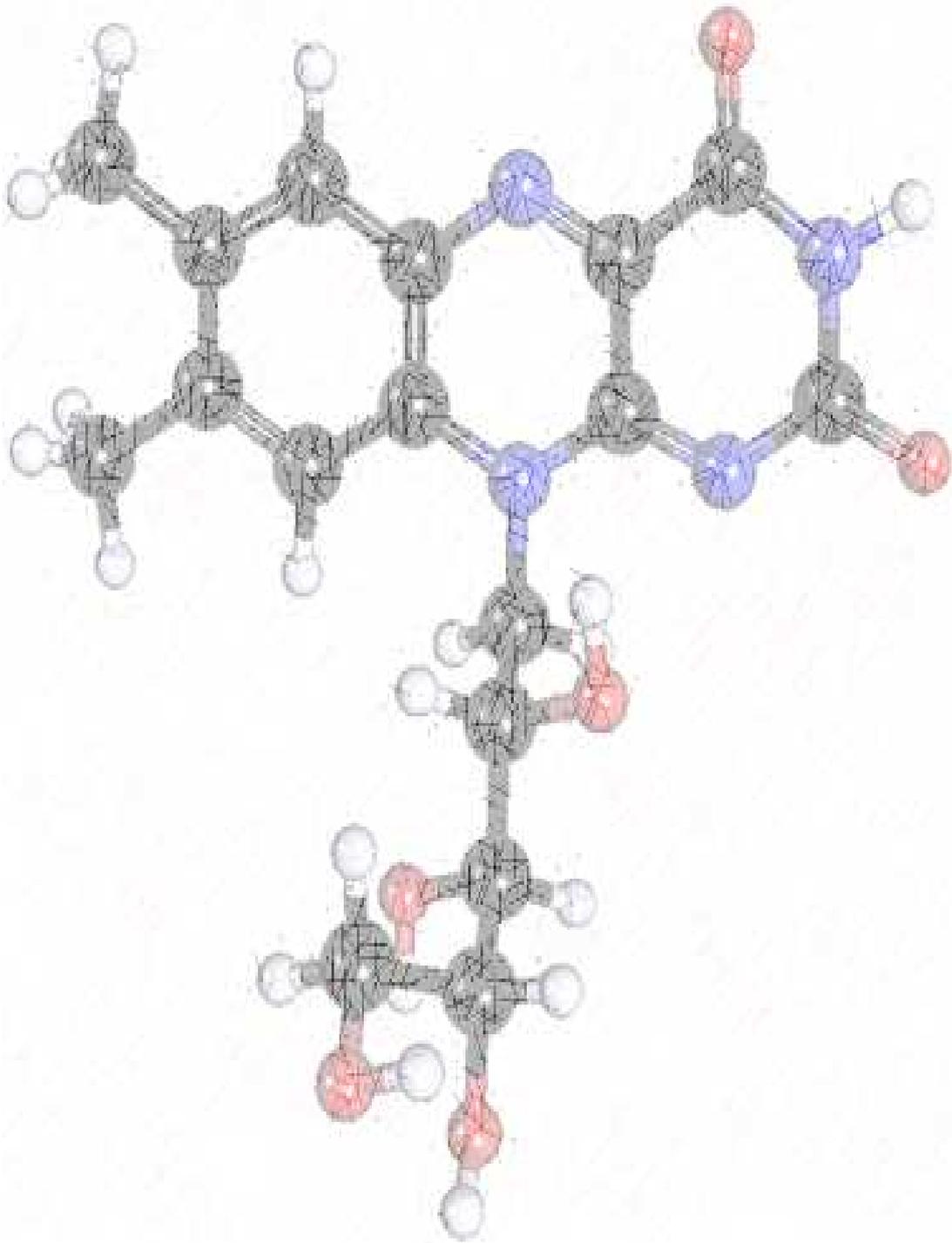
variables de ajuste: cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro de estudio.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



*ESTUDIO TRANSVERSAL
EN UNA POBLACIÓN
ADULTA NO
SUPLEMENTADA CON
VITAMINAS DEL GRUPO B*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

4.1. RESULTADOS

En la tabla 5 se pueden observar algunas de las características de la muestra de la población adulta estudiada. La media de edad de los participantes en el estudio era de 43 años y el 34,3% eran fumadores. El EGRAC medio de la muestra era de 1,38 y el 34% de esta presenta un estado deficiente en riboflavina ($EGRAC \geq 1,4$)⁽¹⁵⁾.

Tabla 5: Características de la muestra de la población adulta (n = 771)

Edad ¹ , años	42,7 (41,6 – 43,8)
Hombres, %	48,0 (44,5 – 51,5)
Fumadores, %	34,3 (31,1 – 37,8)
IMC ¹ , Kg/m ²	27,0 (26,7 – 27,4)
Alcohol ¹ , g/día	9,6 (8,3 – 10,9)
Folato plasmático ² , nmol/L	11,5 (11,0 – 11,9)
Folato eritrocitario ² , nmol/L	811 (789 – 833)
Creatinina sérica ² , µmol/L	72,1 (71,2 – 73,0)
Cobalamina plasmática ² , pmol/L	346 (337 – 355)
Homocisteína plasmática ² , µmol/L	9,6 (9,4 – 9,8)
EGRAC ¹	1,38 (1,36 – 1,39)
Estado en B ₂ bajo ($EGRAC \geq 1,4$), %	34,0 (30,7 – 37,4)
EGOTAC ¹	1,66 (1,64 – 1,68)

¹Media aritmética ²Media geométrica (IC 95%); *IMC*: Índice de Masa Corporal.

En la tabla 6 y tabla 7 se presenta el estado nutricional en algunas vitaminas del grupo B según sexo y edad y según genotipo respectivamente.

Tabla 6: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según sexo y edad

	Mujeres, años			Hombres, años		
	< 35 154 [39,7] ¹	≥ 35 a < 60 176 [45,4] ¹	≥ 60 58 [14,9] ¹	< 35 134 [37,3] ¹	≥ 35 a < 60 169 [47,1] ¹	≥ 60 56 [15,6] ¹
EGRAC²	1,46 (1,41 – 1,50)	1,34 (1,31 – 1,38) ^{***}	1,33 (1,26 – 1,39) ^{**}	1,41 (1,36 – 1,45)	1,36 (1,33 – 1,39)	1,32 (1,25 – 1,40) [*]
EGOTAC²	1,69 (1,65 – 1,72)	1,69 (1,65 – 1,72)	1,64 (1,58 – 1,70)	1,66 (1,63 – 1,70)	1,64 (1,61 – 1,68)	1,59 (1,53 – 1,65)
FP³, nmol/L	9,42 (8,75 – 10,15)	13,77 (12,74 – 14,89) ^{***,†††}	16,90 (14,54 – 19,63) ^{***}	8,60 (7,92 – 9,35)	11,60 (10,78 – 12,47) ^{***,†††}	14,96 (12,83 – 17,44) ^{***}
FE³, nmol/L	681 (643 – 722)	849 (805 – 896) ^{***,††}	985 (889 – 1091) ^{***}	712 (770 – 756)	881 (836 – 929) ^{***,††}	990 (897 – 1094) ^{***}
B₁₂³, pmol/L	319 (300 – 340)	377 (358 – 376) ^{***}	348 (315 – 386)	350 (331 – 371)	350 (332 – 368)	318 (286 – 353)
tHcy⁴, µmol/L	8,36 (8,04 – 8,69)	8,51 (8,23 – 8,80) ^{†††}	10,96 (10,14 – 11,85) ^{***}	10,03 (9,56 – 10,52)	10,32 (9,98 – 10,68) ^{†††}	11,65 (11,03 – 12,30) ^{***}

¹Número de individuos en el grupo [%] ²Media aritmética ³Media geométrica ⁴Media geométrica ajustada por folato plasmático y centro del estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 vs < 35 años †† p<0,01 ††† p<0,001 vs ≥ 60 años.

Tabla 7: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según genotipo

	N [%]	EGRAC¹	EGOTAC¹	FP², nmol/L	FE², nmol/L	B₁₂², pmol/L	tHcy³, µmol/L
Todos	771 [100]	1,38 (1,36 – 1,39)	1,66 (1,64 – 1,68)	11,5 (11,0 – 11,9)	811 (789 – 833)	346 (337 – 355)	9,55 (9,37 – 9,73)
MTHFR 677							
CC	276 [35,9]	1,39 (1,36 – 1,42)	1,66 (1,63 – 1,69)	12,4 (11,6 – 13,2)	888 (850 – 928)	356 (342 – 371)	9,14 (8,87 – 9,41)
CT	356 [46,3]	1,38 (1,36 – 1,41)	1,66 (1,64 – 1,69)	11,3 (10,7 – 12,0)* [†]	822 (792 – 853)** ^{††}	340 (328 – 353)	9,34 (9,10 – 9,58) ^{††}
TT	137 [17,8]	1,35 (1,31 – 1,39)	1,66 (1,63 – 1,70)	10,1 (9,2 – 11,1)***	654 (612 – 698)***	340 (317 – 363)	11,06 (10,49 – 11,68)***
MTRR 66							
AA	194 [25,9]	1,39 (1,35 – 1,43)	1,68 (1,65 – 1,70)	11,0 (10,1 – 11,9)	769 (730 – 811)	356 (339 – 374)	9,25 (8,92 – 9,61)
AG	375 [50,0]	1,38 (1,35 – 1,40)	1,66 (1,64 – 1,69)	11,9 (11,2 – 12,5)	830 (798 – 863)*	334 (321 – 348)* [†]	9,60 (9,34 – 9,86)
GG	181 [24,1]	1,37 (1,34 – 1,41)	1,64 (1,61 – 1,67)	10,9 (10,1 – 11,8)	813 (768 – 860)	357 (341 – 375)	9,74 (9,35 – 10,14)
MTRR 524							
CC	302 [40,2]	1,36 (1,34 – 1,39)	1,66 (1,64 – 1,69)	11,5 (10,8 – 12,2)	800 (767 – 834)	341 (327 – 356)	9,55 (9,30 – 9,81)
CT	348 [46,3]	1,39 (1,36 – 1,42)	1,66 (1,63 – 1,68)	11,3 (10,7 – 12,0)	817 (783 – 852)	346 (333 – 359)	9,61 (9,33 – 9,90)
TT	101 [13,5]	1,40 (1,35 – 1,44)	1,67 (1,62 – 1,71)	11,4 (10,3 – 12,7)	814 (759 – 873)	355 (331 – 382)	9,27 (8,70 – 9,89)

¹Media aritmética ²Media geométrica ³Media geométrica ajustada por folato plasmático y centro del estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 vs salvajes [†] p<0,05 ^{††} p<0,001 vs homocigóticos.

Se observó que el comportamiento del estado en vitaminas del grupo B en función de la edad fue similar en ambos sexos. El grupo de la población que presenta peor estado nutricional en riboflavina son los menores de 35 años. También se observó que el estado en folato mejoraba con la edad y que la tHcy era superior en el grupo de mayor edad (≥ 60 años), en cambio en los otros dos era similar (tabla 6).

En la tabla 7 se observa que los participantes homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban un peor estado en folato tanto plasmático como eritrocitario y una mayor tHcy que los heterocigóticos y salvajes para este mismo polimorfismo. El hecho que los homocigóticos tengan un comportamiento diferente a los heterocigóticos y salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de los homocigóticos respecto al de los heterocigóticos y salvajes (grupo de referencia) cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o folato plasmático.

También se puede observar que los GG para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G presentaban una mayor tHcy que los AG y AA y que la tHcy de los homocigóticos para *MTRR* 524 C>T era inferior a la de las otras variantes de este polimorfismo, aunque en ambos casos esta diferencia no era significativa. El hecho que los homocigóticos y heterocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G tengan un comportamiento diferente a los salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de los homocigóticos y los heterocigóticos respecto al de los salvajes cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o cobalamina plasmática. Por mimetismo utilizamos la misma estrategia con el polimorfismo *MTRR* 524 C>T.

En ningún caso se observa diferencias entre el estado en riboflavina y piridoxina en función del genotipo (tabla 7).

En la tabla 8 se puede observar la distribución de los genotipos para cada polimorfismo.

El 64,1% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 17,8% era homocigótica para este polimorfismo.

El 74,1% de la población era portadora del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 24,2% era homocigótica para este polimorfismo.

El 59,7% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 13,4% era homocigótica para este polimorfismo.

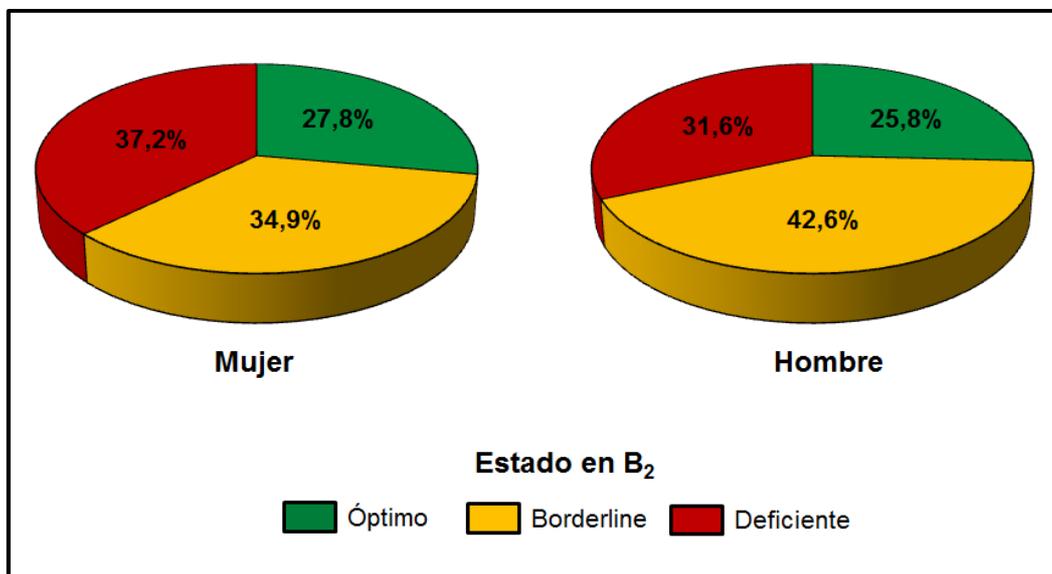
Tabla 8 : Distribución de los genotipos

	N	%
<i>MTHFR</i> 677 C>T		
CC	276	35,9
CT	356	46,3
TT	137	17,8
CT + TT	493	64,1
<i>MTRR</i> 66 A>G		
AA	194	25,8
AG	375	49,9
GG	182	24,2
AG + GG	557	74,1
<i>MTRR</i> 524 C>T		
CC	302	40,2
CT	348	46,3
TT	101	13,4
CT + TT	449	59,7

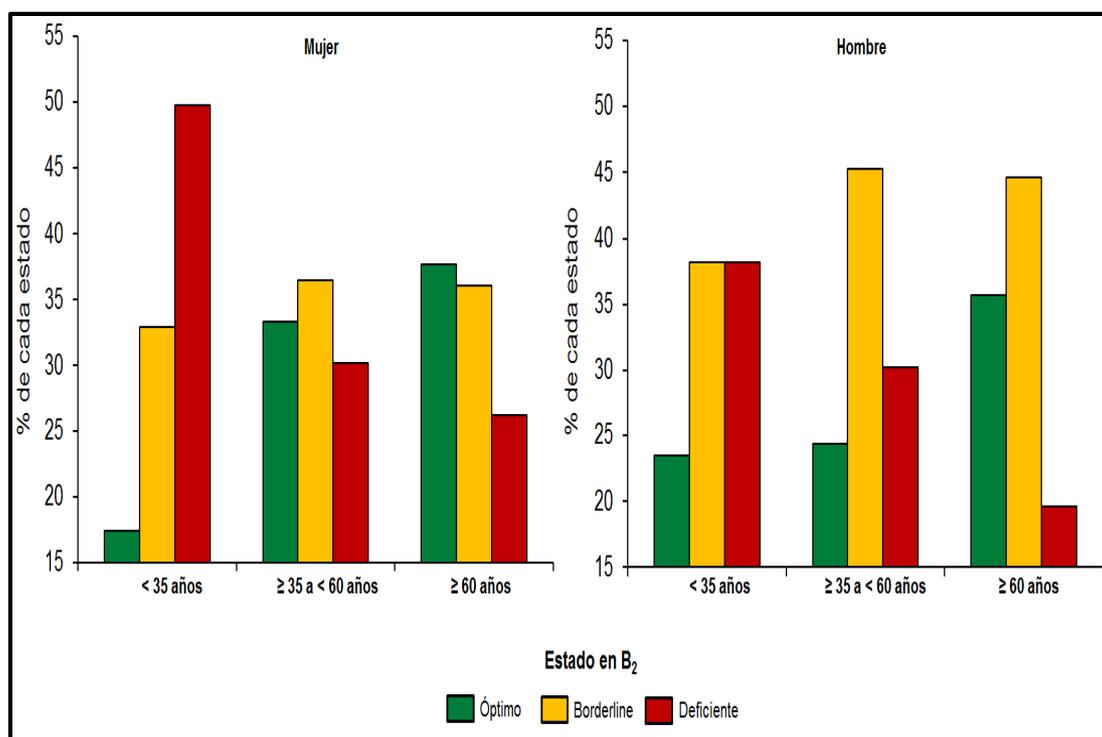
4.1.1. Estado en riboflavina de la población

Cuando se estudió el estado en riboflavina en la población según el sexo (gráfica 1) se observó que no existían grandes diferencias entre ellos, las mujeres presentaban

un mayor porcentaje de deficientes en riboflavina, pero en cambio los hombres tenían un porcentaje ligeramente más pequeño de individuos en estado óptimo.



Gráfica 1. Estado en riboflavina según sexo. Estado en riboflavina óptimo (EGRAC <1,2), borderline (EGRAC ≥1,2 a <1,4) y deficiente (EGRAC ≥1,4).



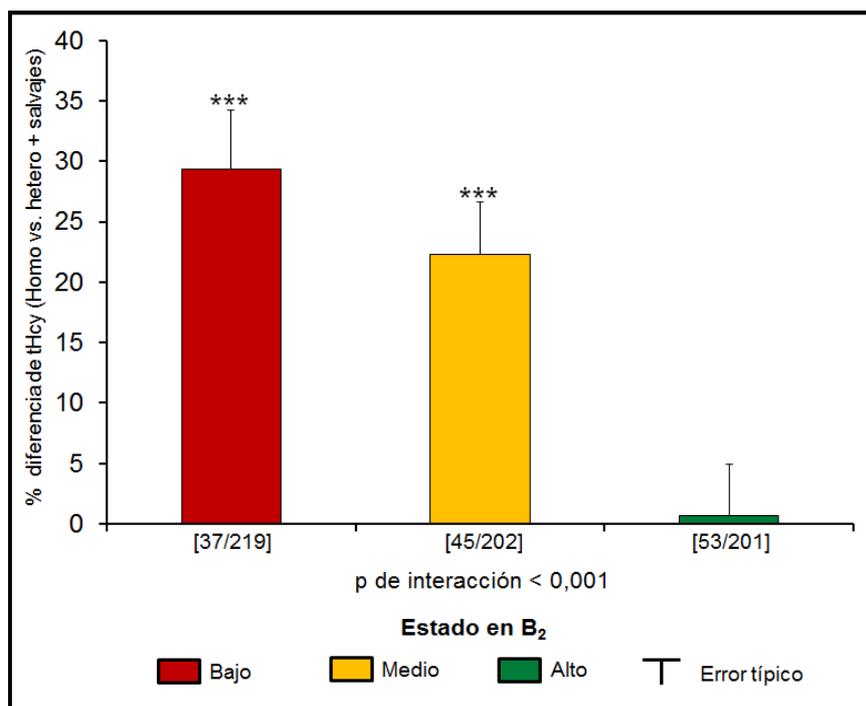
Gráfica 2. Estado en riboflavina según el sexo y el grupo de edad. Estado en riboflavina óptimo (EGRAC <1,2), borderline (EGRAC ≥1,2 <1,4) y deficiente (EGRAC ≥1,4).

En la gráfica 2 se puede observar el porcentaje de la población que se encontraba en cada estado de riboflavina en función del sexo y de la edad. El grupo de población que presentaba un mayor porcentaje de deficientes en riboflavina (EGRAC $\geq 1,4$), un 48,4%, era el grupo de las mujeres menores de 35 años. También se observa que aunque los valores son diferentes, el patrón era similar entre los dos sexos. Con la edad aumentaba el porcentaje de participantes que se encontraban en un estado óptimo de riboflavina y disminuía el porcentaje de deficientes, o lo que es lo mismo con la edad mejoraba el estado en riboflavina.

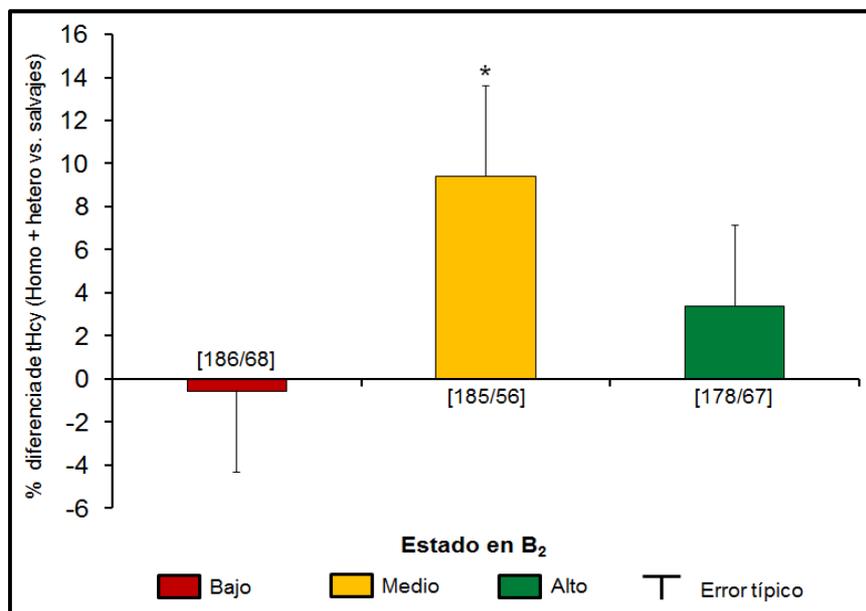
4.1.2. tHcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria

En este apartado lo que se investigará es cómo se modifica el comportamiento de la tHcy en función del estado en riboflavina cuando se compara ser homocigótico respecto a no ser homocigótico, en el caso de *MTHFR* 677 C>T, y ser portador del alelo mutante respecto a no portador, en el caso de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

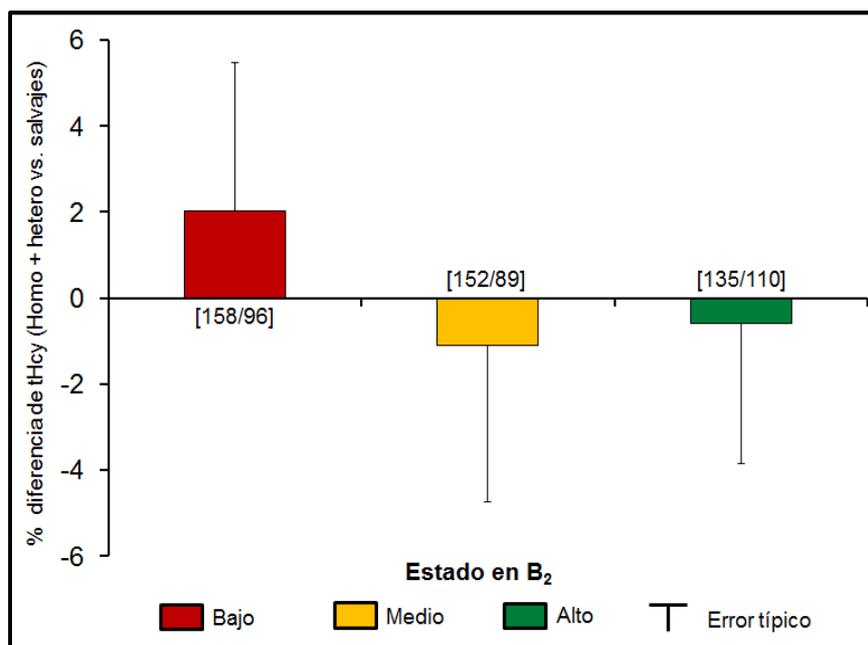
Los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaron una tHcy un 22,3% más elevada que el grupo de referencia, heterocigóticos o salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en el estado medio de riboflavina y un 29,3% más cuando se encontraban en el estado bajo de riboflavina. En cambio, en los participantes que presentaban un mejor estado en riboflavina el efecto de ser homocigótico sobre la tHcy era prácticamente nulo. También se observó que existía interacción (p de interacción $< 0,001$), definida como un cambio de la relación entre el polimorfismo y la tHcy en función del estado en riboflavina, entre *MTHFR* 677 C>T (homocigótico/no homocigótico) y EGRAC sobre la tHcy (gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio. *** p<0,001 vs. heterocigóticos + salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC ≥1,41), medio (EGRAC <1,41 y ≥1,23) y alto (EGRAC <1,23); [n homocigóticos / n heterocigóticos + salvajes].



Gráfica 4. Efecto de *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio.* p<0,05 vs. salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC ≥1,41), medio (EGRAC ≥1,23 <1,41) y alto (EGRAC <1,23); [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].



Gráfica 5. Efecto de *MTRR* 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio. Estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,41$), medio (EGRAC $\geq 1,23$ < 1,41) y alto (EGRAC < 1,23); [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].

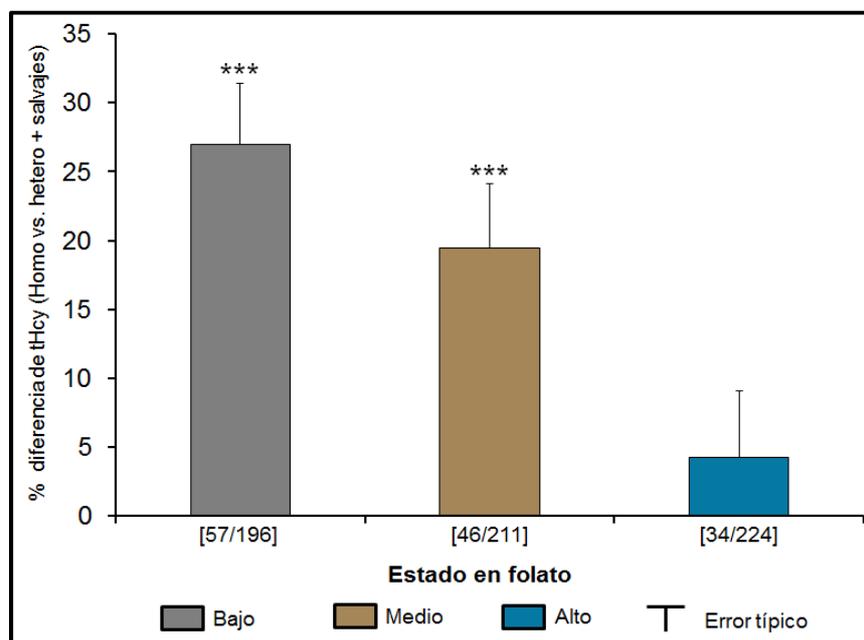
Los participantes portadores del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G que se encontraban en el estado medio o alto de riboflavina presentaban una tHcy superior a la que presentaban los salvajes para este mismo polimorfismo. La tHcy es sólo significativamente más elevada en el estado medio en riboflavina (gráfica 4).

En la gráfica 5 se puede ver que prácticamente no había un comportamiento diferente de la tHcy, entre los participantes homocigóticos o heterocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T respecto a los salvajes para este mismo polimorfismo, en función del estado en riboflavina. A pesar de eso, se observó una tendencia a disminuir la tHcy cuando el estado en riboflavina es medio o alto y a aumentar en los participantes que se encuentran en el estado bajo en riboflavina.

4.1.3. tHcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos

Como ya se ha mencionado anteriormente la función de MTHFR está relacionada íntimamente con el estado en folato, con lo que se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en folato plasmático (gráfica 6).

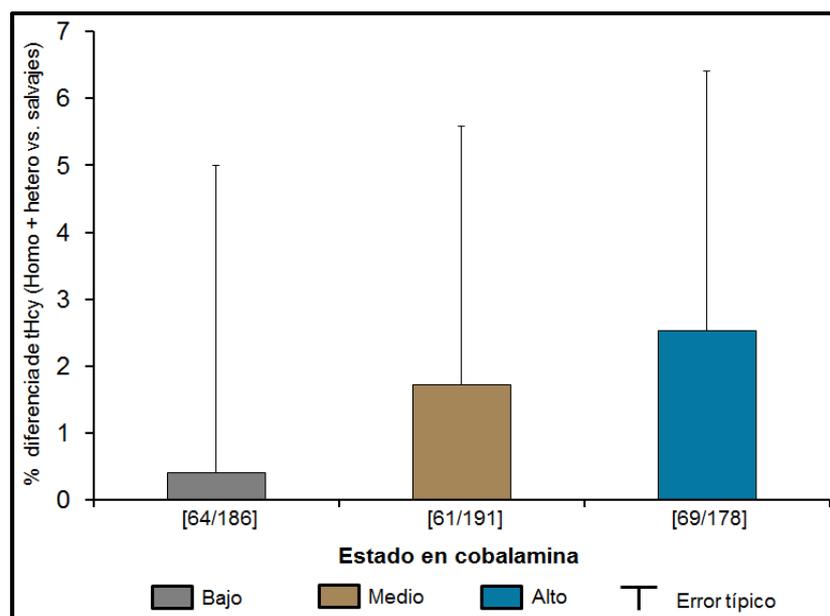
Los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en el estado bajo y medio de folato plasmático presentaron valores de tHcy un 19,5% y un 27,0% más elevados respectivamente que el grupo de referencia, heterocigóticos o salvajes para el mismo polimorfismo. En cambio en los participantes que se encontraban en el estado alto en folato plasmático el efecto del polimorfismo es mucho menor y no varía de forma significativa entre los diferentes genotipos.



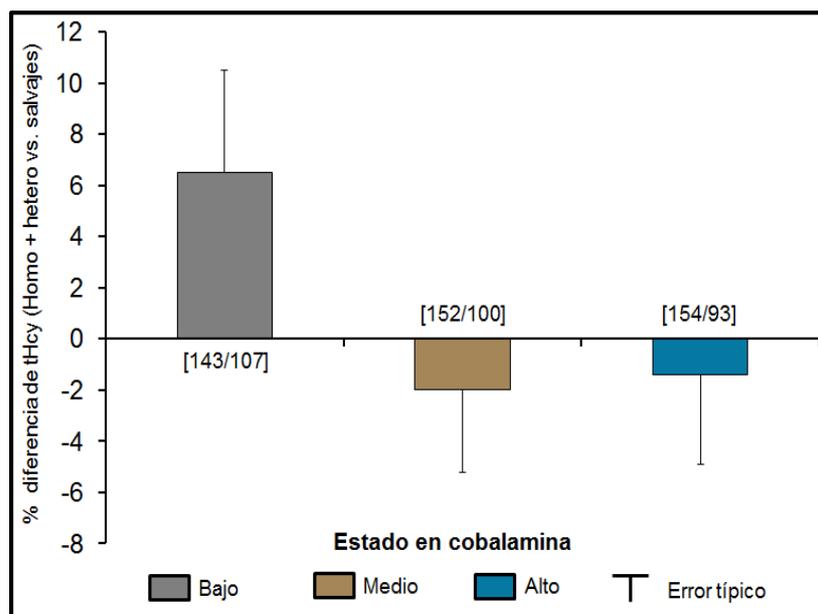
Gráfica 6. Efecto de *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en folato plasmático. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio. *** $p < 0,001$ vs. heterocigóticos + salvajes; estado en folato plasmático bajo ($< 9,1$ nmol/L), medio ($\geq 9,1$ a $< 14,7$ nmol/L) y alto ($\geq 14,7$ nmol/L); [n homocigóticos / n heterocigóticos + salvajes].

Al igual que la función de MTHFR está relacionada íntimamente con el estado en folato la función de MTRR está relacionada a su vez con la concentración de cobalamina plasmática, como ya hemos comentado anteriormente, así que se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en cobalamina (gráfica 7 y gráfica 8).

El estado en cobalamina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de los participantes portadores del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en comparación con los salvajes para este mismo polimorfismo. Aun así, se observó un ligero aumento de la tHcy a medida que aumentaba la concentración de cobalamina, aunque esta tendencia no era significativa en ningún estado de cobalamina (gráfica 7).



Gráfica 7. Efecto de *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con lnHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio. Estado en cobalamina plasmática bajo (<300 pmol/L), medio (≥300 a <403 pmol/L) y alto (≥403 pmol/L); [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].



Gráfica 8. Efecto de *MTRR* 524 C>T sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio con homocigóticos como variable independiente. Estado en cobalamina plasmática bajo (<300 pmol/L), medio (≥ 300 a <403 pmol/L) y alto (≥ 403 pmol/L); [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].

En la gráfica 8 se observa una mayor tHcy en los homocigóticos o heterocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T que en los salvajes para el mismo polimorfismo en los individuos que se encuentran en el estado bajo en cobalamina. En cambio, para los portadores del alelo mutante T que se encuentran en un estado alto en cobalamina el efecto es el contrario observándose una ligera disminución de la tHcy.

4.1.4. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

En la tabla 9 se puede ver el comportamiento de la tHcy cuando se compara en homocigóticos respecto a heterocigóticos o salvajes para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T en función del estado en folato plasmático y riboflavina eritrocitaria.

Se observó cómo independientemente del estado en folato si los participantes se encontraban en un estado alto en riboflavina, ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T no comportaba una mayor tHcy que el grupo de referencia. En cambio, cuando el estado en riboflavina no era alto presentar un estado en folato bajo o medio comportaba una mayor tHcy.

Tabla 9. Comportamiento de la tHcy según *MTHFR* 677 C>T y estado en riboflavina eritrocitaria y folato plasmático

Estado en riboflavina (EGRAC)	n	Coeficiente de regresión (TT vs CT+CC)			Modelo		
		% diferencia	Error típico	p	F	p	R ²
Tercil de folato bajo (<9,1 nmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[21/79]	30,1	0,066	<0,001	6,598	<0,001	43,0
Medio (≥1,23 a <1,41)	[16/62]	25,4	0,088	0,014	4,699	<0,001	44,7
Alto (<1,23)	[19/52]	9,5	0,084	0,287	2,128	0,049	25,3
Tercil de folato medio (≥9,1 a <14,7 nmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[12/76]	40,1	0,092	<0,001	4,365	<0,001	35,6
Medio (≥1,23 a <1,41)	[15/65]	15,6	0,069	0,039	4,946	<0,001	42,5
Alto (<1,23)	[18/67]	1,2	0,069	0,863	6,231	<0,001	54,7
Tercil de folato alto (≥14,7 nmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[4/64]	11,3	0,116	0,364	4,309	<0,001	39,8
Medio (≥1,23 a <1,41)	[14/75]	19,7	0,080	0,028	4,747	<0,001	40,5
Alto (<1,23)	[16/81]	-5,9	0,064	0,347	5,804	<0,001	49,8

Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, EGOTAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC y centro del estudio; con *MTHFR* 677 TT como variable independiente. R²=R² corregida por 100. % diferencia = % diferencia de tHcy (homocigótico vs hetero + salvaje); [n homocigóticos / n heterocigóticos + salvajes].

En la tabla 10 se puede ver el comportamiento de tHcy cuando se compara en homocigóticos o heterocigóticos respecto a salvajes para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G en función del estado en cobalamina plasmática y riboflavina.

Tabla 10. Comportamiento de la tHcy según *MTRR* 66 A>G y estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática

Estado en riboflavina (EGRAC)	n	Coeficiente de regresión (GG + GA vs AA)			Modelo		
		% diferencia	Error típico	p	F	p	R ²
Tercil de cobalamina bajo (<300 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[78/25]	-3,3	0,060	0,573	5,294	<0,001	38,3
Medio (≥1,23 a <1,41)	[53/19]	18,7	0,084	0,049	5,330	<0,001	52,5
Alto (<1,23)	[51/19]	10,3	0,128	0,453	1,085	0,420	3,1
Tercil de cobalamina medio (≥300 a <403 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[59/17]	-2,1	0,075	0,782	5,592	<0,001	46,4
Medio (≥1,23 a <1,41)	[63/18]	5,2	0,072	0,483	4,923	<0,001	45,9
Alto (<1,23)	[67/26]	-0,2	0,052	0,966	3,918	<0,001	38,7
Tercil de cobalamina alto (≥403 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[49/26]	0,4	0,081	0,965	2,673	0,007	26,3
Medio (≥1,23 a <1,41)	[69/19]	6,4	0,061	0,320	2,900	0,003	26,6
Alto (<1,23)	[58/22]	1,8	0,069	0,798	5,156	<0,001	52,4

Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, EGOTAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC, *MTHFR* 677 C>T y centro del estudio con *MTRR* 66 AG y GG como variable independiente. R²=R² corregida por 100. % cambio = % cambio en tHcy de ser portador del alelo mutante respecto a no serlo; [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].

Se observó que el estado en cobalamina y riboflavina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de los participantes portadores del alelo mutante G en comparación con los salvajes para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G a excepción de cuando el estado en

cobalamina es bajo y el de riboflavina es medio-alto, donde los portadores del alelo mutante presentan una mayor tHcy.

Tabla 11. Comportamiento tHcy según *MTRR* 524 C>T y estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática

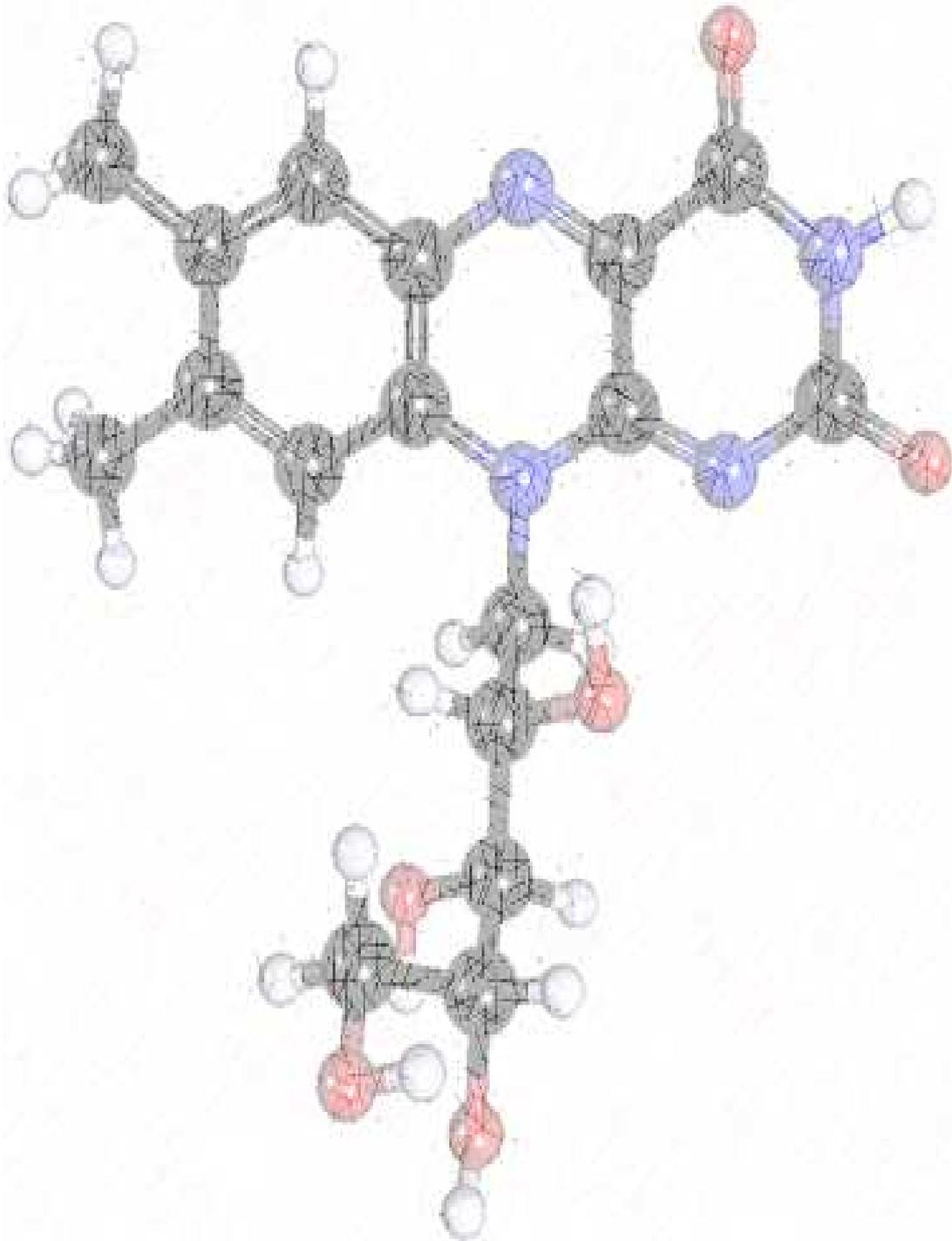
Estado en riboflavina (EGRAC)	n	Coeficiente de regresión (CC + CT vs TT)			Modelo		
		% diferencia	Error típico	p	F	p	R ²
Tercil de cobalamina bajo (<300 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[41/62]	10,5	0,055	0,074	5,722	<0,001	40,5
Medio (≥1,23 a <1,41)	[41/31]	-2,1	0,089	0,815	4,531	<0,001	47,4
Alto (<1,23)	[37/33]	3,7	0,108	0,076	1,025	0,465	1,0
Tercil de cobalamina medio (≥300 a <403 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[47/29]	-5,3	0,063	0,397	5,707	<0,001	47,0
Medio (≥1,23 a <1,41)	[57/24]	1,7	0,067	0,799	4,845	<0,001	45,4
Alto (<1,23)	[48/45]	5,3	0,047	0,271	4,117	<0,001	40,3
Tercil de cobalamina alto (≥403 pmol/L)							
Bajo (≥1,41)	[49/26]	5,6	0,081	0,506	2,732	0,006	27,0
Medio (≥1,23 a <1,41)	[54/34]	-4,9	0,053	0,350	2,885	0,003	26,5
Alto (<1,23)	[50/30]	-15,5	0,055	0,019	6,457	<0,001	59,1

Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, EGOTAC, consumo de alcohol y tabaco, edad, sexo, IMC, *MTHFR* 677 C>T y centro del estudio con *MTRR* 524 CT y TT como variable independiente. R²=R² corregida por 100. % cambio = % cambio en tHcy de ser portador del alelo mutante respecto a no serlo; [n homocigóticos + heterocigóticos / n salvajes].

En la tabla 11 se puede ver el comportamiento de la tHcy cuando se compara en portadores del alelo mutante T respecto a los salvajes para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T en función del estado en cobalamina y riboflavina eritrocitaria.

Se observa que el estado en cobalamina y riboflavina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de los participantes portadores del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T en comparación con los salvajes para este mismo polimorfismo a excepción de los dos estados extremos, es decir, estado bajo en cobalamina y riboflavina y estado alto en ambas. Cuando los portadores del alelo mutante se encontraban en el estado bajo en cobalamina y el estado bajo en riboflavina presentaban un 10,5% más de tHcy que los salvajes ($p = 0,074$), en cambio, cuando los mutantes se encontraban en el estado alto en cobalamina y el estado alto en riboflavina presentaban un 15,5% menos de tHcy ($p=0,019$).

También se observó que la relación entre el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y la tHcy variaba según el estado en riboflavina (interacción). Esta interacción tenía lugar sólo en el estado medio y en el estado alto de cobalamina (p de interacción = 0,009 y 0,005 respectivamente).



DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

4.2. DISCUSIÓN

Los estudios donde los participantes se seleccionan al azar del padrón municipal constituyendo una muestra representativa no son numerosos. Esto es un factor a tener en cuenta al comparar con otros estudios existentes. Otro factor que hay que tener presente cuando se comparan nuestros resultados con los de otros estudios es que no solamente es una población que no toma suplementos vitamínicos del grupo B, sino que tampoco está sometida a una política de fortificación con ácido fólico o con restitución de la riboflavina perdida durante la producción de la harina ya que en España no existe política alguna al respecto.

El porcentaje de fumadores de nuestra muestra, un 34,3%, era muy similar al observado en la Encuesta de Salud de la Generalitat de Catalunya del año 2002 que indican que el 33,2% de la población de entre 15 y 64 años eran fumadores⁽¹⁹⁰⁾.

Cuando observamos los resultados del estado en vitaminas del grupo B por grupo de edad y sexo se vio que tanto en hombres como en mujeres la población de mayor edad (≥ 60 años) era la que presenta un mejor estado en riboflavina y en folato, tanto eritrocitario como plasmático. Las mujeres menores de 35 años de edad eran las que presentaban un peor estado en folato, hecho preocupante ya que en este sector de la población hay riesgo de embarazo con complicaciones asociadas con un bajo estado en folato, algunas de estas complicaciones pueden ser graves, como los defectos del tubo neural^(46, 47).

Los valores medios de homocisteína difieren un poco entre unos laboratorios y otros pero los valores entre 5 $\mu\text{mol/L}$ y 15 $\mu\text{mol/L}$ son considerados normales⁽¹⁹¹⁾. El valor medio de tHcy de nuestra población es de 9,55 $\mu\text{mol/L}$, siendo de 8,78 $\mu\text{mol/L}$ el de las mujeres y 10,46 el de los hombres. Al igual que en otros estudios se observó que las mujeres presentaban valores inferiores de tHcy que los hombres^(82, 83).

A pesar de su mejor estado en folato y en riboflavina, tanto en hombres como en mujeres, el grupo de mayor edad era el que presentaba una tHcy más elevada. Esto puede deberse a la fuerte influencia de la edad puesta en evidencia en varios

estudios. Este aumento de la tHcy en el grupo de mayor edad podría ser debido a un estilo de vida más sedentario o a una peor función renal. Esta mayor tHcy también podría ser debido a un peor estado nutricional, ya que es un hecho contrastado que a medida que envejecemos hay un peor estado nutricional. Un peor estado en folato, riboflavina, cobalamina y vitamina B₆ provocaría un aumento en tHcy^(79-81, 86, 185).

Cuando se analizó el estado en vitaminas del grupo B en función del genotipo para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T se pudo observar que los homocigóticos presentaban una tHcy superior a los heterocigóticos o salvajes para este mismo polimorfismo. Por lo que respecta al folato, tanto plasmático como eritrocitario, la situación era la inversa, los TT presentaban concentraciones inferiores a las de los CT o CC.

Este comportamiento ya se ha descrito previamente en otros estudios donde se ha observado que los homocigóticos para este polimorfismo presentan valores superiores de tHcy e inferiores de folato^(125, 136, 139, 182, 192).

Por lo que respecta a los heterocigóticos se observó que presentaban un comportamiento más similar al de los salvajes que al de los homocigóticos. Los CT presentaban concentraciones ligeramente inferiores de folato, tanto plasmático como eritrocitario, que los salvajes y una tHcy superior, pero en ningún caso estas diferencias eran significativas.

Al estudiar el comportamiento de las vitaminas del grupo B en función del genotipo para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G se pudo observar que tanto los homocigóticos como los heterocigóticos para este polimorfismo tenían una tendencia a presentar mayor tHcy que los salvajes aunque sin alcanzar el nivel de significación estadística.

El hecho que los heterocigóticos presenten un peor estado en folato eritrocitario y en cobalamina que los salvajes para este mismo polimorfismo pero no los homocigóticos podría deberse a una casualidad estadística.

Estudios previos han dado resultados contradictorios del efecto de la presencia del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre tHcy.

Gaughan y colaboradores en el año 2000 publicaron los resultados de un estudio en el que participaron 601 hombres entre 30 y 49 años de Irlanda del Norte. En este estudio observaron que el ser homocigótico para *MTRR* 66 A>G se asociaba con una mayor tHcy independientemente del estado en folato, cobalamina y vitamina B₆⁽¹⁶⁰⁾. En cambio, años más tarde en 2005 Gueant-Rodriguez y colaboradores llevaron a cabo un estudio con 778 participantes franceses, 530 de ellos con problemas cardíacos. Se observó que los salvajes presentaban una mayor tHcy que los homocigóticos para este mismo polimorfismo⁽¹⁶²⁾.

Cuando se analizó el estado en vitaminas del grupo B en función del genotipo para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se pudo observar que los homocigóticos presentaban una tendencia no significativa a una menor tHcy que los heterocigóticos o salvajes para este mismo polimorfismo. También se observó una tendencia de valores superiores de folato eritrocitario y cobalamina plasmática en los TT respecto a los CT o CC, aunque no llegaba a la significación.

El polimorfismo *MTRR* 524 C>T es un polimorfismo mucho menos estudiado que el 66 A>G y hay menos estudios sobre el efecto de este polimorfismo sobre la tHcy. En un estudio llevado a cabo, recientemente por Wang S. S. y colaboradores en China, que contaba con 104 mujeres que habían dado a luz descendencia con síndrome de Down y con 184 controles se observó que en los casos la tHcy era menor en las TT que en las CC, en cambio en los controles no existía una diferencia significativa en la tHcy entre los diferentes genotipos⁽¹⁹³⁾.

El 64,1% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 17,8% era homocigótica para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros estudios para la población del sur de Europa^(77, 122).

El 74,1% de la población era portadora del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 24,2% era homocigótica para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los encontrados por Wilson y colaboradores donde encuentran una frecuencia del alelo mutante G del 75% en una población canadiense⁽¹⁵⁸⁾ y algo superiores a los obtenidos por Rady y colaboradores en los

que observaban una frecuencia del 70,4% en una población caucásica de Estados Unidos⁽¹⁵⁹⁾ o a los obtenidos por Gaughan en los que encontraba una frecuencia del 66% del alelo mutante G en una población de Irlanda del Norte.

El 59,7% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 13,4% era homocigótica para este polimorfismo. Este resultado es similar al obtenido recientemente por Pishva y colaboradores en una población Iraní, en el que la frecuencia del alelo mutante T es del 56,9% y el 16,3% de la población era homocigótica⁽¹⁹⁴⁾. En cambio, estos resultados son muy superiores al encontrado en un estudio llevado a cabo en China, por Zen y colaboradores, donde se observó que el 29,3% de la población era portadora del alelo mutante T y solamente el 3,0% de la población era homocigótica para este polimorfismo⁽¹⁶⁷⁾. Esta discrepancia entre resultados se podría explicar por la diferente etnia de los participantes en los estudios.

4.2.1. Estado en riboflavina de la población

Se observó que el valor medio de EGRAC de nuestra muestra era de 1,38 y cuando se aplicaba el punto de corte de EGRAC $\geq 1,4$ para definir el estado de deficiencia en riboflavina se observó que el 34% de la muestra era deficiente. Aproximadamente tres cuartas partes de la población presentaba un estado en riboflavina subóptimo (EGRAC $\geq 1,2$).

Por sexos se observó que las mujeres presentaban un mayor porcentaje de individuos en un estado óptimo de riboflavina pero, a su vez, también presentaban un mayor porcentaje en un estado deficiente.

Cuando se analizó el estado en riboflavina según el grupo de edad se observó que los que presentaban un peor estado en riboflavina era los más jóvenes (<35 años) y el estado en ésta iba mejorando a medida que avanza la edad.

Se observó que el grupo que presentaba un peor estado en riboflavina eran las mujeres menores de 35 años.

La coincidencia en las mujeres en edad fértil del peor estado en riboflavina y folatos puede implicar un mayor riesgo de varias complicaciones del embarazo, entre ellas

defectos del tubo neural ya que un peor estado en riboflavina podría acentuar el efecto de la deficiencia en folato^(44, 111).

La deficiencia de riboflavina es habitual en países en vías de desarrollo con ingestas bajas en carnes y en otros alimentos básicos de consumo diario⁽³³⁾, situación que, hasta ahora, no se observa de forma generalizada en nuestra población. No obstante se han encontrado resultados similares en otros países considerados del “primer mundo” como Francia o Reino Unido. Por ejemplo en un estudio llevado a cabo en Francia por Preziosi y colaboradores se observó que el valor medio de EGRAC de la población era 1,35⁽³⁵⁾ un valor muy similar al 1,38 observado en nuestra muestra y en el *National Diet and Nutrition Surveys* del Reino Unido se reveló que en el grupo de edad de entre los 19 y los 24 años el 82% de los hombres y el 77% de las mujeres presentaban una deficiencia subclínica en riboflavina cuando se aplicaba el punto de corte de EGRAC>1,3. También se observó que con la edad el porcentaje de la población que presentaba deficiencia subclínica de riboflavina era inferior ya que en el grupo de edad de entre 50 y 60 años el porcentaje disminuía al 54% en hombres y al 50% en mujeres. De este estudio también se desprendía que el EGRAC medio de la población británica masculina de entre 19 y 60 años era de 1,38 y del 1,40 en la población femenina⁽³⁶⁾. El comportamiento del estado en riboflavina según el grupo de edad encontrado en el *National Diet and Nutrition Surveys* del Reino Unido es totalmente comparable con el encontrado por nosotros.

Este peor estado nutricional en riboflavina en la población joven respecto a la adulta podría ser debido al patrón alimenticio y al estilo de vida. La población más joven tiene un patrón alimentario que se adhiere menos a la dieta mediterránea. Esta dieta es rica en alimentos con un alto contenido en vitaminas del grupo B. Un patrón dietético más alejado de la dieta mediterránea podría dar como resultado una menor ingesta de alimentos ricos en riboflavina lo que conllevaría un peor estado nutricional en ésta.

4.2.2. THcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria

Una vez ajustado por otros factores que afectan a la tHcy, los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaron medias de tHcy un 22,3% más elevadas que heterocigóticos o salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en el estado medio de riboflavina y un 29,3% cuando se encontraban en el estado bajo. En cambio, en los participantes que presentaban en el estado alto en riboflavina el efecto de ser homocigótico sobre la tHcy era prácticamente nulo.

Varios estudios ya han analizado el efecto de la riboflavina sobre la tHcy en función de *MTHFR* 677 C>T. En 2000 Hustad y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que participaron 423 personas de Noruega, comprendidas entre los 19 y 69 años, en el que demostraban que la riboflavina plasmática es un factor determinante de tHcy⁽⁸⁰⁾. En 2002 Jacques y colaboradores publicaron un estudio llevado a cabo en Estados Unidos en el que participaban 450 individuos del estudio *Framingham Offspring Study* en el que encontraron que el estado en riboflavina afectaba al metabolismo de la homocisteína pero sólo en el grupo de homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T que presentaban un peor estado en folato⁽¹³¹⁾. Cuatro años más tarde en 2006 McNulty y colaboradores publicaron un estudio que había tenido lugar en Irlanda del Norte. En este estudio con 680 participantes de entre 18 y 65 se observó que la suplementación con riboflavina aumentaba la concentración en riboflavina por igual en los tres genotipos, pero sólo en el caso de los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T se observaba una reducción del 22% de la tHcy⁽²⁶⁾. Un año más tarde, en 2007, en otro estudio llevado a cabo en Noruega por Holm y colaboradores con 10601 participantes de entre 50 y 64 años se observó que una deficiencia en riboflavina se asociaba con una mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T⁽¹³⁰⁾. En 2009 Caudill y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que participaron 60 varones adultos de entre 18 y 55 años de California. En este estudio observaron que un peor estado en riboflavina conllevaba una mayor tHcy en los individuos TT para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en un peor estado en folato⁽¹³²⁾.

Todos los estudios coinciden en que los homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T que se encuentran en un peor estado en riboflavina presentan una tHcy superior que los que se encuentran en un mejor estado de ésta. Pero los

estudios llevados a cabo en Estados Unidos sólo encuentran este efecto del estado en riboflavina sobre tHcy cuando el estado en folato es bajo. Esta discrepancia podría explicarse por la política de fortificación aplicada en Estados Unidos consistente en la fortificación de la harina con ácido fólico (140 µg por cada 100 gramos) desde 1998⁽⁴⁹⁾. Esta política ha provocado un aumento de la concentración de folato⁽⁵⁰⁾ y una disminución media del 10% de la tHcy⁽⁵²⁾. También existe una política de reposición de riboflavina en la harina desde 1943, aunque esta última ha sido menos considerada cómo argumento para las diferencias entre estudios⁽⁴⁹⁾. Esta diferencia de estado en folato y en riboflavina entre las dos zonas geográficas podría ser el motivo por el cual, los resultados obtenidos en Europa sólo sean reproducibles en Estados Unidos en los participantes que se encuentran en un peor estado en folato.

Hemos observado una interacción entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el estado en riboflavina sobre la tHcy. El alto nivel de significación alcanzado (p de interacción <0,001) sugiere que el estado en riboflavina tiene un fuerte efecto modulador de la relación polimorfismo-tHcy. Esto implica que no se pueda estudiar el efecto del polimorfismo sobre la tHcy sin tener presente los diferentes estados en riboflavina.

Este efecto ya ha sido observado anteriormente por Hustad y colaboradores en 2007 en un estudio llevado a cabo en Noruega con 10601 participantes entre 50 y 64 años⁽¹⁸²⁾.

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria se observó que los participantes portadores del alelo mutante G presentaban una mayor tHcy respecto a los salvajes. Cuando se tiene en cuenta el estado en riboflavina se observa que en el estado medio y alto de riboflavina los homocigóticos o heterocigóticos presentaban una tHcy superior a la que presentaban los no portadores para este mismo polimorfismo. Estos resultados hacen pensar que un mejor estado en riboflavina podría comportar una mayor tHcy en los heterocigóticos o homocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G. El hecho de que la mayor tHcy se dé sólo de forma significativa en

el estado medio de riboflavina y que en el estado alto la tHcy vuelva a ser similar, nos hace pensar que esto puede ser debido al azar y no a un fenómeno real.

Una vez ajustado por otros factores que afectan a la tHcy, los participantes homocigóticos o heterocigóticos para *MTRR 524 C>T* que se encontraban en el estado bajo de riboflavina presentaban una tendencia no significativa a una mayor tHcy que los salvajes para este mismo polimorfismo.

Como ya se ha visto previamente la MTRR cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽³⁹⁾. Si el estado en riboflavina es bajo podría hacer disminuir la actividad de la enzima, lo que se vería reflejado en un aumento de tHcy en los portadores del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR 524 C>T*.

Estos resultados hacen pensar que el estado en riboflavina afecta de forma opuesta al comportamiento de la tHcy en función de si se es portador o no del alelo mutante para los polimorfismos *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T*.

En los portadores del alelo mutante para el polimorfismo *MTRR 66 A>G* estar en el estado medio o alto en riboflavina se asocia con una mayor tHcy que en los no portadores, en cambio, en los portadores del alelo mutante para el polimorfismo *MTRR 524 C>T* estar en el estado medio o alto en riboflavina se asocia con una menor tHcy que en los no portadores.

El polimorfismo *MTRR 66 A>G* y en especial el *MTRR 524 C>T* han sido estudiados mucho menos que el polimorfismo *MTHFR 677 C>T*.

No se observó interacción entre los polimorfismos *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T* y el estado en riboflavina sobre la tHcy.

4.2.3. tHcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos

Los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaban mayor tHcy que el grupo de referencia, cuando se encontraban en un estado de folato medio o bajo, en cambio, cuando el estado en folato era alto no se observaba este efecto.

Varios estudios ya han encontrado previamente resultados similares en los que se sugieren que los individuos TT para este polimorfismo requerirían mayor concentración de folato para regular tHcy^(125-129, 166, 195-197). Por ejemplo, en uno llevado a cabo por Jacques y colaboradores publicado en 1996, que contó con 365 participantes de Estados Unidos, se observó que los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T necesitaban una mayor cantidad de folato para controlar la tHcy⁽¹²⁵⁾. En otro estudio publicado en 2004 de Pereira y colaboradores que contó con 209 brasileños se encontró que los individuos TT con un peor estado en folato presentaban una mayor tHcy⁽¹⁹⁷⁾.

La mayor parte de los folatos de la dieta se absorben como CH₃THF que es el producto final de la reacción de MTHFR. Un mayor aporte de CH₃THF por la dieta podría compensar su menor producción por parte de la variante termolábil de MTHFR, de esta forma cuando el estado en folato es alto no se observarían los efectos de ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T, ya que se aportaría directamente el producto final de la reacción de MTHFR haciendo así un *bypass* de esta reacción. Por otra parte el folato podría jugar papel protector estabilizando el enlace entre la enzima y FAD, aunque una mayor concentración de CH₃THF no corrige el defecto enzimático si provoca una menor reducción de la actividad enzimática como demostraron Guenther y colaboradores en 1999⁽⁴²⁾. Así pues, una mayor concentración de folato podría favorecer, por dos mecanismos distintos, una menor tHcy. En cambio, cuando la concentración de folato no es óptima no hay un aporte extra de CH₃THF al ciclo, ni esta estabilización extra del grupo FAD y es entonces cuando se hace patente la menor actividad enzimática de los TT que se ve reflejada en mayor tHcy.

El estado en cobalamina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de los participantes portadores del alelo mutante G o T de los polimorfismos *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T respectivamente. Se observó que el comportamiento de la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática era opuesto entre los dos polimorfismos. En los portadores del alelo mutante para *MTRR* 66 A>G la tHcy era superior a medida que mejoraba el estado en cobalamina, en cambio, en los heterocigóticos o homocigóticos para *MTRR* 524 C>T la tHcy disminuía a medida que mejoraba el estado en cobalamina.

Este efecto opuesto de los dos polimorfismos sobre la tHcy ya se había observado cuando se analizó la media de tHcy ajustada por distintos factores confusores en función del genotipo.

4.2.4. Efecto del genotipo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

Cuando se estudió el efecto conjunto del estado en riboflavina y en folato sobre la tHcy en función de *MTHFR* 677 C>T se observó que ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T no se asociaba a más tHcy en relación al grupo de referencia (heterocigóticos o salvajes) si el estado en riboflavina era alto. En cambio, cuando el estado en riboflavina no era alto, presentar un estado en folato medio o bajo comportaba hasta un 30% más de tHcy en los homocigóticos respecto al grupo de referencia.

En 2002 Jacques y colaboradores publicaron un estudio llevado a cabo en Estados Unidos en el que participaban 450 individuos del estudio *Framingham Offspring Study* en el que encontraron que el estado en riboflavina afectaba al metabolismo de la homocisteína pero sólo en el grupo de homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T que presentaban un peor estado en folato⁽¹³¹⁾. Unos años más tarde en 2009, Caudill y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que participaron 60 varones adultos de entre 18 y 55 años de California. En este estudio observaron que un peor estado en riboflavina conllevaba una mayor tHcy en los individuos TT para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en un peor estado en folato⁽¹³²⁾.

Hustad y colaboradores realizaron un estudio que tuvo lugar en Noruega y contó con la participación de 10601 adultos entre 50 y 64 años que participaban en el estudio *The Norwegian Colorectal Cancer Prevention* que ya estudiaron el efecto de ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T en función del estado en riboflavina plasmática y en folato sérico obteniendo unos resultados similares a los obtenidos en nuestra población, ya que se observó más tHcy en presencia del binomio folato-riboflavina bajo, en cambio cuando el estado en riboflavina era alto no se producía un aumento de tHcy independientemente del estado en folato⁽¹⁸²⁾.

A diferencia de los estudios anteriores nuestro estudio está realizado con una muestra más representativa de la sociedad ya que el rango de edad de nuestra población va desde los 18 hasta los 75 años. Otra ventaja es que nuestra población es una población sana que no ha sido suplementada con vitaminas del grupo B, ha diferencia de los estudios realizados en Estados Unidos.

Cuando se estudió el efecto conjunto del estado en riboflavina eritrocitaria y en cobalamina plasmática sobre la tHcy en función de *MTRR* 66 A>G se observó que los portadores del alelo mutante presentaban más tHcy, que los salvajes para este mismo polimorfismo, cuando se daba la combinación estado en cobalamina bajo más estado en riboflavina medio o alto, aunque estos resultados no eran significativos.

Estos resultados indican que una desproporción en el ratio cobalamina/riboflavina por exceso de riboflavina podría interferir de alguna manera en la interacción MTRR-MS impidiendo así la correcta realización de la función chaperona de MTRR (ayudar al plegamiento de MS para facilitar su interacción con cobalamina)⁽¹⁵⁷⁾. Esto impediría el correcto funcionamiento de MS, que es la enzima que se encarga de catalizar el paso de homocisteína a metionina utilizando metilcob(III)alamina como cofactor, lo que induciría a una reducción en la metilación de la homocisteína a metionina viéndose reflejada en un aumento de tHcy.

Cuando se estudió el efecto conjunto del estado en riboflavina y en cobalamina sobre la tHcy se observó que el estado en cobalamina y riboflavina no tenía un gran

efecto sobre la tHcy de los participantes portadores del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T en comparación con los salvajes para este mismo polimorfismo a excepción de los dos estados extremos, es decir, estado bajo en cobalamina y riboflavina y estado alto en ambas, donde se observaba una mayor y una menor tHcy que en los no portadores del alelo mutante respectivamente.

Como ya se ha visto previamente la *MTRR* cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽³⁹⁾. Si la concentración de riboflavina es baja podría hacer disminuir la actividad de la enzima con lo que el ratio de cob(II)alamina/metilcob(III)alamina podría ser superior. Esta situación se vería agravada si la concentración de cobalamina es baja. Esto implicaría una menor disponibilidad de metilcob(III)alamina para el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en un aumento de tHcy en los portadores del alelo mutante T para *MTRR* 524 C>T.

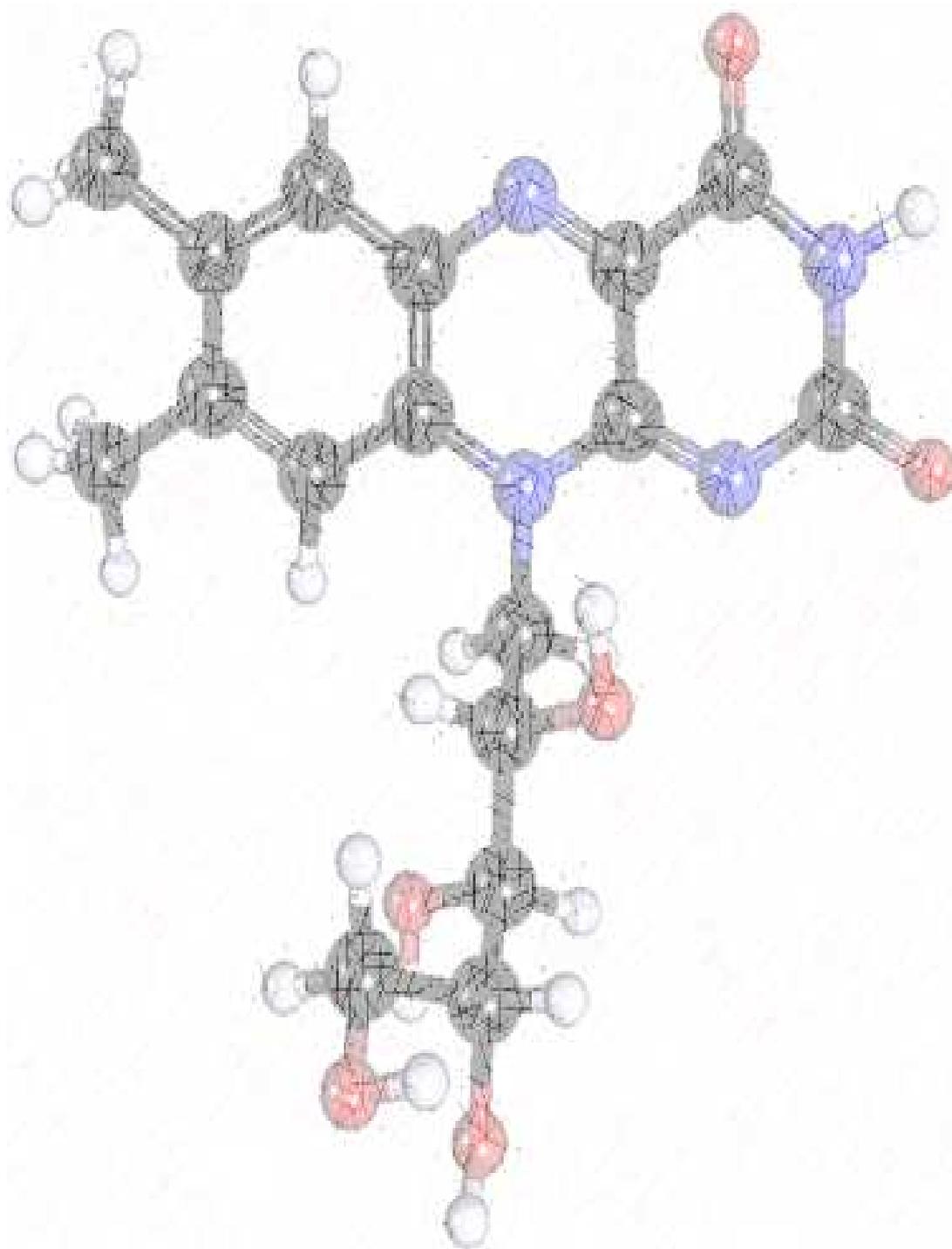
Existía interacción entre el estado en riboflavina y el polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy cuando el estado en cobalamina era medio o alto, lo que implica que el estado en riboflavina no modificaba la relación entre el polimorfismo y la tHcy cuando el estado en cobalamina era bajo. En cambio, no había interacción entre el estado en riboflavina y el polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy independientemente del estado en cobalamina.

Estos resultados ponen de manifiesto el comportamiento inverso que se observa entre los polimorfismos *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy en función del estado en riboflavina.



*MUJERES EN EDAD FÉRTIL
NO EMBARAZADAS Y NO
SUPLEMENTADAS CON
VITAMINAS DEL GRUPO B*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

Las mujeres entre 18 y 45 años de edad es el grupo de población con mayor posibilidad de quedarse embarazadas. En un estudio llevado a cabo en 15 estados de Estados Unidos que tomaron parte en el *Pregnancy Risk Assessment Monitoring System* en 1998 y que contó con 25027 participantes se observó que sólo el 57% de los partos habían sido planeados⁽¹⁹⁸⁾. En otro estudio también llevado a cabo en Estados Unidos por Kost y colaboradores basado en 9122 embarazos del *National Maternal and Infant Health Survey* y 2548 embarazos del *National Survey of Family Growth* de 1998 se observó que la proporción de nacidos con problemas médicos era significativamente inferior si el embarazo había sido planeado⁽¹⁹⁹⁾.

Estudios llevados a cabo en China⁽⁴⁸⁾ y en Estados Unidos⁽²⁰⁰⁾ y en otros países han demostrado que la suplementación con ácido fólico antes de la concepción y durante los primeros 28 días después de la concepción reduce el riesgo de defectos del tubo neural^(46-48, 201) que es un grupo de serias malformaciones que dan como resultado la muerte o malformaciones graves durante toda la vida en los sobrevivientes. Se considera que hay como mínimo 300000 embarazos anuales afectados por esta malformación⁽²⁰²⁾. A pesar de esto, en un estudio llevado a cabo durante dos años en el que participaron 500 mujeres italianas que habían planeado el embarazo se observó que sólo el 43,4% de las mujeres habían consumido ácido fólico antes de la concepción⁽²⁰³⁾. Un déficit en folato implica una reducción de todas las formas de folato del ciclo de los folatos con lo que se produciría una reducción en la transferencia de grupos metilos necesarios para remetilizar la homocisteína produciendo un aumento de su concentración. Una elevada tHcy se ha asociado con varias complicaciones en el embarazo como defectos del tubo neural^(44, 45). Éste fue el principal motivo por el que Estados Unidos decidió aplicar una política de fortificación de la harina con ácido fólico desde 1998⁽⁴⁹⁾.

Ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T se ha asociado con complicaciones del embarazo como defectos en el tubo neural^(144, 204-207). Existen dos puntos de unión entre el ciclo de los folatos y la riboflavina. Estos dos puntos son la MTHFR que necesita FAD como cofactor y la MTRR que es una flavoproteína.

El folato se considera el mayor determinante de la tHcy⁽⁵⁴⁾ pero una deficiencia en riboflavina podría provocar un mal funcionamiento del ciclo de los folatos, a pesar de presentar una buena concentración en folato, con lo que no se llevaría a cabo correctamente la remetilación de homocisteína a metionina. Este mal funcionamiento provocaría un aumento de la tHcy.

5.1. RESULTADOS

Para valorar el estado nutricional en vitaminas del grupo B en el grupo diana de la población para prevenir complicaciones del embarazo, se investigaron los estados en riboflavina, cobalamina y folato, las frecuencias de los polimorfismos *MTHFR 677 C>T*, *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T* y los efectos de los nutrientes y los polimorfismos sobre tHcy.

Tabla 12: Características de la muestra (n = 240)

Edad ¹ , años	32,0 (31,1 – 32,9)
Fumadores, %	46,7 (43,1 – 49,8)
IMC ¹ , Kg/m ²	24,3 (23,7 – 24,9)
Alcohol ¹ , g/día	9,0 (1,6 – 16,4)
Folato plasmático ² , nmol/L	10,2 (9,6 – 10,9)
Estado en folato plasmático bajo (≤ 7 nM), %	23,8 (20,9 – 26,6)
Folato eritrocitario ² , nmol/L	721 (688 – 755)
Creatinina sérica ² , μ mol/L	64,1 (63,0 – 65,2)
Cobalamina plasmática ² , pmol/L	330 (314 – 346)
Estado en cobalamina bajo (≤ 150 pM), %	2,9 (2,5 – 3,3)
Homocisteína plasmática ² , μ mol/L	8,4 (8,1 – 8,7)
EGRAC ¹	1,44 (1,41 – 1,48)
Estado en B ₂ bajo (EGRAC $\geq 1,4$), %	48,3 (43,7 – 52,4)
EGOTAC ¹	1,69 (1,66 – 1,72)

¹Media aritmética ²Media geométrica (IC 95%); IMC: Índice de Masa Corporal.

En la tabla 12 se puede observar las características de la población diana. El 46,7% de las mujeres eran fumadoras, el 23,8% deficiente en folato plasmático, el 2,9% deficiente en cobalamina y el 48,3% deficiente en riboflavina eritrocitaria.

En la tabla 13 se puede observar la distribución de los genotipos para cada polimorfismo.

El 65,4% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 15,4% era homocigótica para este polimorfismo.

El 71,7% de la población era portadora del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 24,5% era homocigótica para este polimorfismo.

El 61,9% de la población era portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 15,5% era homocigótica para este polimorfismo.

Tabla 13 : Distribución de los genotipos

	N	%
<i>MTHFR</i> 677 C>T		
CC	83	34,6
CT	120	50,0
TT	37	15,4
CT + TT	157	65,4
<i>MTRR</i> 66 A>G		
AA	66	28,3
AG	110	47,2
GG	57	24,5
AG + GG	167	71,7
<i>MTRR</i> 524 C>T		
CC	89	38,1
CT	108	46,4
TT	36	15,5
CT + TT	144	61,9

Las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban un peor estado en folato eritrocitario que las heterocigóticas o salvajes para este mismo polimorfismo y las TT tenían una mayor tHcy en comparación con la de las CT y CC. El hecho que lo homocigóticos tengan un comportamiento diferente a los heterocigóticos y salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de los homocigóticos respecto al de los heterocigóticos y salvajes (grupo de referencia) cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o folato plasmático.

Las participantes heterocigóticas y homocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G presentaban una tendencia a un aumento de la tHcy. También se observó que la presencia del alelo mutante G se asociaba con un peor estado en cobalamina, pero esta diferencia sólo era significativa en las heterocigóticas. El hecho que solamente las heterocigóticas presentaran una menor concentración de cobalamina que las salvajes y las homocigóticas para este polimorfismo podría deberse a una casualidad estadística.

Se observó una tendencia a que las homocigóticas o heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T presentaran una menor tHcy que las salvajes para este mismo polimorfismo.

El hecho que lo homocigóticos y heterocigóticos para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G tengan un comportamiento diferente a los salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de los homocigóticos y los heterocigóticos respecto al de los salvajes cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o cobalamina plasmática. Por mimetismo utilizamos la misma estrategia con el polimorfismo *MTRR* 524 C>T.

En ningún caso se observa diferencias entre el estado en riboflavina y piridoxina en función del genotipo (tabla 14).

Tabla 14: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy según genotipo en mujeres en edad fértil no embarazadas

	N [%]	EGRAC¹	EGOTAC¹	FP², nmol/L	FE², nmol/L	B₁₂², pmol/L	tHcy³, µmol/L
Todas	234 [100]	1,44 (1,40 – 1,48)	1,69 (1,66 – 1,72)	10,3 (9,7 – 10,9)	723 (690 – 758)	331 (316 – 347)	8,37 (8,11 – 8,63)
MTHFR 677							
CC	81 [34,6]	1,45 (1,40 – 1,51)	1,69 (1,63 – 1,75)	11,1 (10,0 – 12,2)	796 (736 – 860)	343 (316 – 372)	8,03 (7,62 – 8,45)
CT	117 [50,0]	1,45 (1,40 – 1,51)	1,69 (1,66 – 1,73)	10,2 (9,4 – 11,2)	722 (679 – 767) ^{†††}	320 (298 – 343)	8,27 (7,95 – 8,61) ^{†††}
TT	36 [15,4]	1,41 (1,30 – 1,51)	1,67 (1,61 – 1,73)	8,9 (7,5 – 10,5)	585 (509 – 673) ^{***}	343 (303 – 388)	9,56 (8,65 – 10,55) ^{***}
MTRR 66							
AA	65 [28,5]	1,48 (1,40 – 1,55)	1,69 (1,64 – 1,73)	9,8 (8,6 – 11,2)	731 (666 – 802)	342 (315 – 371)	8,16 (7,67 – 8,69)
AG	107 [46,9]	1,45 (1,40 – 1,50)	1,70 (1,65 – 1,75)	10,5 (9,7 – 11,4)	716 (669 – 767)	323 (299 – 349) ^{*†}	8,33 (8,00 – 8,68)
GG	56 [24,6]	1,42 (1,35 – 1,49)	1,66 (1,61 – 1,71)	10,2 (8,9 – 11,7)	727 (656 – 805)	327 (298 – 359)	8,57 (7,95 – 9,24)
MTRR 524							
CC	87 [38,2]	1,44 (1,38 – 1,51)	1,71 (1,67 – 1,75)	10,3 (9,4 – 11,4)	692 (637 – 752)	319 (293 – 347)	8,70 (8,31 – 9,10)
CT	105 [46,1]	1,46 (1,41 – 1,51)	1,67 (1,62 – 1,72)	9,9 (8,9 – 10,9)	721 (671 – 775)	333 (311 – 357)	8,18 (7,79 – 8,59)
TT	36 [15,7]	1,43 (1,35 – 1,50)	1,67 (1,61 – 1,74)	11,2 (9,6 – 13,0)	810 (735 – 892)	342 (303 – 388)	7,98 (7,30 – 8,73)

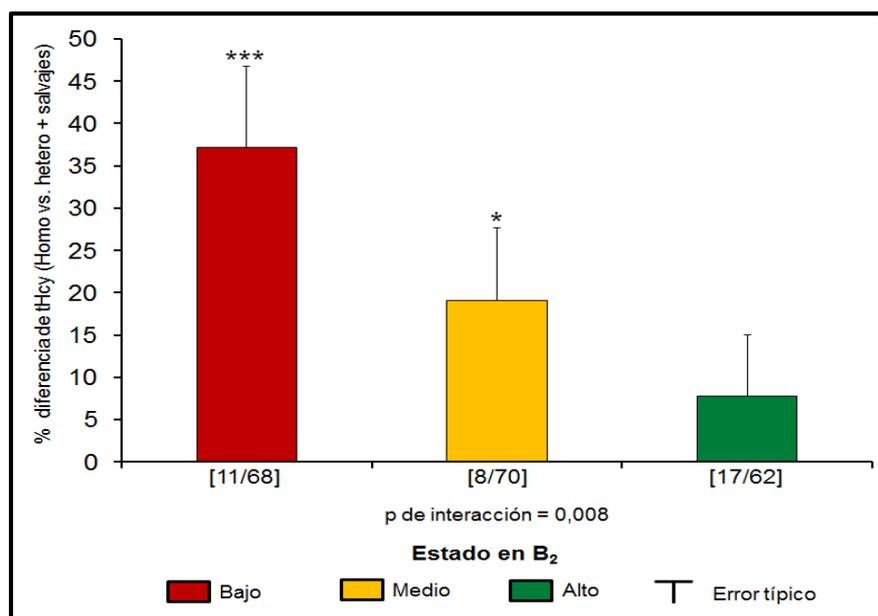
¹Media aritmética ²Media geométrica ³Media geométrica ajustada por folato plasmático y centro del estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas; * p<0,05 *** p<0,001 vs salvajes † p<0,05 ††† p<0,001 vs homocigóticos.

5.1.1. tHcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria

En este apartado se presenta como se modificaba el comportamiento de la tHcy en función del estado en riboflavina cuando se comparaba ser homocigótica respecto a no serlo, en el caso de *MTHFR* 677 C>T, y ser portadora del alelo mutante respecto a no serlo, en el caso de *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

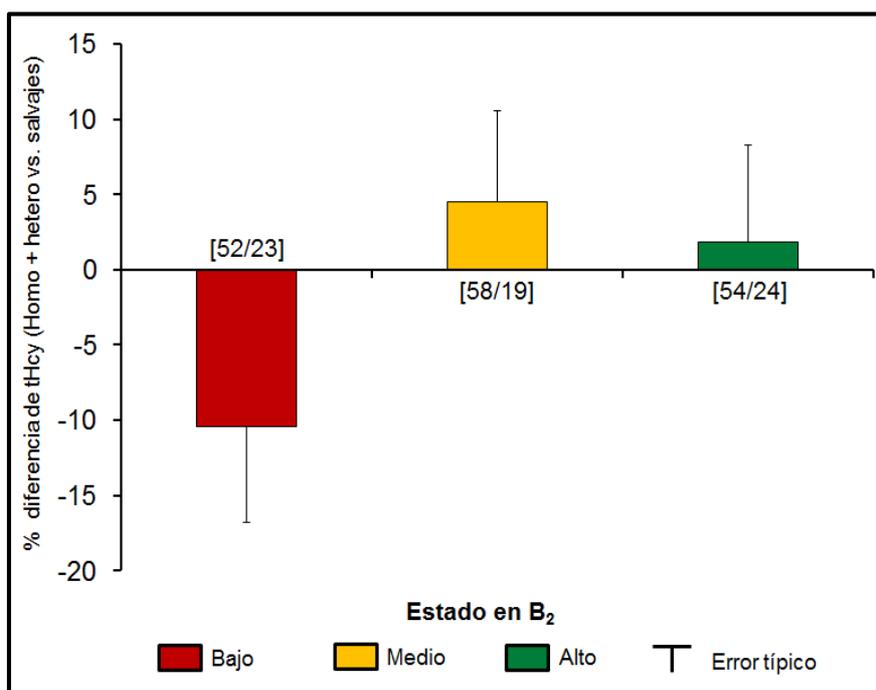
Las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T presentaron un 37,2% más de tHcy que el grupo de referencia, heterocigóticos o salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en el estado bajo de riboflavina y un 19,1% más cuando se encuentran en el estado medio (gráfica 9).

También se observó que existía una interacción entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T (homocigótica/no homocigótica) y el estado en riboflavina sobre la tHcy (p de interacción = 0,008).



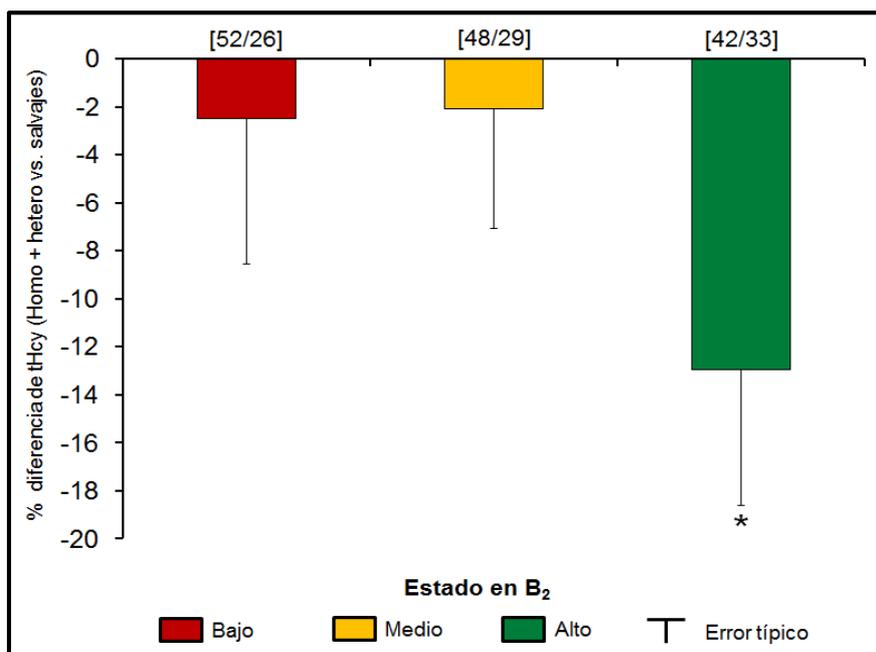
Gráfica 9. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas como variable independiente. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ vs. heterocigóticas + salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,51$), medio (EGRAC $\geq 1,29 < 1,51$) y alto (EGRAC $< 1,29$).

En la gráfica 10 se observa que las portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G que se encontraban en el estado medio y alto de estado en riboflavina presentaban una tHcy ligeramente superior a la que presentaban las salvajes para este mismo polimorfismo. Por el contrario la tHcy de las que se encontraban en un estado bajo en riboflavina era un 10,4% inferior.



Gráfica 10. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,51$), medio (EGRAC $\geq 1,29 < 1,51$) y alto (EGRAC $< 1,29$).

En la gráfica 11 se observa que no existía una gran diferencia de comportamiento de la tHcy, entre las participantes homocigóticas o heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T respecto a las salvajes para este mismo polimorfismo, en función del estado en riboflavina excepto en el estado alto de riboflavina, donde presentan un 11,5% menos de tHcy.



Gráfica 11. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente; * $p < 0,05$ vs. salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,51$), medio (EGRAC $\geq 1,29 < 1,51$) y alto (EGRAC $< 1,29$).

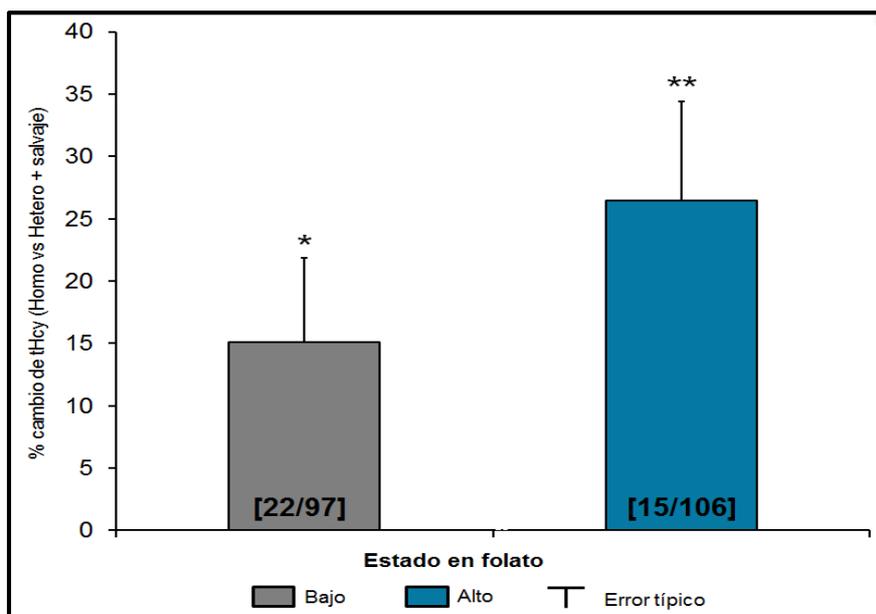
5.1.2. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina

Como la función de *MTHFR* está relacionada íntimamente con el estado en folato se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en folato plasmático (gráfica 12).

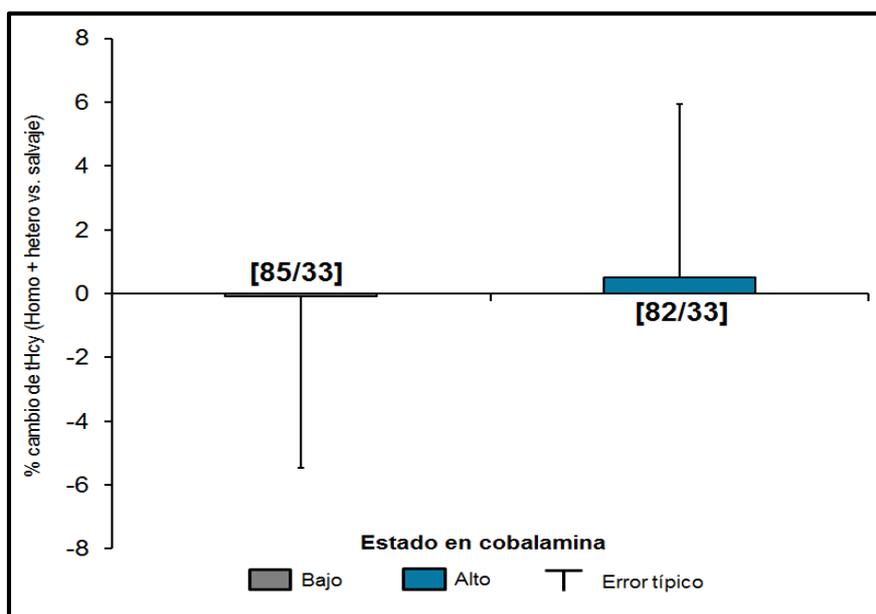
Las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T presentaron una tHcy más elevada que las del grupo de referencia, heterocigóticas y salvajes para el mismo polimorfismo, independientemente del estado en folato. Eso sí, este incremento era superior en las participantes que presentaban un estado en folato plasmático alto.

Al igual que la función de *MTHFR* está relacionada íntimamente con el estado en folato la función de *MTRR* está relacionada a su vez con la concentración de cobalamina plasmática así que se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en cobalamina (gráfica 13 y gráfica 14).

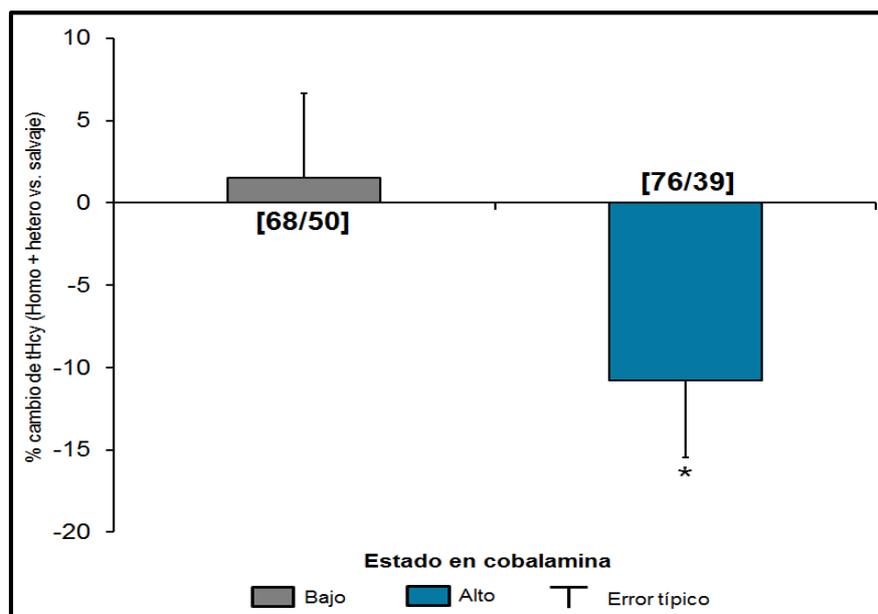
Estudio en mujeres no embarazadas. Resultados



Gráfica 12. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en folato plasmático. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas como variable independiente. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs. heterocigóticas + salvajes; estado en folato plasmático bajo ($< 10,2$ nmol/L) y alto ($\geq 10,2$ nmol/L).



Gráfica 13. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente; estado en cobalamina plasmática bajo (< 326 pmol/L) y alto (≥ 326 pmol/L).



Gráfica 14. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente. * $p < 0,05$ vs. salvajes; estado en cobalamina plasmática bajo (<326 pmol/L) y alto (≥ 326 pmol/L).

El estado en cobalamina tenía un efecto prácticamente nulo sobre la tHcy de las participantes portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en comparación con las salvajes para este mismo polimorfismo. Se observó un ligerísimo aumento de la tHcy cuando la concentración de cobalamina era alta (gráfica 13).

En la gráfica 14 se puede ver como el efecto del genotipo en el estado bajo de cobalamina era nulo pero en las participantes que se encontraban en un mejor estado en cobalamina se observa una tHcy un 10,8% inferior en las homocigóticas o heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T respecto a las salvajes.

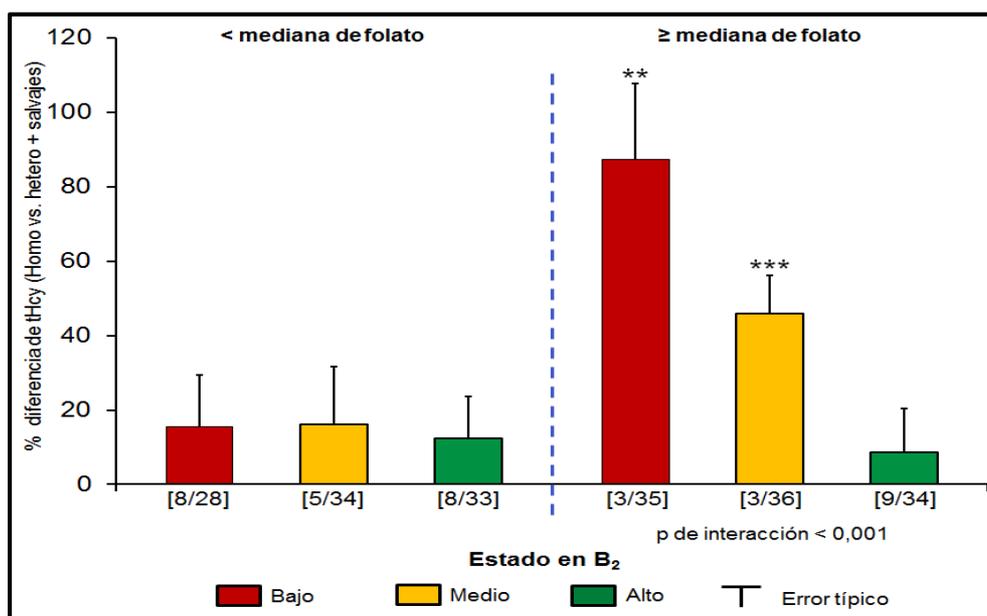
5.1.3. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

En la gráfica 15 se presenta el comportamiento de la tHcy cuando se comparaba en homocigóticas respecto a heterocigóticas o salvajes para el polimorfismo

MTHFR 677 C>T en función del estado en folato plasmático y riboflavina eritrocitaria.

Se observó que la tHcy de las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T que se encontraban por encima de la mediana de folato era superior a la de las heterocigóticas o salvajes para este mismo polimorfismo. En estas participantes la diferencia de tHcy respecto al grupo de referencia no era significativa cuando se encontraban en el estado alto de riboflavina, en cambio, las que se encontraban en el estado bajo presentaban un 87,4% más de tHcy.

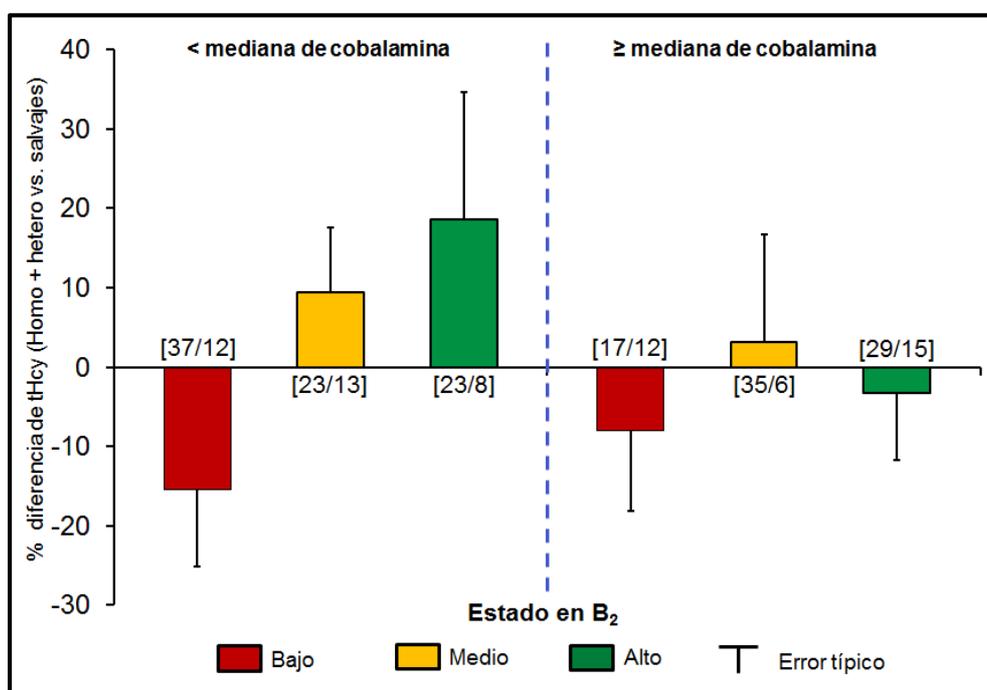
También se observó que existía una interacción entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el estado en riboflavina sobre la tHcy en las participantes que estaban en un estado en folato plasmático alto (p de interacción < 0,001).



Gráfica 15. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y folato plasmático. Regresión lineal múltiple con ln tHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas como variable independiente; **p<0,01 ***p<0,001 vs. heterocigóticas + salvajes. Estado en riboflavina bajo (EGRAC ≥1,51), medio (EGRAC ≥1,29 <1,51) y alto (EGRAC <1,29). Mediana de folato plasmático = 10,2 nmol/L.

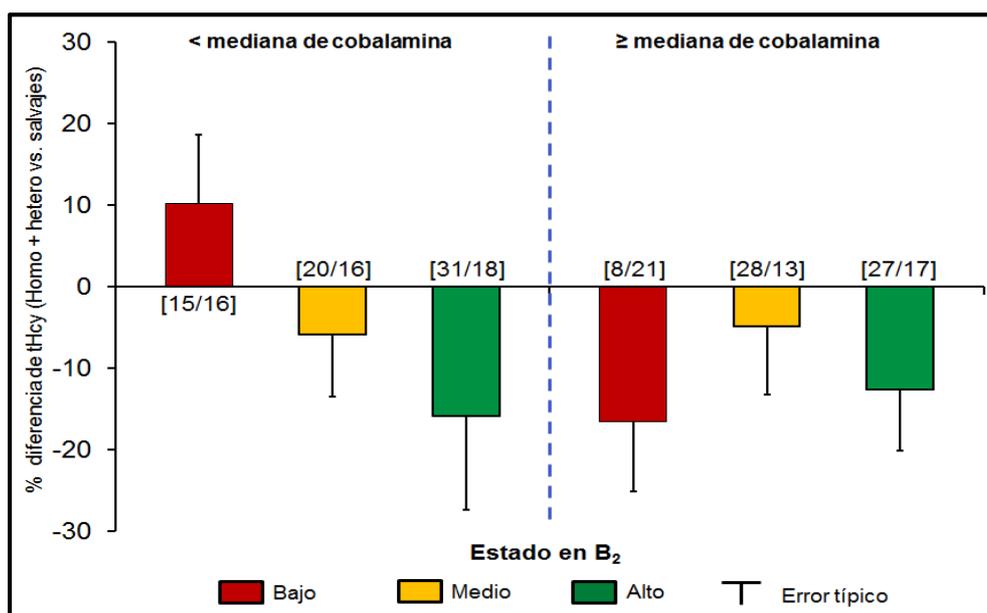
En la gráfica 16 se observa el comportamiento de la tHcy cuando se comparan homocigóticas o heterocigóticas con salvajes para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G en función del estado en cobalamina plasmática y riboflavina eritrocitaria.

Se observa que el estado en riboflavina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de las participantes portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en comparación con los salvajes para este mismo polimorfismo cuando la concentración de cobalamina está por encima de la mediana. En cambio cuando la concentración de cobalamina está por debajo de la mediana el comportamiento de la tHcy de las portadoras del alelo mutante en comparación con las que no es totalmente diferente en función del estado en riboflavina. Cuando el estado en riboflavina es alto presentan un 18,7% más de tHcy, por el contrario, cuando el estado es bajo presentan un 15,5% menos de tHcy.



Gráfica 16. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con ln tHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,51$), medio (EGRAC $\geq 1,29 < 1,51$) y alto (EGRAC $< 1,29$). Mediana de cobalamina = 326 pmol/L.

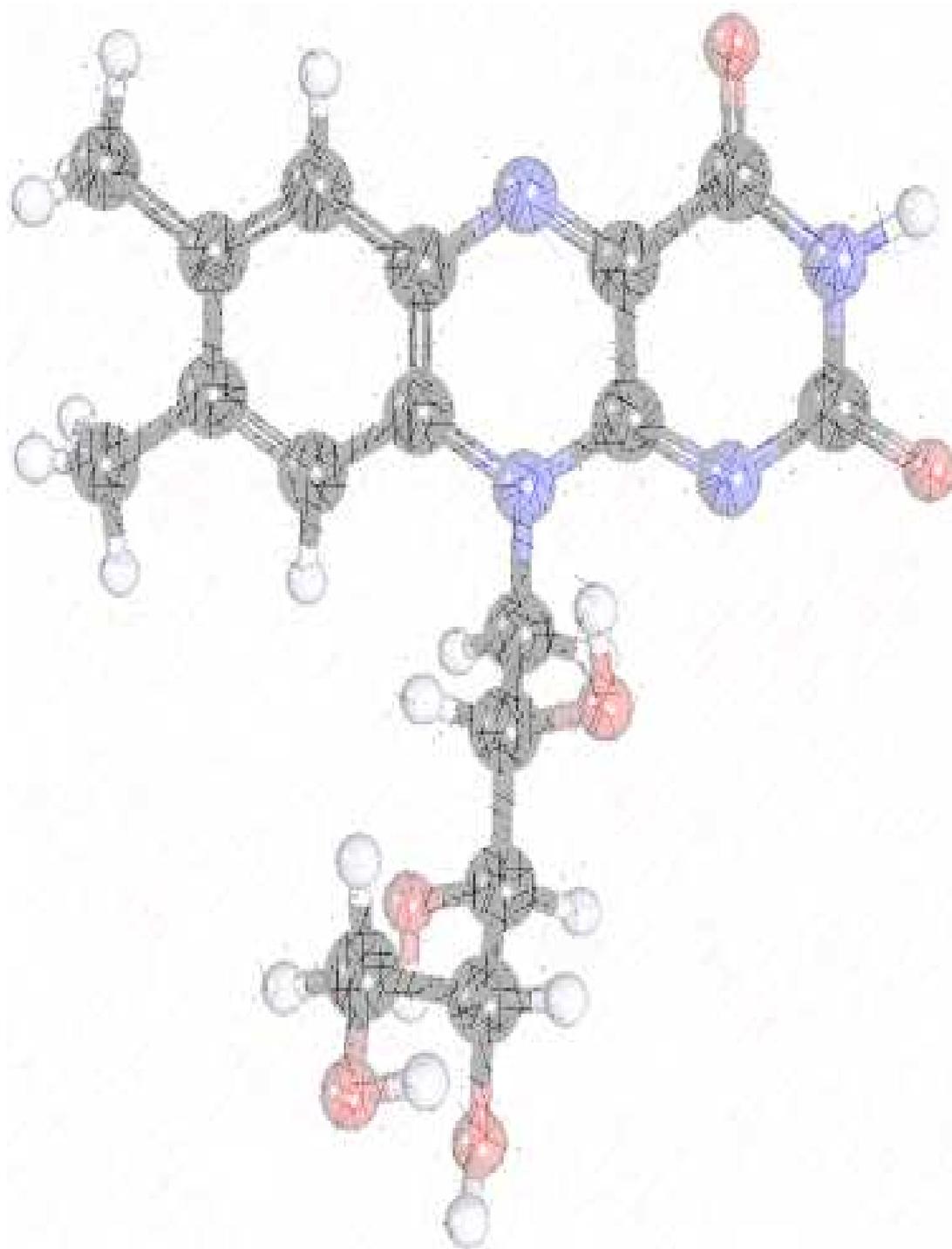
En la gráfica 17 se puede ver el comportamiento de tHcy cuando se compara a las portadoras del alelo mutante C del polimorfismo *MTRR* 524 C>T con las no portadoras en función del estado en cobalamina plasmática y riboflavina eritrocitaria.



Gráfica 17. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 524 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGOTAC, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de alcohol y tabaco, IMC y centro del estudio con homocigóticas y heterocigóticas como variable independiente; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,51$), medio (EGRAC $\geq 1,29 < 1,51$) y alto (EGRAC $< 1,29$). Mediana de cobalamina = 326 pmol/L.

Se observa que independientemente del estado en riboflavina las portadoras del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T presentaban una menor tHcy en comparación con los salvajes cuando se encontraban por encima de la mediana de cobalamina. En cambio cuando la concentración de cobalamina estaba por debajo de la mediana el comportamiento de la tHcy de las portadoras del alelo mutante en comparación con las no portadoras es diferente en función del estado en riboflavina. Cuando el estado en riboflavina es alto presentan un 15,9% menos de tHcy, por el contrario, cuando el estado es bajo presentan un 10,2% más de tHcy.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

5.2.- DISCUSIÓN

El porcentaje de fumadoras era del 46,7%, similar al que reportan las estadísticas de la Generalitat de Catalunya de 1998 que indican que el 43,9% de las mujeres de entre 25 y 35 años eran fumadoras⁽¹⁹⁰⁾.

No se conoce exactamente la prevalencia de la deficiencia en folato ya que pocos países tienen datos bioquímicos sobre el estado en folato, aunque ésta tiende a ser más habitual en las poblaciones que tienen un elevado consumo de cereales refinados y una menor ingesta de vegetales de hoja verde y fruta. Se considera que antes de la introducción en 1998 de la política de fortificación obligatoria de la harina con ácido fólico alrededor del 15% de las mujeres adultas de Estados Unidos eran deficientes en folato⁽²⁰⁸⁾. El 23,8% de las participantes eran deficientes en folato plasmático (≤ 7 nmol/L)⁽²⁰⁹⁾ unos valores algo superiores a los encontrados en Estados Unidos y muy superiores a los encontrados en un estudio llevado a cabo por Laillou y colaboradores en Vietnam publicado en 2012 con 1526 mujeres en el que se encontró que sólo el 2,7% de las mujeres en edad fértil eran deficientes en folato ($\leq 6,8$ nmol/L)⁽²¹⁰⁾. Este mejor estado en folato de la población vietnamita podría deberse al menor consumo de cereales refinados y al mayor consumo de vegetales de hoja verde y de frutas.

Solamente el 2,9% de las participantes eran deficientes en cobalamina (≤ 150 pmol/L)⁽²¹¹⁾ unos valores inferiores a los encontrados en Alemania⁽²⁰⁸⁾ donde el 15% de las mujeres en edad reproductiva eran deficientes y similares al 5,1% encontrado en las mujeres lactantes en Costa Rica⁽²¹²⁾.

El 48,3% de las participantes en el estudio eran deficientes en riboflavina ($EGRAC \geq 1,4$). Este porcentaje es superior al 34% encontrado en el estudio poblacional y algo inferior al encontrado en el *National Diet and Nutrition Surveys* del Reino Unido donde se reveló que en el grupo de edad de entre los 19 y los 24 años el 77% de las mujeres presentaban una deficiencia subclínica en riboflavina cuando se aplicaba el punto de corte de $EGRAC > 1,3$ ⁽³⁶⁾.

Cuando se analizó el estado en vitaminas del grupo B en función del genotipo para los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T se pudo observar que el comportamiento de la población de mujeres no embarazadas era similar al de la población.

El hecho que solamente las heterocigóticas para *MTRR* 66 A>G presentaran una menor concentración de cobalamina que las salvajes y las homocigóticas para este polimorfismo podría deberse a una casualidad estadística.

El 65,4% de las participantes eran portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 15,4% eran homocigóticas para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros estudios para la población del sur de Europa^(77, 122) y a los obtenidos en el estudio poblacional.

El 71,7% de las participantes eran portadoras del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 24,5% eran homocigóticas para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los encontrados en el estudio poblacional y en otros estudios llevados a cabo en Canadá, Estados Unidos o Irlanda del Norte⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾.

El 61,9% de las participantes eran portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 15,5% eran homocigóticas para este polimorfismo. Este resultado es similar al obtenido en el estudio poblacional y a los obtenidos por Pishva y colaboradores en una población Iraní, en el que la frecuencia del alelo mutante T es del 56,9% y el 16,3% de la población era homocigótica⁽¹⁹⁴⁾. En cambio, estos resultados son muy superiores al encontrado en un estudio llevado a cabo en China, por Zen y colaboradores, donde se observó que el 29,3% de la población era portadora del alelo mutante T y solamente el 3,0% de la población era homocigótica para este polimorfismo⁽¹⁶⁷⁾. Esta discrepancia entre resultados se podría explicar por la diferente etnia de los participantes en los estudios.

5.2.1. tHcy según genotipo y estado en riboflavina eritrocitaria

Al comparar el comportamiento de la tHcy de las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T respecto a las que no lo son en función del estado en riboflavina

se observó que las homocigóticas presentaron un 37,2% más de tHcy que el grupo de referencia, heterocigóticas o salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en el estado bajo de riboflavina y un 19,1% más cuando se encuentran en el estado medio. Las diferencias medias de tHcy entre variantes del polimorfismo que se producían en el tercil medio y bajo de riboflavina eritrocitaria eran similares a los que se producían en la población.

Se observó que el estado en riboflavina modificaba la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy. El alto nivel de significación alcanzado (p de interacción 0,008) sugiere que el estado en riboflavina tiene un fuerte efecto modulador de la relación polimorfismo-tHcy aunque no tanto como en la población general donde la p de interacción era inferior a 0,001.

Las portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G que se encontraban en el estado medio y alto de riboflavina presentaban una tHcy ligeramente superior a la de las salvajes para este mismo polimorfismo. Por el contrario la tHcy de las que se encontraban en un estado bajo en riboflavina era un 10,4% inferior. Este comportamiento de la tHcy de las mujeres no gestantes portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en función del estado en riboflavina es similar al encontrado en la población general, aunque la menor tHcy en las portadoras del alelo mutante cuando el tercil de riboflavina era bajo es más claro. Esta mayor disminución de tHcy en el estado bajo de riboflavina podría ser debido al diferente estado en riboflavina. La media de la concentración de riboflavina de las mujeres en edad fértil no embarazadas es inferior a la de la población. Esta menor concentración de riboflavina de las no embarazadas haría que se observase más claramente el efecto de una menor concentración de riboflavina sobre la tHcy en las homocigóticas y heterocigóticas para *MTRR* 66 A>G.

Se observó que no existía una gran diferencia de comportamiento de la tHcy, entre las participantes homocigóticas o heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T respecto a las salvajes para este mismo polimorfismo en función del estado en riboflavina, excepto en el estado alto de riboflavina, donde presentan un 11,5% menos de tHcy. Cuando se analizó el estado en tHcy según *MTRR* 524 C>T se observó una tendencia a disminuir la tHcy en las portadoras del alelo mutante T

para este polimorfismo. Según los resultados obtenidos esta disminución de la tHcy se da solamente en las portadoras del alelo mutante T que se encuentran en el estado alto de riboflavina.

5.2.2. THcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos

Las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T presentaron una tHcy mayor que las del grupo de referencia, heterocigóticas y salvajes para el mismo polimorfismo, independientemente del estado en folato. Cuando el estado en folato era alto esta mayor tHcy de las homocigóticas respecto a la del grupo de referencia era mayor que cuando el estado en folato era bajo. Estos resultados son sorprendentes ya que se ha observado en varios estudios que una menor concentración de folato se ha asociado con una mayor tHcy⁽¹²⁵⁻¹²⁹⁾. Como hemos visto anteriormente, el ácido fólico podía solucionar el aumento de tHcy debido a ser homocigótico para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T de dos maneras diferentes, mediante la estabilización de la unión entre MTHFR y su cofactor FAD⁽⁴²⁾ y mediante un *bypass* de este punto del ciclo.

La forma mayoritaria de folato en el torrente sanguíneo es el CH₃THF⁽⁴⁰⁾. Una mayor concentración de folato podría provocar una acumulación de CH₃THF. El CH₃THF es el producto final de la reacción catalizada por MTHFR, con lo que esta acumulación de CH₃THF disminuiría la actividad del enzima no produciéndose así el grupo metilo necesario para la correcta remetilación de homocisteína a metionina mediante la MS. Esta menor actividad de MS debido a la falta de grupos metilo sería la responsable del aumento de la concentración de tHcy.

McNulty y colaboradores publicaron un estudio en el que se observaba que la suplementación con riboflavina provocaba una reducción del 22% de la tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T⁽²⁶⁾. Este estudio proponía una mejor estrategia para lidiar con el problema de la mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T demostrando que mejorando el estado nutricional en riboflavina se podía solucionar el problema atacando directamente a su punto de origen y no siendo necesario hacer un *bypass* sobre el problema mediante la suplementación

con ácido fólico, que a la luz de estos resultados podría provocar los resultados opuestos a los deseados.

El estado en cobalamina tenía un efecto prácticamente nulo sobre la tHcy de las portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en comparación con las salvajes para este mismo polimorfismo. Cuando se analizó el estado en tHcy según *MTRR* 66 A>G se observó una tendencia a aumentar la tHcy en las portadoras del alelo mutante G para este polimorfismo. Este hecho explicaría porque no se observa una disminución en la tHcy cuando el estado en cobalamina era alto.

Las portadoras del alelo mutante del polimorfismo *MTRR* 524 C>T que se encontraban en un mejor estado en cobalamina presentaban una menor tHcy en comparación con las salvajes para el mismo polimorfismo. Estos mismos resultados se observaron en la población en los individuos del estudio poblacional que se encontraban en el estado medio o alto de cobalamina. Cuando se analizó el estado en tHcy según *MTRR* 524 C>T se observó una tendencia a disminuir la tHcy en las portadoras del alelo mutante T para este polimorfismo. Según los resultados obtenidos esta disminución de la tHcy se da solamente en las portadoras del alelo mutante T que se encuentran en el estado alto en cobalamina. La MS, que tiene cobalamina como cofactor, es la encargada de catalizar el paso de homocisteína a metionina⁽⁵⁷⁾. Un estado alto en cobalamina facilitaría el correcto funcionamiento de MS viéndose así reducida la tHcy.

5.2.3. Efecto del genotipo sobre la tHcy en función del estado en riboflavina y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

Se observó que la tHcy de las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T que se encontraban por encima de la mediana de folato la tHcy estaba inversamente relacionada con el estado en riboflavina.

Anteriormente, cuando se analizó el estado en tHcy según *MTHFR* 677 C>T en función del estado en folato se observó una mayor tHcy en las homocigóticas respecto al grupo de referencia en las participantes que se encontraban en el estado alto en folato. Cuando se tiene también en cuenta el estado en riboflavina se

observa que esta mayor tHcy de las homocigóticas respecto al grupo de referencia se da solamente en las participantes que se encuentran en un estado bajo o medio en riboflavina.

Ya se ha observado que una descompensación entre la concentración de folato y la de cobalamina, por deficiencia de esta última, puede manifestarse como una deficiencia funcional en folato a pesar de presentar un buen estado en éste que se ve reflejada con un aumento en tHcy, esto es lo que se conoce como la trampa de metilos⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Una deficiencia en cobalamina impediría un correcto funcionamiento de MS con lo que no se produciría el paso de CH₃THF a THF. Por otra parte la reacción de MTHFR es irreversible con lo que CH₂THF pasa a CH₃THF. De esta manera el folato celular está atrapado en forma de CH₃THF ya que no puede pasar a THF ni puede volver a CH₂THF⁽⁵⁹⁾. Además, la reducción de la actividad de la MS, debida a la deficiencia en cobalamina, impide la remetilación de la homocisteína. Con lo que el resultado es un aumento en la tHcy. Esta teoría ha sido avalada por varios estudios⁽⁶²⁻⁶⁴⁾.

En este caso hemos analizado la concentración de cobalamina en las participantes y no hemos encontrado diferencia entre la concentración de cobalamina según el estado en folato y en riboflavina. Esto nos indica de los resultados obtenidos no son debido a la cobalamina, sino que son debido al estado en riboflavina.

Una deficiencia en riboflavina también podría provocar un efecto similar a la trampa de metilos. La MTRR es una flavoproteína que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es ésta la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾. Una deficiencia en riboflavina podría provocar un mal funcionamiento de MTRR con lo que a pesar de presentar una buena concentración en cobalamina, ésta una vez desactivada no podría volver a ser activada. Este mal funcionamiento provocaría un aumento de la tHcy similar al que se produce en la trampa de metilos.

Anteriormente, se había observado que el estado en riboflavina modificaba la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy. Cuando tenemos en cuenta también el estado en folato se observa que esta interacción entre el estado en riboflavina y el genotipo sobre la tHcy se produce sólo cuando el estado en folato es alto. El alto nivel de significación alcanzado (p de interacción <0,001) sugiere que

el estado en riboflavina tiene un fuerte efecto modulador de la relación polimorfismo-tHcy.

Se observa que cuando el estado en cobalamina es alto el estado en riboflavina no tiene un gran efecto sobre la tHcy de las portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G en comparación con los salvajes para este mismo polimorfismo. En cambio cuando la concentración de cobalamina está por debajo de la mediana, el comportamiento de la tHcy de las portadoras del alelo mutante en comparación con las que no es totalmente diferente en función del estado en riboflavina. Cuando el estado en riboflavina es alto presentan una mayor tHcy, por el contrario, cuando el estado es bajo presentan una menor tHcy.

Una posible explicación porque el aumento de tHcy de las portadoras del alelo mutante G que se encontraban en un estado alto de riboflavina era mayor cuando se encontraban por debajo de la mediana de cobalamina podría basarse en la función chaperona de *MTRR*. Una desproporción en el ratio cobalamina/riboflavina por exceso de esta última podría interferir de alguna manera en la interacción *MTRR*-MS impidiendo así el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en forma de aumento de tHcy.

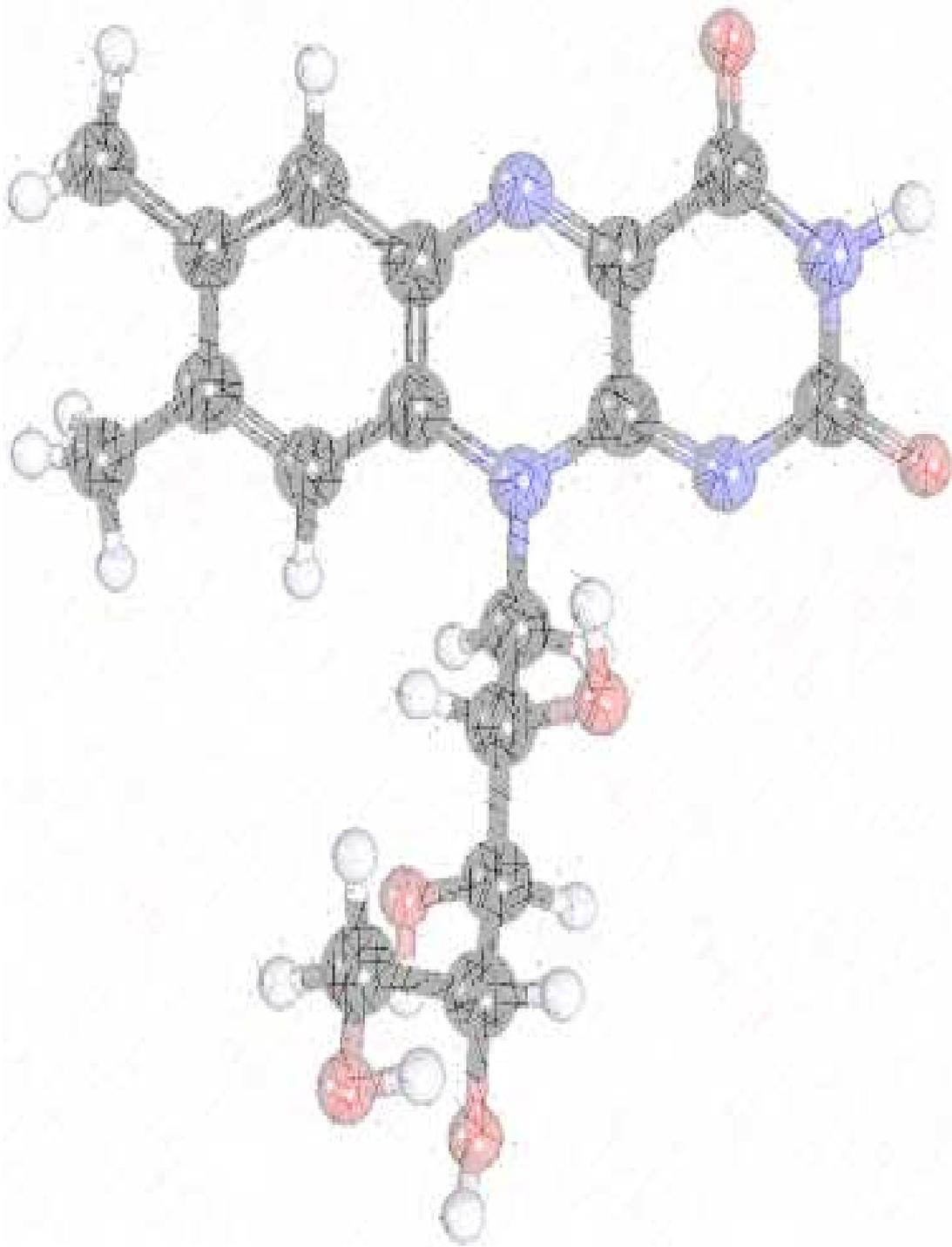
Se observa que las portadoras del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T presentan siempre una menor tHcy que las heterocigóticas y salvajes para este mismo polimorfismo a excepción de cuando el estado en riboflavina y cobalamina es bajo. La MS, que tiene cobalamina como cofactor, es la encargada de catalizar el paso de homocisteína a metionina⁽⁵⁷⁾. Un estado bajo en cobalamina dificultaría el correcto funcionamiento de MS. La *MTRR* es una flavoproteína que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es ésta la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾. Una deficiencia en riboflavina podría afectar al correcto funcionamiento de *MTRR*, lo que provocaría una disminución de metilcob(III)alamina viéndose así afectado el correcto funcionamiento de MS. Esto explicaría porque una combinación de estado bajo en cobalamina y en riboflavina provoca una mayor tHcy.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



*ESTUDIO
LONGITUDINAL EN UNA
MUESTRA DE GESTANTES
(NutCIR)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

6.1. RESULTADOS

En la tabla 15 se pueden observar algunas de las características de las participantes en el estudio NutCIR y de sus embarazos.

De ellas solamente destacar que la media de edad de las participantes en el estudio era de 31,8 años.

El 32,0% de las mujeres eran fumadoras al inicio del embarazo y el 18,4% continuo fumando durante todo el embarazo.

El 94,3% de las participantes tomaban suplementos de ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo y un 55,3% seguían tomándolo durante todo el embarazo. En cambio, sólo un 4,8% de las mujeres tomaban suplementos que contengan riboflavina al inicio del embarazo, este porcentaje aumenta hasta el 9,3% en la segunda parte del embarazo.

El 45,8% de las embarazadas eran primíparas y la edad gestacional media en el momento del parto fue de 38,9 semanas.

En la tabla 16 se puede observar como las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban a lo largo de todo el embarazo un peor estado en folato que las salvajes y una mayor tHcy que las heterocigóticas y salvajes para este polimorfismo. El hecho que lo homocigóticos tengan un comportamiento diferente a los heterocigóticos y salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de los homocigóticos respecto al de los heterocigóticos y salvajes (grupo de referencia) cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o folato plasmático.

En la tabla 17 se observa que los indicadores del estado en folato y cobalamina no varían entre los diferentes genotipos con la excepción de la tHcy durante el primer trimestre del embarazo, que era mayor en las portadoras del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G.

Tabla 15 : Características de las participantes y sus embarazos (n =518)

Edad, años	31,8 (31,4 – 32,2)
IMC, Kg/m ²	23,7 (23,3 – 24,1)
Fumadoras, %	
• 1 ^{er} trimestre	32,0 (28,1 – 36,2)
• 2 ⁿ y 3 ^{er} trimestre	18,4 (15,3 – 20,2)
Toman café, %	
• 1 ^{er} trimestre	47,4 (42,8 – 52,1)
• 2 ⁿ y 3 ^{er} trimestre	44,2 (39,3 – 49,3)
Suplemento ácido fólico, %	
• 1 ^{er} trimestre	94,3 (91,9 – 96,1)
• 2 ⁿ y 3 ^{er} trimestre	55,3 (50,8 – 59,7)
Suplemento con hierro, %	
• 1 ^{er} trimestre	19,7 (16,4 – 23,6)
• 2 ⁿ y 3 ^{er} trimestre	78,1 (73,8 – 81,9)
Suplemento con B ₂ , %	
• 1 ^{er} trimestre;	4,8 (3,1 – 3,7)
• 2 ⁿ y 3 ^{er} trimestre	9,3 (6,7 – 12,7)
Primíparas, %	45,8 (41,5 – 50,2)
Edad gestacional al parto, semanas	38,9 (38,76 – 39,04)
Nacidos varones, %	47,9 (43,5 – 52,3)
Peso al nacer, gramos	3195 (3155 – 3236)

Media aritmética (IC 95%); IMC: Índice de Masa Corporal en la primera visita.

En la tabla 18 se observó una tendencia a que las homocigóticas o heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T presentaran un mejor estado en folato, tanto plasmático como eritrocitario, que las salvajes para ese mismo polimorfismo a lo largo de todo el embarazo. No obstante el estado en cobalamina y tHcy no variaba entre los genotipos, a excepción de en el tercer trimestre del embarazo donde las portadoras del alelo mutante T presentaban más tHcy que las salvajes para este mismo polimorfismo.

El hecho que las homocigóticas y heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G tengan un comportamiento diferente a las salvajes para este mismo polimorfismo nos permite utilizar la estrategia de comparar el comportamiento de las homocigóticas y las heterocigóticas respecto al de las salvajes cuando estudiamos el efecto del polimorfismo sobre tHcy en función del estado en riboflavina y/o cobalamina plasmática. Por mimetismo utilizamos la misma estrategia con el polimorfismo *MTRR* 524 C>T.

En la tabla 19 se observa el porcentaje de cada genotipo para los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

El 64,1% de las embarazadas eran portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 17,4% eran homocigóticas para este polimorfismo.

El 70,8% de las embarazadas eran portadoras del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 25,8% eran homocigóticas para este polimorfismo.

El 57,9% de las embarazadas eran portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 11,9% eran homocigóticas para este polimorfismo.

Tabla 16: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según *MTHFR* 677 C>T

	N [%]	EGRAC¹	FP², nmol/L	FE², nmol/L	B₁₂², pmol/L	tHcy³, µmol/L
< 12 SG						
CC	176 [35,0]	1,14 (1,12 – 1,17)	26,9 (24,2 – 29,9)	1020 (939 – 1110)	357 (342 – 373)	5,12 (4,97 – 5,26)
CT	240 [47,7]	1,16 (1,13 – 1,18)	24,4 (22,2 – 26,8)	981 (913 – 1054)	373 (356 – 391)	5,18 (5,04 – 5,32) ^{†††}
TT	87 [17,3]	1,19 (1,13 – 1,25)	27,1 (22,9 – 32,1)	861 (756 – 981)*	348 (321 – 378)	5,81 (5,51 – 6,12) ^{***}
24 – 27 SG						
CC	160 [35,2]	1,18 (1,15 – 1,22)	13,2 (11,8 – 14,8)	1164 (1082 – 1252)	272 (259 – 286)	4,51 (4,38 – 4,65)
CT	214 [47,0]	1,19 (1,16 – 1,21)	12,6 (11,4 – 13,8)	1093 (1019 – 1173)	273 (261 – 286)	4,57 (4,44 – 4,71) ^{†††}
TT	81 [17,8]	1,19 (1,16 – 1,23)	12,9 (10,8 – 15,2)	982 (858 – 1124)*	266 (245 – 290)	5,09 (4,83 – 5,36) ^{***}
34 SG						
CC	151 [34,1]	1,20 (1,17 – 1,23)	11,0 (9,7 – 12,5)	944 (861 – 1035)	243 (230 – 258)	5,10 (4,93 – 5,27)
CT	213 [48,1]	1,18 (1,16 – 1,21) [†]	10,6 (9,6 – 11,8)	908 (842 – 979)	247 (236 – 259)	5,20 (5,05 – 5,05) ^{†††}
TT	79 [17,8]	1,24 (1,18 – 1,29)	11,0 (9,2 – 13,3)	803 (692 – 932)*	243 (223 – 265)	5,90 (5,55 – 6,27) ^{***}

¹Media aritmética ²Media geométrica ³Media geométrica ajustada por edad gestacional, folato plasmático y centro de estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 vs salvajes † p<0,05 ††† p<0,001 vs homocigóticos.

Tabla 17: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según *MTRR 66 A>G*

	N [%]	EGRAC¹	FP², nmol/L	FE², nmol/L	B₁₂², pmol/L	tHcy³, µmol/L
< 12 SG						
AA	147 [29,3]	1,16 (1,13 – 1,18)	28,8 (25,6 – 32,5)	1031 (936 – 1135)	366 (345 – 389)	5,11 (4,94 – 5,29)
AG	226 [45,0]	1,16 (1,13 – 1,19)	24,3 (22,1 – 26,8)*	956 (884 – 1034)	357 (343 – 371)	5,26 (5,10 – 5,42)
GG	129 [25,7]	1,16 (1,14 – 1,28)	24,9 (21,9 – 28,3)	937 (856 – 1025)	371 (347 – 396)	5,43 (5,25 – 5,61)*
24 – 27 SG						
AA	134 [29,5]	1,18 (1,15 – 1,21)	13,3 (11,6 – 15,2)	1151 (1041 – 1273)	265 (250 – 281)	4,44 (4,69 – 5,34)
AG	203 [44,7]	1,16 (1,14 – 1,19) ^{††}	12,7 (11,5 – 14,0)	1088 (1015 – 1165)	269 (257 – 281)	4,57 (4,39 – 4,76)
GG	117 [25,8]	1,23 (1,18 – 1,27)*	12,6 (11,1 – 14,2)	1049 (960 – 1147)	285 (266 – 306)	4,69 (4,51 – 4,87)
34 SG						
AA	127 [28,7]	1,21 (1,17 – 1,25)	10,7 (9,2 – 12,5)	949 (845 – 1066)	244 (229 – 260)	5,20 (4,97 – 5,45)
AG	198 [44,8]	1,18 (1,15 – 1,20)	10,7 (9,6 – 11,8)	889 (824 – 959)	239 (228 – 251)	5,28 (5,12 – 5,44)
GG	117 [26,5]	1,21 (1,18 – 1,25)	11,3 (9,8 – 12,9)	866 (780 – 960)	257 (240 – 275)	5,38 (5,17 – 5,60)

¹Media aritmética ²Media geométrica ³Media geométrica ajustada por edad gestacional, folato plasmático y centro de estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas; * p<0,05 vs salvajes ^{††} p<0,01 vs homocigóticos.

Tabla 18: Estado nutricional en vitaminas del grupo B y tHcy a lo largo del embarazo según *MTRR 524 C>T*

	N [%]	EGRAC¹	FP², nmol/L	FE², nmol/L	B₁₂², pmol/L	tHcy³, µmol/L
< 12 SG						
CC	212 [42,2]	1,16 (1,13 – 1,19)	24,1 (21,7 – 26,7)	915 (848 – 987)	355 (329 – 372)	5,26 (5,09 – 5,43)
CT	231 [46,0]	1,16 (1,14 – 1,18)	26,8 (24,5 – 29,4)	1016 (939 – 1099)	365 (348 – 382)	5,28 (5,14 – 5,42)
TT	59 [11,8]	1,16 (1,12 – 1,20)	27,5 (22,9 – 33,1)	1024 (905 – 1160)	383 (353 – 414)	5,24 (4,98 – 5,51)
24 – 27 SG						
CC	187 [41,2]	1,19 (1,16 – 1,22)	12,9 (11,6 – 14,3)	1066 (991 – 1147)	267 (253 – 281)	4,68 (4,52 – 4,84)
CT	209 [46,0]	1,18 (1,15 – 1,20)	12,7 (11,5 – 14,1)	1130 (1049 – 1217)	273 (261 – 286)	4,59 (4,46 – 4,73)
TT	58 [12,8]	1,20 (1,14 – 1,27)	13,3 (11,3 – 15,7)	1103 (974 – 1249)	281 (260 – 303)	4,72 (4,50 – 4,96)
34 SG						
CC	185 [41,9]	1,18 (1,16 – 1,21)	9,9 (8,9 – 11,0)	849 (781 – 923)	237 (225 – 249)	5,20 (5,02 – 5,39)
CT	207 [46,8]	1,21 (1,18 – 1,24)	11,4 (10,2 – 12,7)	942 (867 – 1024)	250 (238 – 263)	5,36 (5,20 – 5,53)
TT	50 [11,3]	1,21 (1,15 – 1,27)	12,3 (10,0 – 15,3)	944 (821 – 1084)	255 (233 – 279)	5,31 (4,97 – 5,68)

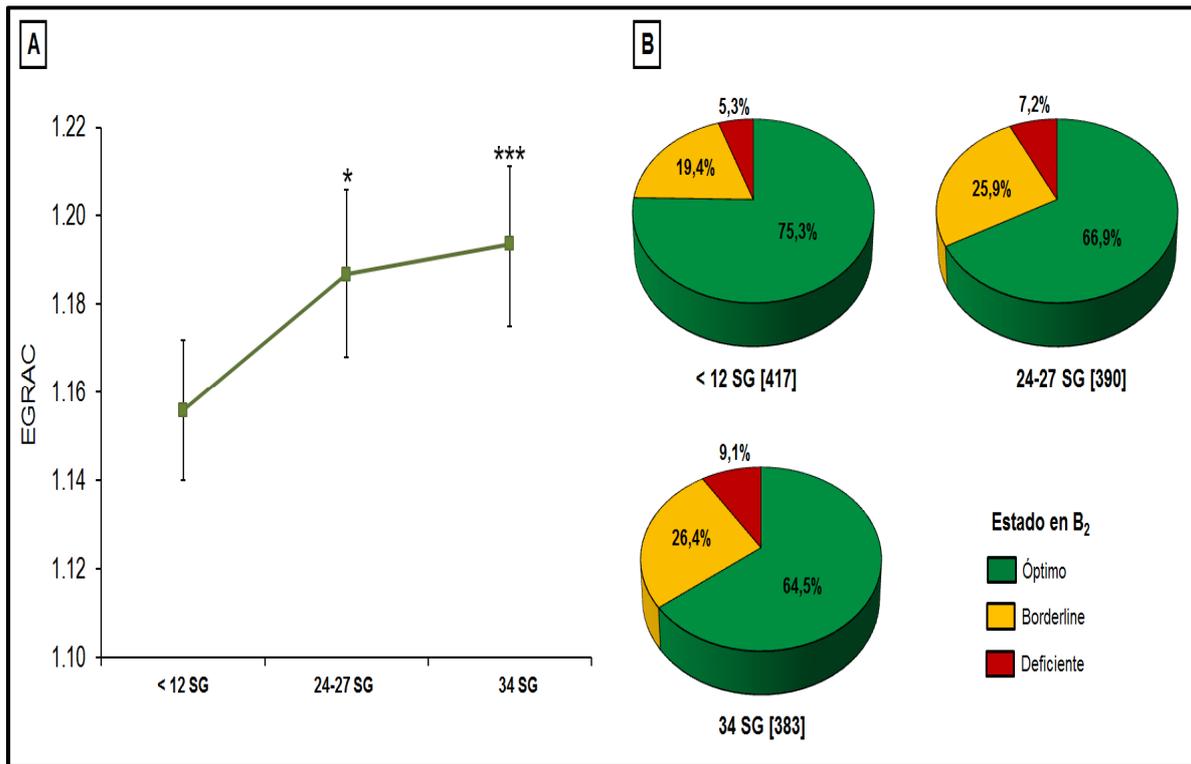
¹Media aritmética ²Media geométrica ³Media geométrica ajustada por edad gestacional, folato plasmático y centro de estudio (IC 95%); *FP*: Folato plasmático, *FE*: Folato eritrocitario, *tHcy*: Homocisteína total plasmática en ayunas.

Tabla 19: Distribución de los genotipos

	N	%
<i>MTHFR 677 C>T</i>		
CC	176	34,9
CT	241	47,7
TT	88	17,4
CT + TT	329	64,1
<i>MTRR 66 A>G</i>		
AA	147	29,2
AG	227	45,0
GG	130	25,8
AG + GG	357	70,8
<i>MTRR 524 C>T</i>		
CC	212	42,1
CT	232	46,0
TT	60	11,9
CT + TT	449	57,9

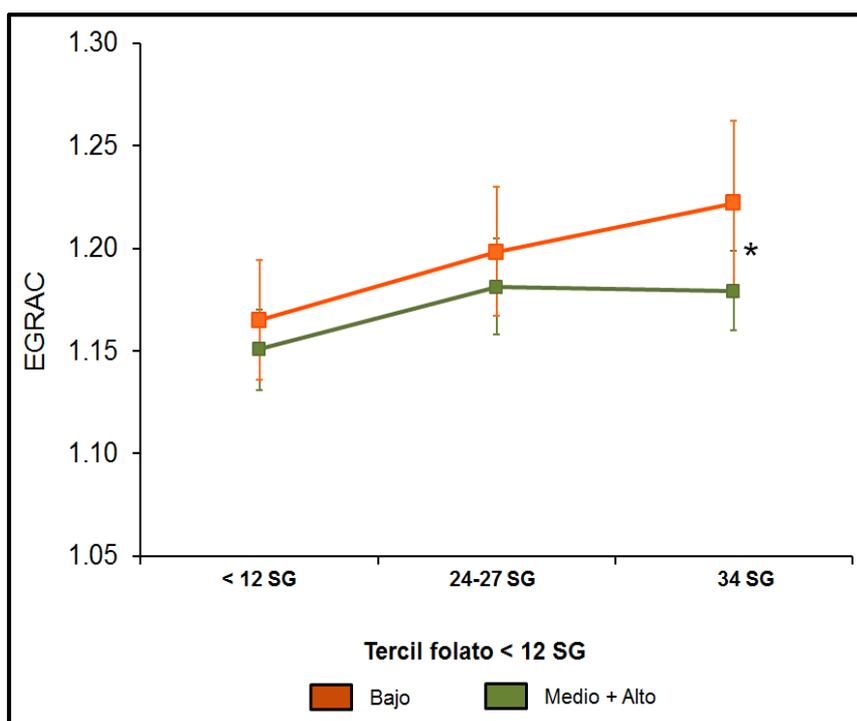
6.1.1. Evolución del estado en riboflavina durante el embarazo

La evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo se puede observar en la gráfica 18. En esta gráfica se observa cómo el estado en riboflavina empeoraba a medida que avanzaba el embarazo, el valor del EGRAC era un 2,7% superior a las 24–27 SG respecto a <12 SG y un 3,3% a las 34 SG (gráfica 18A). Cuando se estudió cómo evolucionaba el porcentaje de mujeres que presentaban deficiencia de riboflavina a lo largo del embarazo se observó que había un aumento del 71,7% de mujeres en el tercer trimestre del embarazo en comparación con las del primer trimestre (gráfica 18B).



Gráfica 18. Evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo.* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ respecto a las <12 SG, medido con ANOVA de medidas repetidas con corrección post-hoc de Bonferroni ($n=351$). Estado en riboflavina óptimo ($EGRAC < 1,2$), borderline ($EGRAC \geq 1,2 < 1,4$) y deficiente ($EGRAC \geq 1,4$) [número de individuos].

Al estudiar cómo evolucionaba el estado en riboflavina a lo largo del embarazo en función del estado en folato plasmático al principio de éste se pudo observar que el estado en riboflavina empeoraba tanto en las gestantes del tercil bajo como en las del tercil medio-alto de folato (gráfica 19). También se pudo observar como durante todo el embarazo las mujeres que se encontraban en un mejor estado en folato presentaban valores inferiores de EGRAC, o lo que es lo mismo, un mejor estado en riboflavina. Esta diferencia entre los valores de EGRAC según el estado en folato plasmático es significativa en el tercer trimestre del embarazo presentando las participantes en un peor estado en folato un 3,7% más de EGRAC que las que se encontraban en un mejor estado.

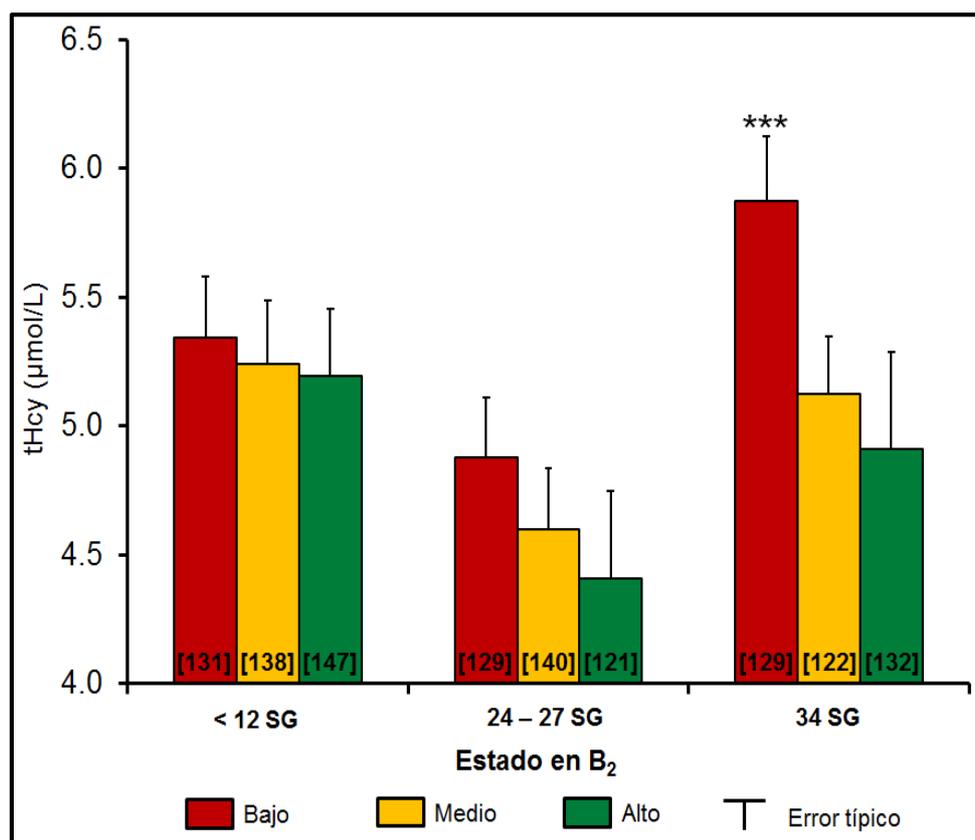


Gráfica 19. Efecto de la concentración de folato plasmático a <12 SG sobre el EGRAC a lo largo del embarazo. * $p < 0,05$ entre tercil bajo y tercil medio + alto medida con ANOVA. Tercil bajo de folato ($< 18,8$ nmol/L) tercil medio + alto de folato ($\geq 18,8$ nmol/L); $n=351$.

6.1.2. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina

La evolución de la tHcy en función del estado en riboflavina a lo largo del embarazo se puede observar en la gráfica 20. Se observa como durante todo el embarazo la tHcy es mayor en las participantes que presentan un peor estado en riboflavina. Esta diferencia se va haciendo más evidente a medida que avanza el embarazo. En el tercer trimestre del embarazo las participantes con un estado bajo en riboflavina presentan un 19,6% más de tHcy que las que están en un estado alto.

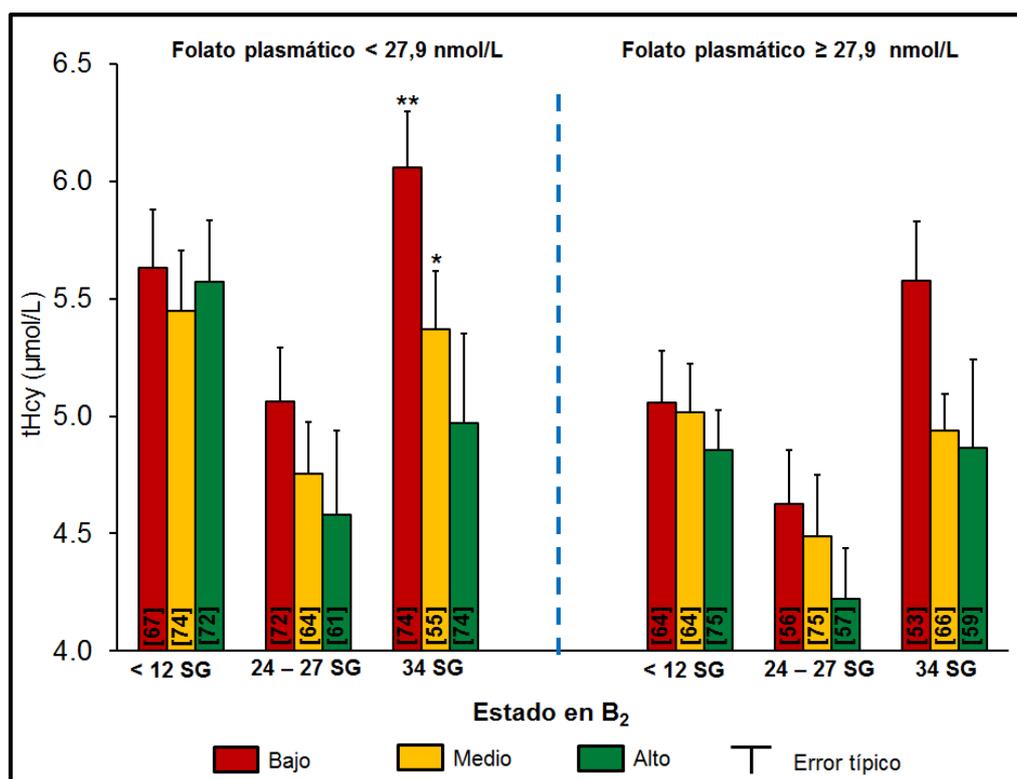
Cuando se estudió la evolución de la tHcy según el estado en riboflavina a lo largo del embarazo en función del estado en folato al inicio de éste (<12 SG) se observó que las participantes que comenzaron el embarazo con un peor estado en folato presentaban durante todo el embarazo una mayor tHcy (gráfica 21).



Gráfica 20. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina. Regresión lineal múltiple con tHcy como variable dependiente y ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, IMC, tabaco, partos anteriores, edad madre, edad gestacional en el momento de la extracción, *MTHFR* 677 C>T y centro del estudio.***p<0,001 vs estado en riboflavina alto. Estado en riboflavina bajo (<12SG EGRAC ≥1,17; 24–27SG EGRAC ≥1,20; 34SG EGRAC ≥1,22), medio (<12SG EGRAC ≥1,09 <1,17; 24–27SG EGRAC ≥1,11 <1,20; 34SG EGRAC ≥1,11 <1,22) y alto (<12SG EGRAC <1,09; 24–27SG EGRAC <1,11; 34SG EGRAC <1,11); [número de individuos]

Independientemente del estado en folato con el que se comenzara el embarazo se pudo observar que un peor estado en riboflavina estaba asociado a una mayor tHcy. Esta asociación se pudo observar mucho más claramente al final del embarazo llegando a ser significativa en las participantes que comenzaron el embarazo con un peor estado en folato.

Las participantes con un estado en riboflavina medio o bajo al final del embarazo (34SG) que comenzaron éste en un peor estado en folato presentaban un 8,1% y 21,9% más de tHcy respectivamente que las que se encontraban en el tercil alto de riboflavina.



Gráfica 21. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina según el estado en folato plasmático al inicio del embarazo. Regresión lineal múltiple estratificada por mediana de folato plasmático a <12 SG con tHcy como variable dependiente y ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, IMC, tabaco, partos anteriores, edad madre, edad gestacional en el momento de la extracción, *MTHFR* 677 C>T y centro del estudio.*p<0,05 **p<0,01 vs estado en riboflavina alto. Estado en riboflavina bajo (<12SG EGRAC ≥1,17; 24–27SG EGRAC ≥1,20; 34SG EGRAC ≥1,22), medio (<12SG EGRAC ≥1,09 <1,17; 24–27SG EGRAC ≥1,11 <1,20; 34SG EGRAC ≥1,11 <1,22) y alto (<12SG EGRAC <1,09; 24–27SG EGRAC <1,11; 34SG EGRAC <1,11); [número de individuos].

6.1.3. THcy según genotipo y estado en riboflavina

A parte de la influencia de los nutrientes que regulan la tHcy, la concentración de ésta también podría estar influenciada por polimorfismos que modifiquen la actividad enzimática de las enzimas que afectan directamente a la remetilación de la homocisteína a metionina.

En la gráfica 22 se puede observar la tHcy en tres puntos del embarazo en función del estado en riboflavina al inicio cuando se comparan las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T con las heterocigóticas o salvajes para este mismo polimorfismo.

Las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T presentaban durante todo el embarazo valores más elevados de tHcy que las heterocigóticas o salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en el estado medio o bajo de riboflavina, en cambio cuando se encontraban en el estado alto de riboflavina presentaban un ligero aumento de la tHcy que no era significativo en ningún punto.

También se observó que la asociación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy se veía modificada por el estado en riboflavina al principio y a mitad del embarazo (p de interacción = 0,020 y 0,004 respectivamente).

En la gráfica 23 se puede observar la tHcy cuando se comparan las portadoras del alelo mutante G del polimorfismo *MTRR* 66 A>G con las no portadoras del alelo para este mismo polimorfismo.

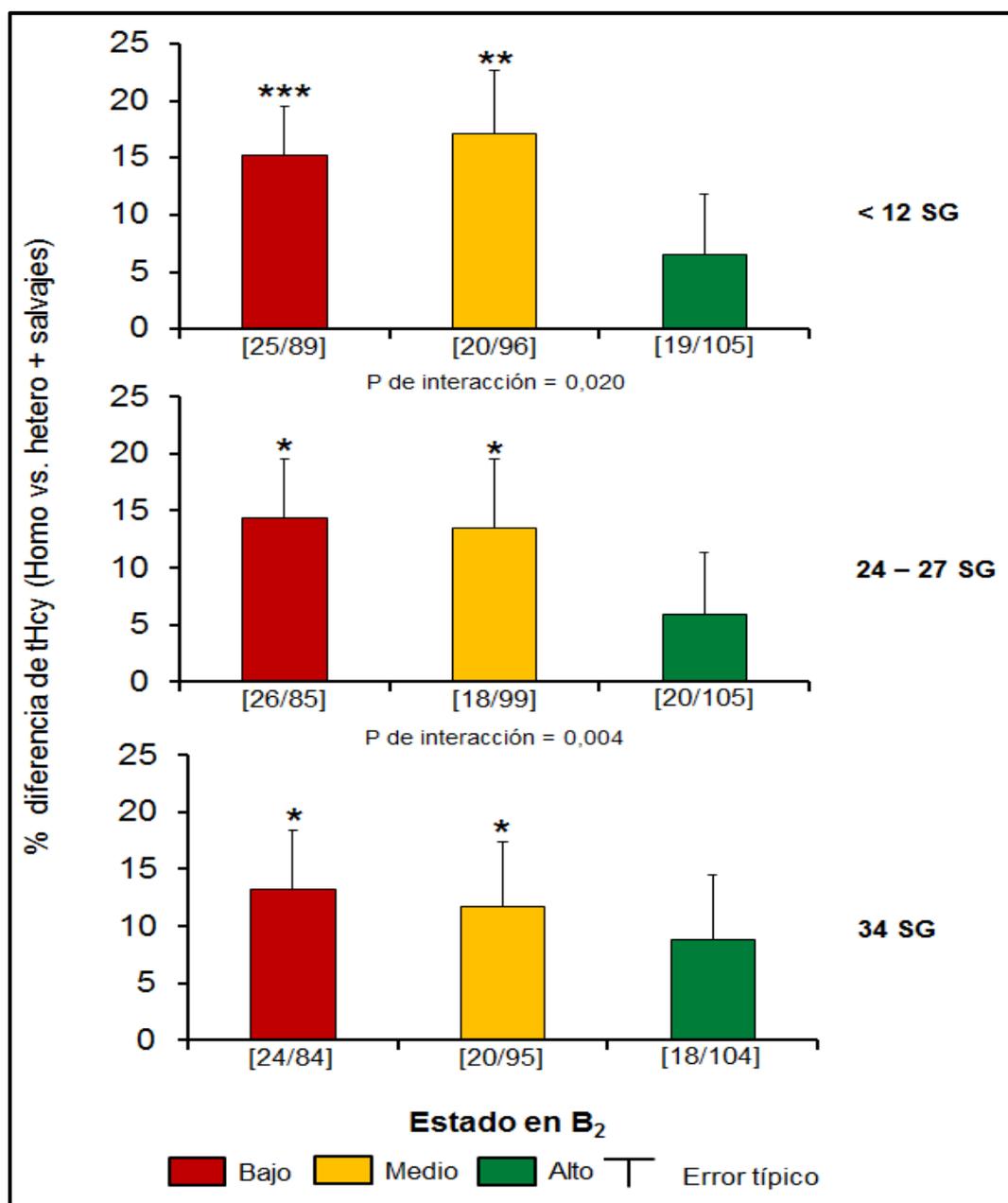
Las participantes homocigóticas o heterocigóticas para *MTRR* 66 A>G presentaban durante todo el embarazo valores superiores de tHcy que las salvajes para el mismo polimorfismo, cuando se encontraban en un mejor estado de riboflavina, aunque esta diferencia es solamente significativa al inicio del embarazo.

También se observó que la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y la tHcy se veía modificada según el estado en riboflavina en el segundo y tercer trimestre del embarazo (p de interacción = 0,055 y 0,012 respectivamente).

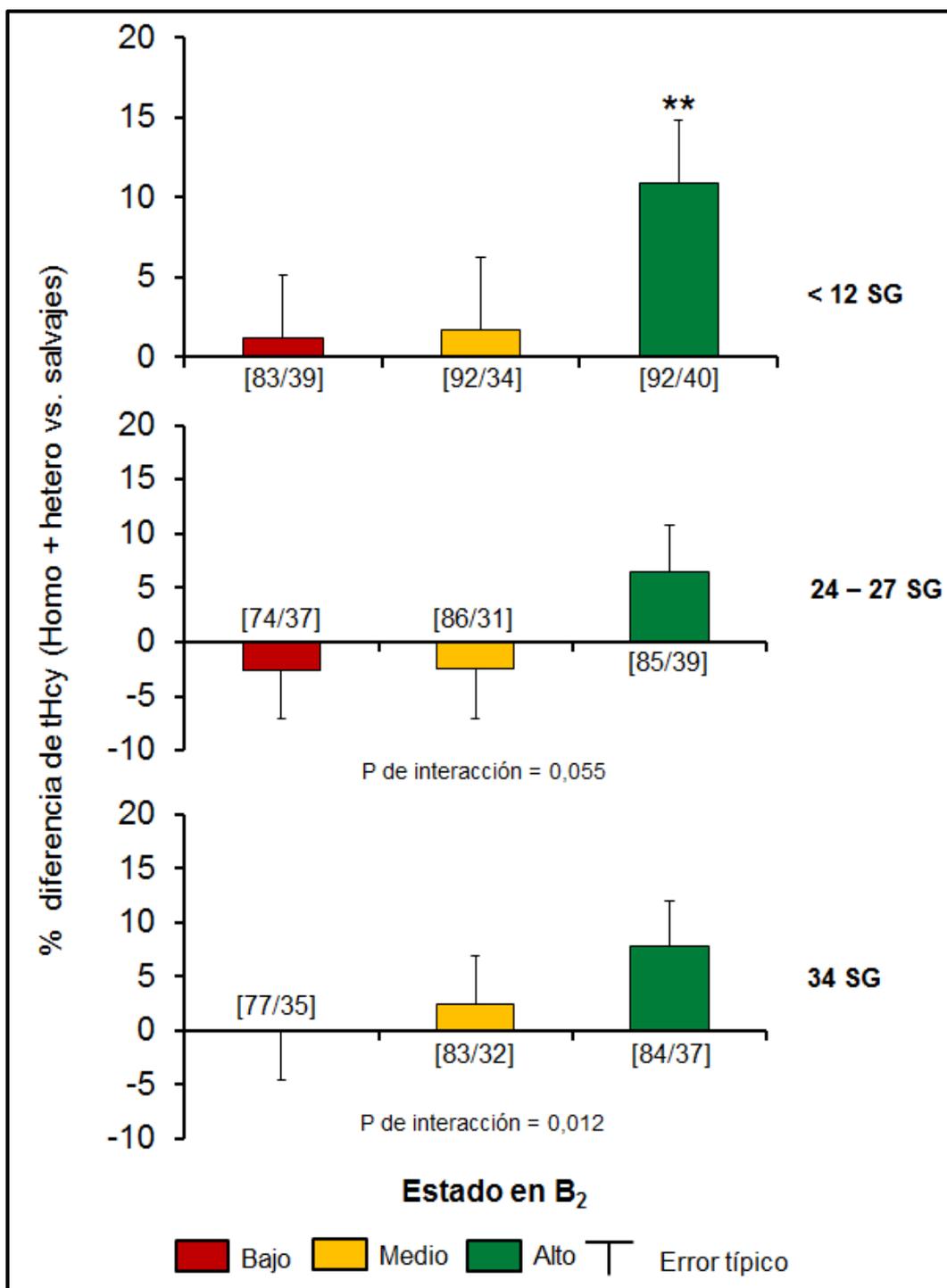
En la gráfica 24 se puede observar la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en riboflavina al inicio de éste, cuando se compara ser homocigótica o heterocigótica para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T con ser salvaje para este mismo polimorfismo.

Se constató durante todo el embarazo que cuando las portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se encontraban en un estado alto de riboflavina presentaban una mayor tHcy, en cambio, cuando se encontraban en el estado bajo de riboflavina la tHcy era menor que la de las salvajes para este mismo polimorfismo. Esta diferencia de tHcy entre las homocigóticas y heterocigóticas respecto a las salvajes era significativa solamente a las 24–27 SG.

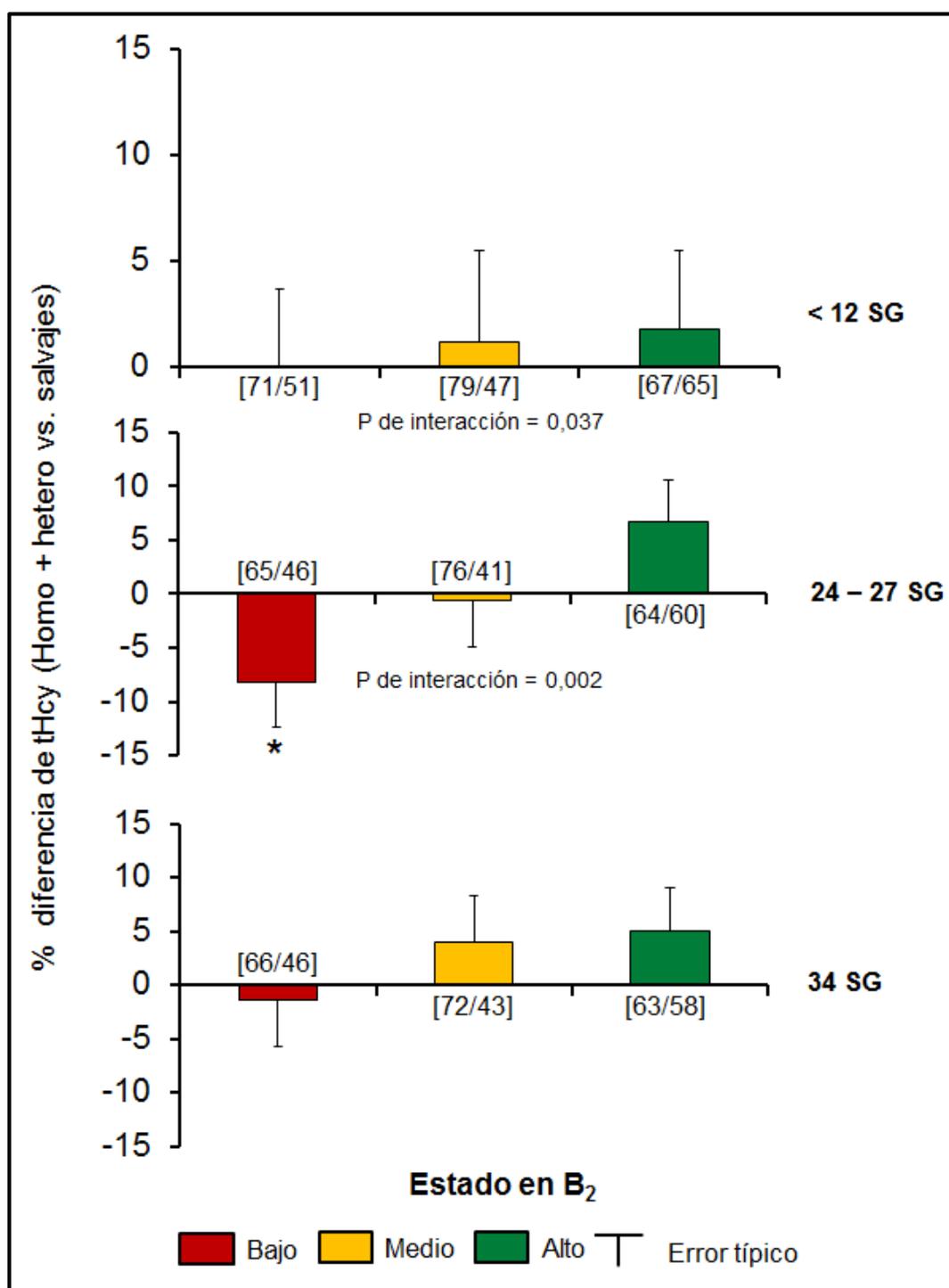
También se observó que la relación entre el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y la tHcy se veía alterada por el estado en riboflavina en el primer y segundo trimestre del embarazo (p de interacción = 0,037 y 0,002 respectivamente).



Gráfica 22. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs heterocigóticas y salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC $\geq 1,17$), medio (EGRAC $\geq 1,09$ $< 1,17$) y alto (EGRAC $< 1,09$); [número de homocigóticas / número de heterocigóticas + salvajes].



Gráfica 23. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. ** p<0,01 vs salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC ≥1,17), medio (EGRAC ≥1,09 <1,17) y alto (EGRAC <1,09); [número de homocigóticas + heterocigóticas / número de salvajes].



Gráfica 24. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 524 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * p<0,05 vs salvajes; estado en riboflavina bajo (EGRAC ≥1,17), medio (EGRAC ≥1,09 <1,17) y alto (EGRAC <1,09); [número de homocigóticas + heterocigóticas / número de salvajes].

6.1.4. tHcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos

Como la función de MTHFR está relacionada íntimamente con el estado en folato se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en folato plasmático.

Para realizar el análisis de la tHcy según genotipo y estado en folato se tomaron dos puntos de corte distintos para definir el estado en folato, uno al principio durante el uso protocolario de suplementación con ácido fólico y otro a las 24–27 SG después del cese de la suplementación protocolaria que servirá para el análisis del segundo y el tercer trimestre como ya se ha explicado en el apartado 3.3.3.

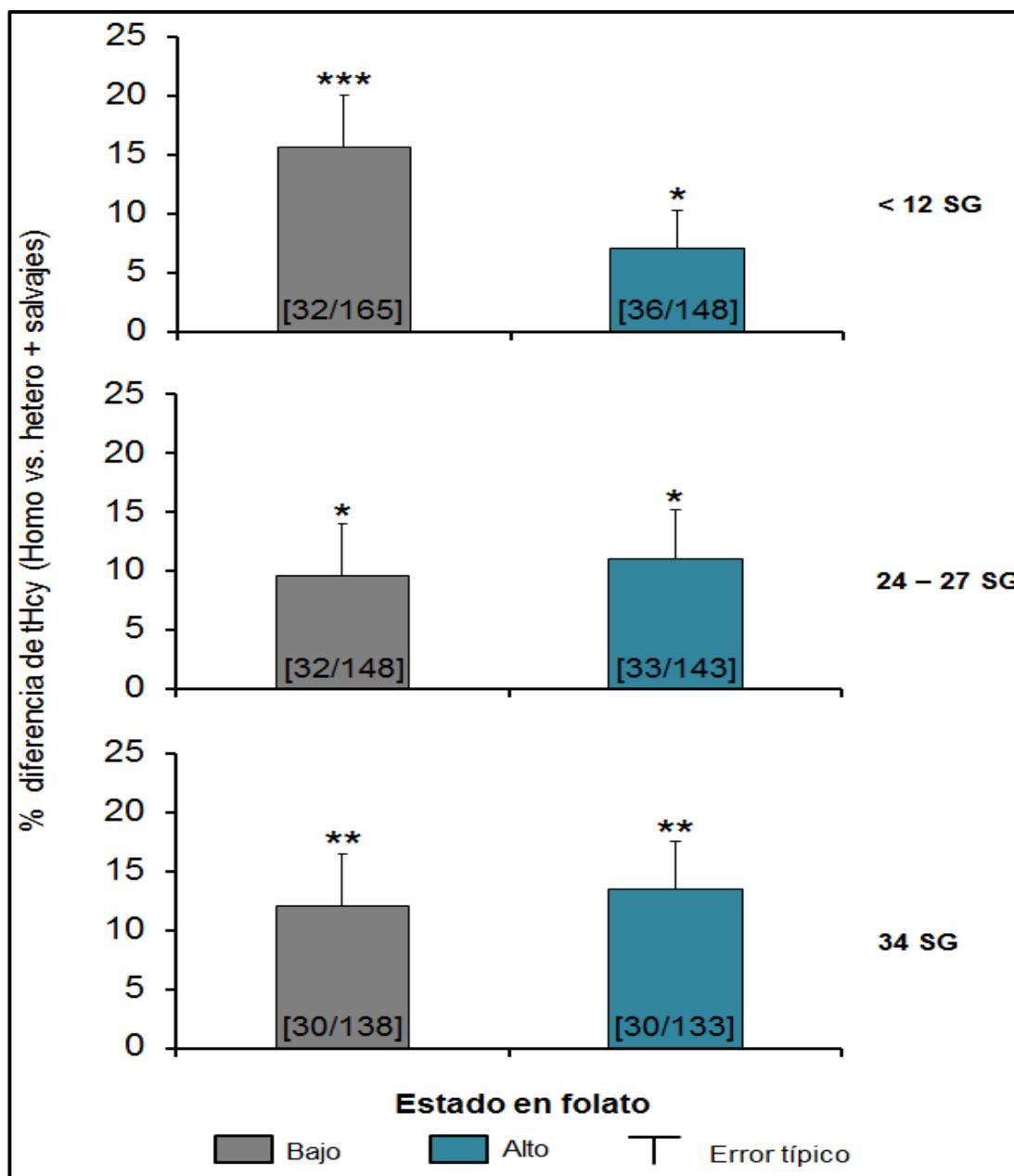
En la gráfica 25 se puede observar el diferente comportamiento de la tHcy entre las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T y las heterocigóticas o salvajes para el mismo polimorfismo, en función del estado en folato plasmático al inicio y en el segundo trimestre del embarazo (24–27 SG). Se puede observar como independientemente del estado en folato las TT presentaban una mayor tHcy, aunque esta diferencia era superior al inicio del embarazo en las mujeres con un estado en folato bajo.

La función de la MTRR está relacionada con la concentración de cobalamina, por ello se decidió estudiar cómo se comportaba la tHcy en función del genotipo y del estado en cobalamina plasmática.

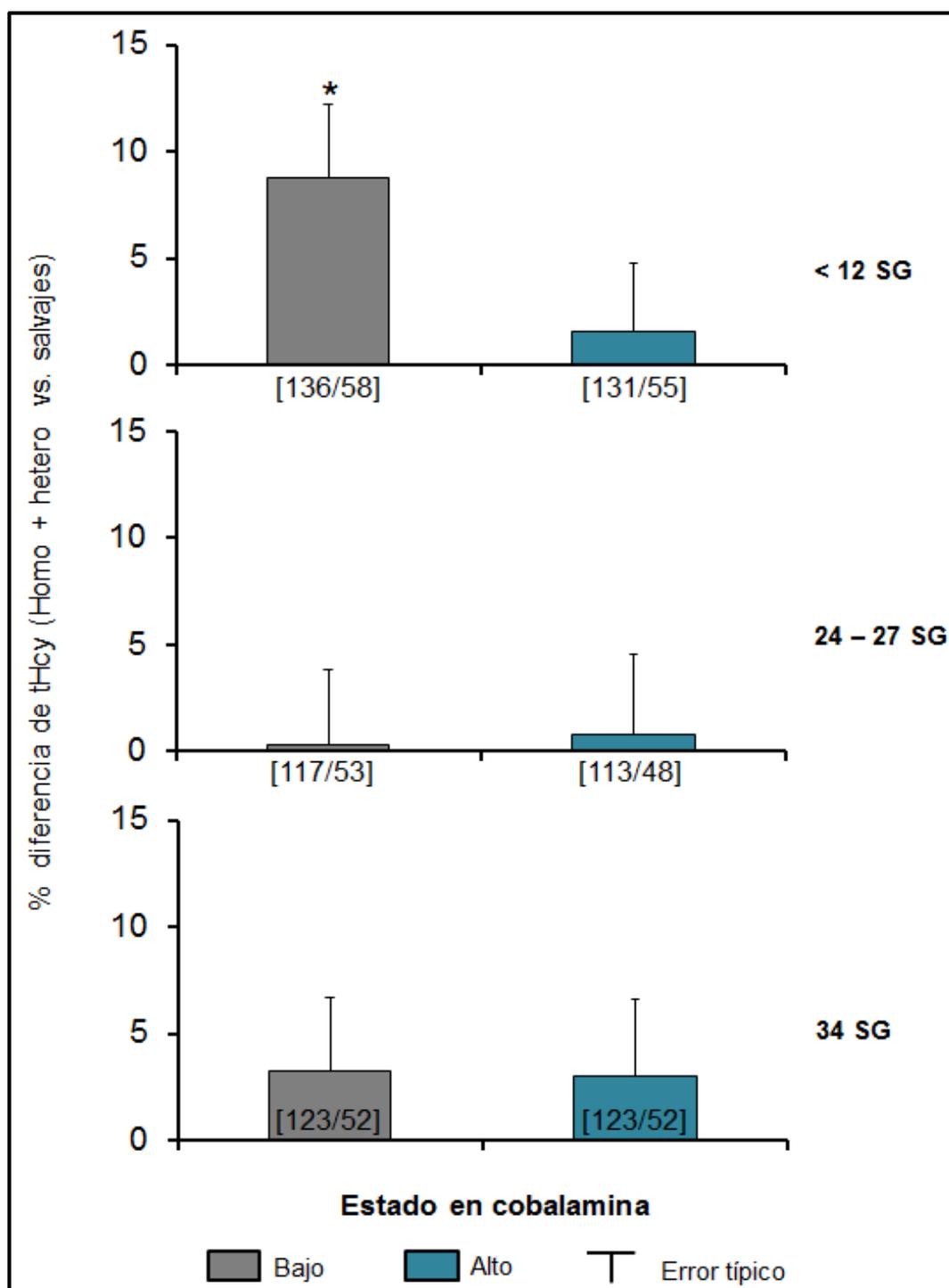
En la gráfica 26 se puede observar la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en cobalamina al inicio de éste cuando se compara ser homocigótica o heterocigótica para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G con ser salvaje para este mismo polimorfismo. Se observó cómo al inicio del embarazo las portadoras del alelo mutante que se encontraban en un estado en cobalamina bajo presentaban una mayor tHcy que las no portadoras. En la segunda parte del embarazo esta diferencia no existía.

En la gráfica 27 se observa que el efecto del ser portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy según el estado en cobalamina al inicio del embarazo era muy pequeño independientemente del estado en cobalamina o la edad gestacional. Se observa una ligera tendencia a más tHcy en

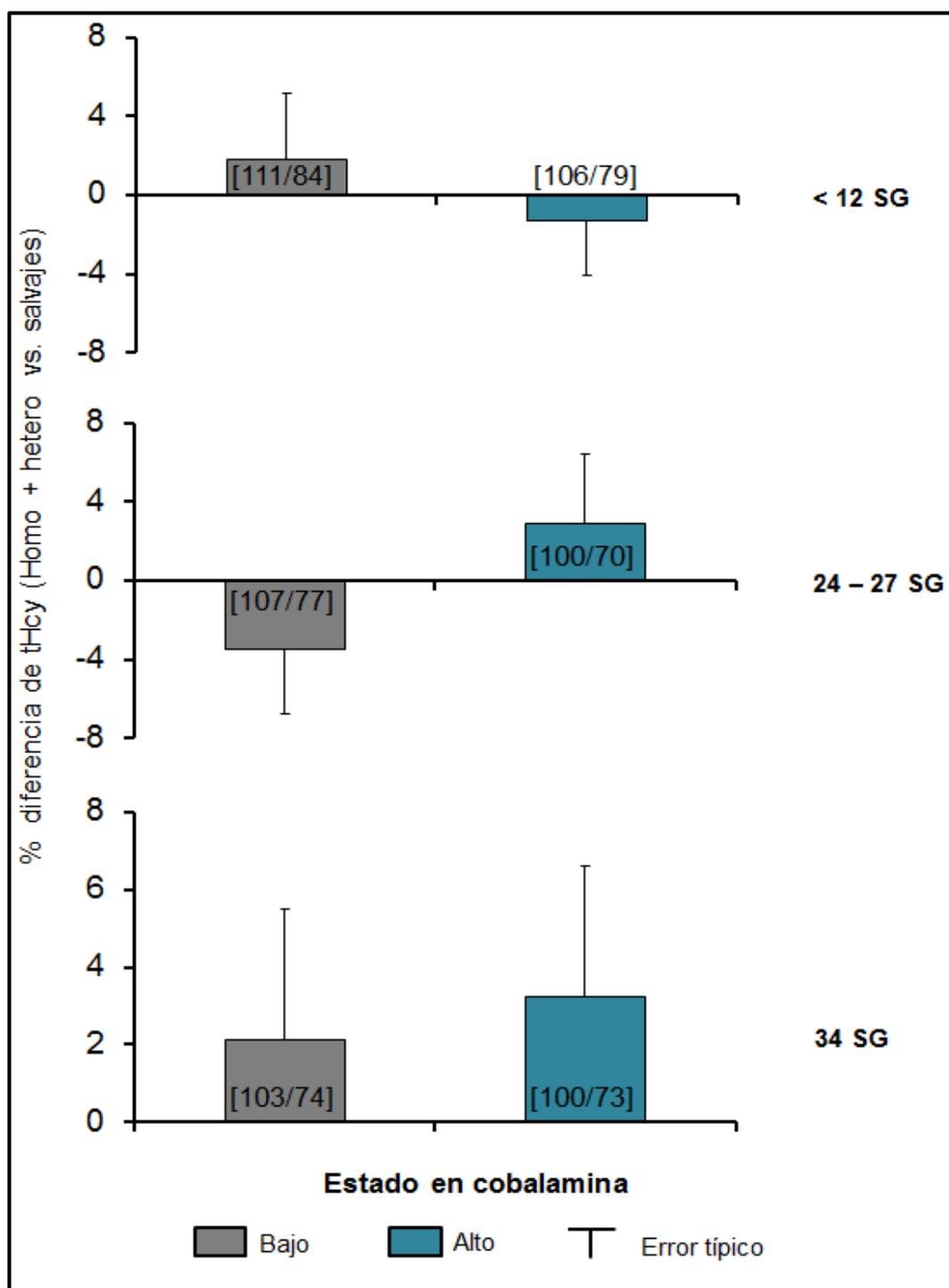
las portadoras del alelo mutante que se encuentran en el estado alto en cobalamina respecto a las salvajes para este mismo polimorfismo a medida que avanzaba el embarazo.



Gráfica 25. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T según estado en folato plasmático al inicio del embarazo y a las 24-27 SG sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con $\ln tHcy$ como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs heterocigóticas y salvajes. Estado en folato bajo=inferior a la mediana de folato plasmático, estado en folato alto = igual o superior a la mediana de folato plasmático; Mediana de folato plasmático 12 SG = 27,9 nmol/L, 24-27 y 34 SG = 11,3 nmol/L; [número de homocigóticas / número de heterocigóticas + salvajes].



Gráfica 26. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G según estado en cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * $p < 0,05$ vs salvajes. Estado en cobalamina bajo = inferior a la mediana de cobalamina plasmática, estado en cobalamina alto = igual o superior a la mediana de cobalamina plasmática; mediana de cobalamina = 372 pmol/L; [número de homocigóticas + heterocigóticas / número de salvajes].



Gráfica 27. Efecto de ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 524 C>T según estado en cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. Estado en cobalamina bajo = inferior a la mediana de cobalamina plasmática, estado en cobalamina alto = igual o superior a la mediana de cobalamina plasmática; mediana de cobalamina = 372 pmol/L ; [número de homocigóticas + heterocigóticas / número de salvajes].

6.1.5. Efecto del genotipo sobre la tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

En la gráfica 28 se puede ver el comportamiento de la tHcy cuando se compara en homocigóticas respecto a heterocigóticas o salvajes para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T en función del estado en folato plasmático y riboflavina eritrocitaria. Al inicio del embarazo las participantes homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en un estado medio o bajo en riboflavina presentaban una mayor tHcy independientemente del estado en folato. En la segunda mitad del embarazo sólo las mujeres con un estado bajo en riboflavina y bajo en folato presentaban una mayor tHcy. Al final del embarazo (34 SG) las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T que se encontraban en un estado alto en folato y en riboflavina presentaban una mayor tHcy que las heterocigóticas o salvajes para ese mismo polimorfismo.

También se observó que la relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy se veía influenciada por el estado en riboflavina en el segundo (p de interacción <0,001) y tercer trimestre (p de interacción = 0,001) del embarazo en las participantes que se encontraban en un estado en folato bajo.

En la gráfica 29 y la gráfica 30 se puede observar la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática al inicio de la gestación cuando se compara ser homocigótica o heterocigótica para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G o *MTRR* 524 C>T con ser salvaje para este mismo polimorfismo.

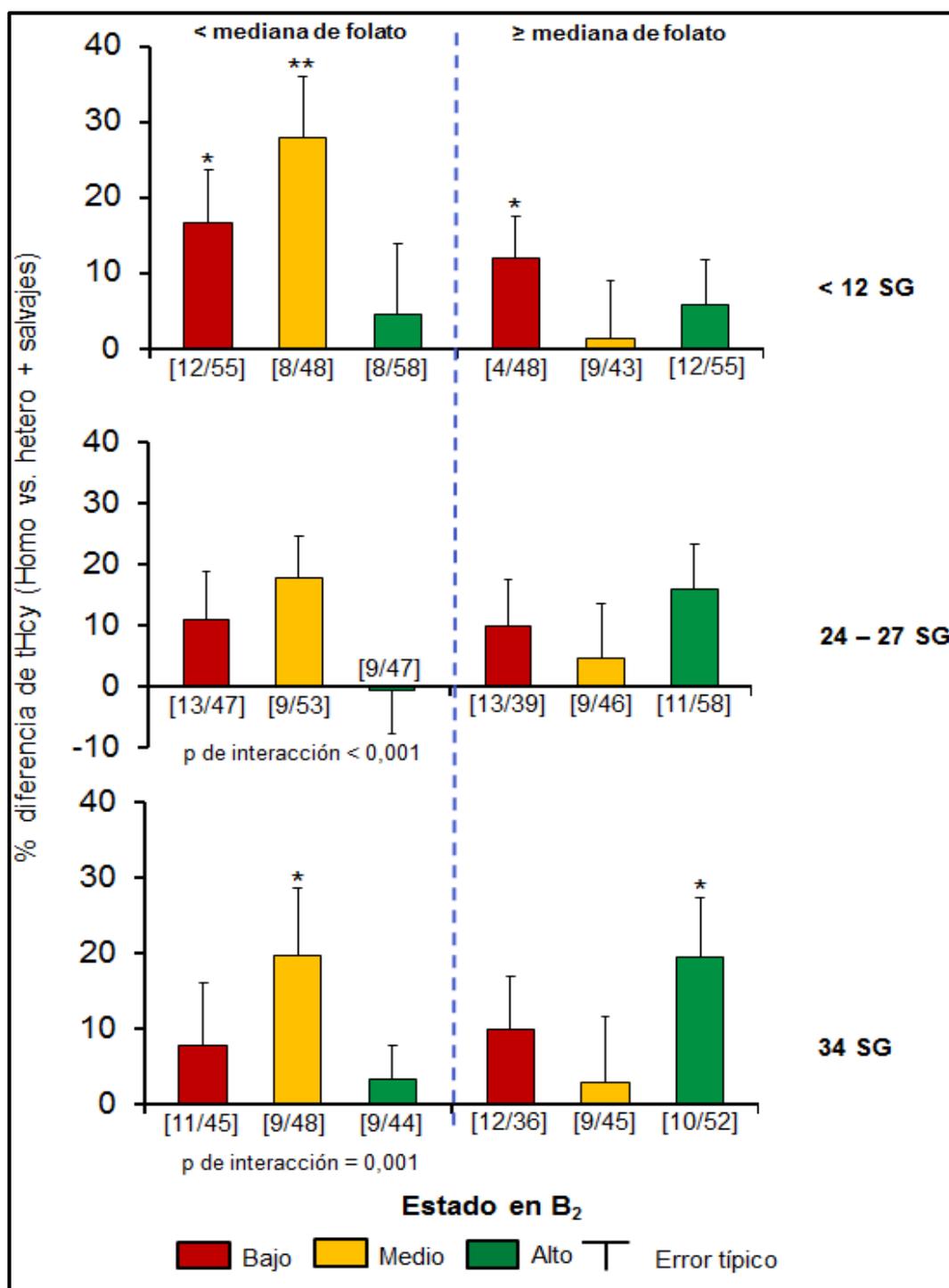
Independientemente del momento del embarazo las participantes portadoras del alelo mutante G que se encontraban en un estado alto en riboflavina presentaban una mayor tHcy que las participantes no portadoras. Esta diferencia de concentración llegaba a ser significativa al inicio del embarazo en las embarazadas que se encontraban en un estado bajo en cobalamina. En las participantes portadoras del alelo G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G que se encontraban en un estado alto en cobalamina y un estado bajo o medio en riboflavina se apreciaba

durante todo el embarazo una ligera tendencia a valores inferiores de tHcy en comparación con las no portadoras.

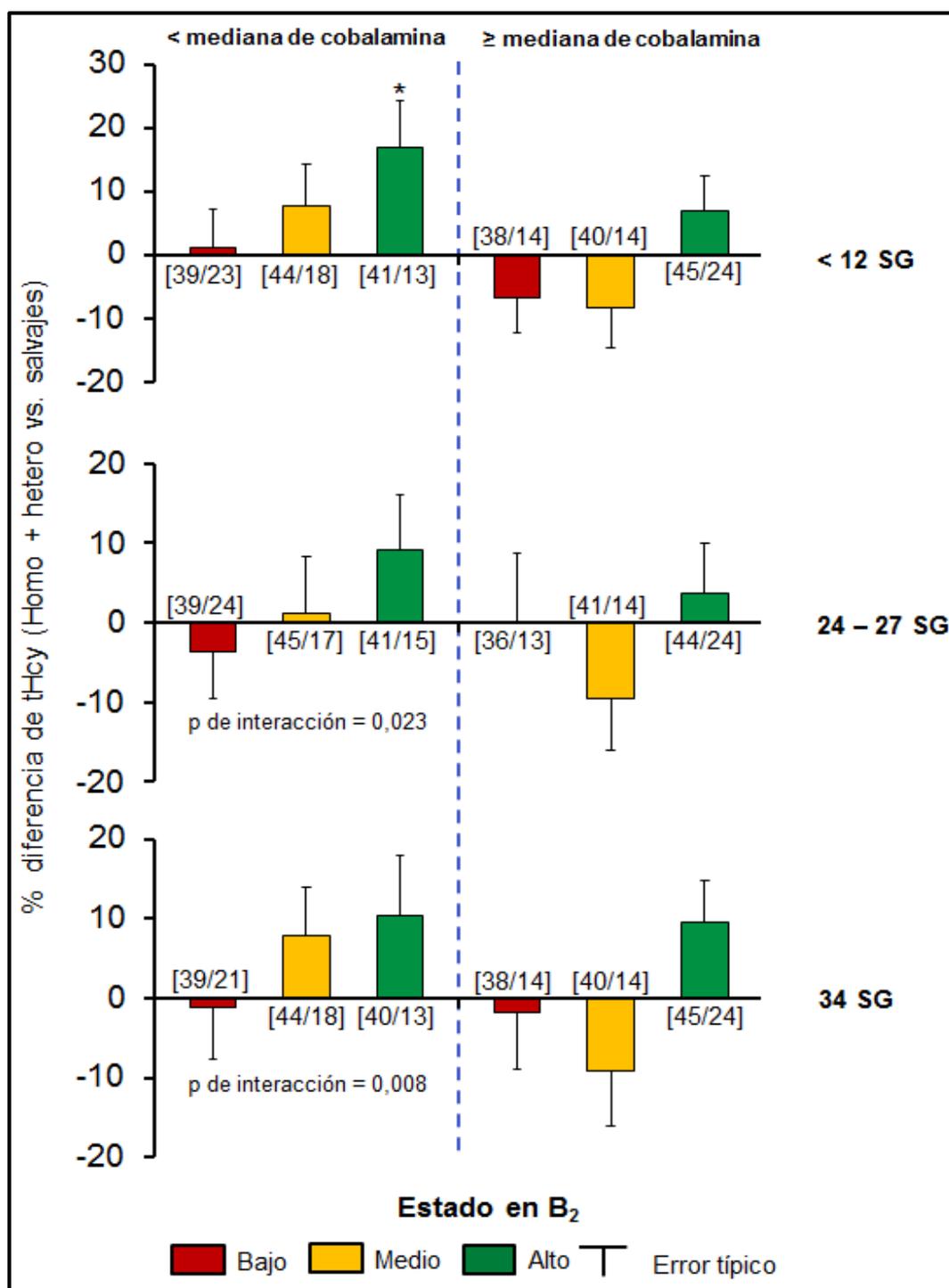
También se observó que la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y la tHcy se veía modificada por el estado en riboflavina en las participantes que estaban en un estado bajo en cobalamina en el segundo y tercer trimestre del embarazo (p de interacción = 0,023 y 0,008 respectivamente).

Al inicio del embarazo se observó en las portadoras del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T un comportamiento inverso de la tHcy en función del estado en cobalamina independientemente del estado en riboflavina. Las que se encontraban en un estado alto en cobalamina tenían valores de tHcy más bajos que los de las salvajes, en cambio, las embarazadas que se encontraban en un estado bajo en cobalamina presentaban una mayor tHcy. A medida que avanzaba el embarazo esta tendencia cambiaba y lo que se observaba era un comportamiento opuesto de la tHcy en función del estado en riboflavina en las participantes que se encontraban en un estado alto en cobalamina. Al final del embarazo en el estado bajo en cobalamina las homocigóticas o heterocigóticas para *MTRR* 524 C>T que tenían un estado en riboflavina alto presentaban valores de tHcy un 14,7% superiores que las salvajes para este mismo polimorfismo, por lo contrario las que estaban en un estado en riboflavina bajo presentaban un 11,3% menos de tHcy.

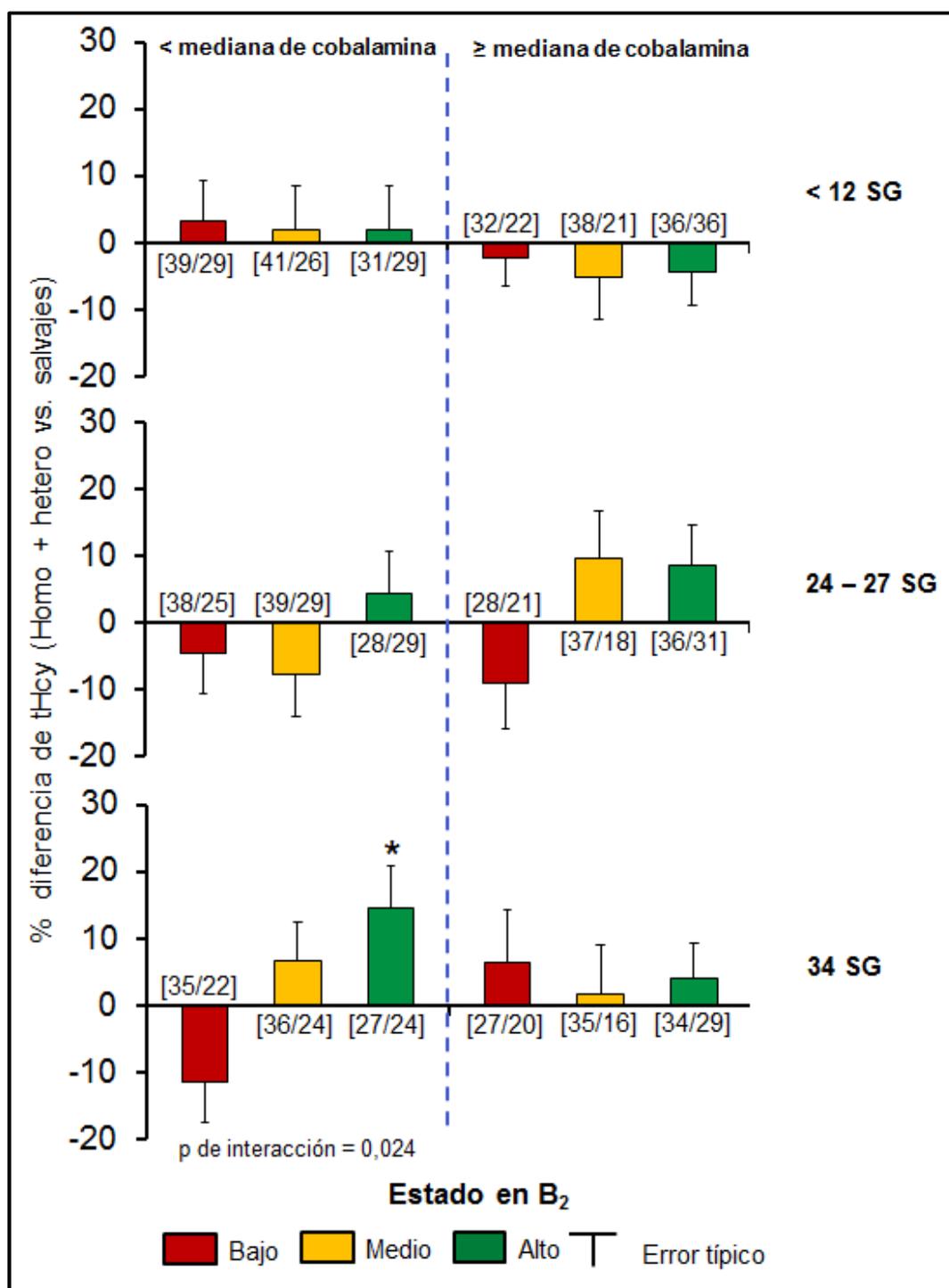
La relación entre el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y la tHcy se veía modificada por el estado en riboflavina en las participantes que estaban por debajo de la mediana de cobalamina al final del embarazo (p de interacción = 0,024).



Gráfica 28. Efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo y folato plasmático al inicio del embarazo y a las 24-27 SG sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * p < 0,05 ** p < 0,01 vs heterocigóticas y salvajes. Mediana de folato plasmático 12 SG = 27,9 nmol/L, 24-27 y 34 SG = 11,3 nmol/L; [número de homocigóticas / número de heterocigóticas + salvajes].



Gráfica 29. Efecto de ser homocigótica y heterocigótica para *MTRR* 66 A>G según estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, *MTHFR* 677 C>T, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * $p < 0,05$ vs salvajes. Mediana de cobalamina = 372 pmol/L; [número de homocigóticas + número heterocigóticas / n de salvajes].



Gráfica 30. Efecto de ser homocigótica y heterocigótica para *MTRR* 524 C>T según estado en riboflavina eritrocitaria y cobalamina plasmática al inicio del embarazo sobre tHcy. Regresión lineal múltiple con IntHcy como variable dependiente ajustada por cobalamina, folato y creatinina plasmática, EGRAC, *MTHFR* 677 C>T, consumo de tabaco, edad, partos anteriores, IMC, edad gestacional en el momento de la extracción y centro del estudio. * p<0,05 vs salvajes. Mediana de cobalamina = 372 pmol/L; [número de homocigóticas + heterocigóticas / número de salvajes].

6.2. DISCUSIÓN

La edad media de las participantes en el estudio NutCIR era de 31,8 años, un valor muy similar a los 31,1 años de la media de las gestantes catalanas⁽²¹³⁾. El 32,0 % de las participantes eran fumadoras al inicio del embarazo y un 18,4% continuaron fumando durante el mismo. De nuevo porcentajes similares a los de la población catalana de gestantes⁽¹⁹⁰⁾.

El estado inferior en folato eritrocitario y la mayor tHcy de las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T en comparación con las heterocigóticas y salvajes para este mismo polimorfismo es parecido al que se ha descrito para la población, a pesar del uso de suplementos de ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo. El porcentaje de suplementación con ácido fólico entre los diferentes genotipos era similar (CC = 94,5%; CT = 93,2%; TT = 97,6%).

Existen algunos estudios en los que se ha investigado el estado en vitaminas del grupo B en función del genotipo en embarazadas. Por ejemplo Kim y colaboradores en 2004 publicaron un estudio, con 177 embarazadas coreanas de entre 24 y 28 semanas de gestación, en el que se observaba que las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban más tHcy que las heterocigóticas y salvajes para este mismo polimorfismo⁽⁷⁶⁾. Dos años más tarde, en 2006, se publicó un estudio de Parle-McDermott y colaboradores en el que participaban 508 embarazadas de Irlanda a las que se les realizó una extracción sanguínea en el primer trimestre del embarazo. En este estudio se observó cómo las homocigóticas para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban un peor estado en folato eritrocitario y más tHcy que las heterocigóticas y salvajes para el mismo polimorfismo⁽¹⁸³⁾. Posteriormente en 2008, Barbosa y colaboradores publicaron un estudio con 275 embarazadas brasileñas a las que se les realizó una extracción sanguínea cuando ingresaban de parto en el hospital. Las portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T presentaban una menor concentración de folato sérico y una mayor tHcy que las salvajes para este polimorfismo⁽¹⁷⁷⁾. En ninguno de estos estudios se ha estudiado el efecto del

genotipo sobre el estado en folato o la tHcy durante toda la gestación, cómo se hace en el nuestro.

Las homocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G presentaban una tendencia a peor estado en folato eritrocitario y un mejor estado en cobalamina plasmática que las salvajes para este mismo polimorfismo durante todo el embarazo a pesar del uso de suplementos de ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo. El porcentaje de suplementación con ácido fólico entre los diferentes genotipos era similar (AA = 94,1%; AG = 96,6%; GG = 91,1%).

En un estudio llevado a cabo por Barbosa y colaboradores en el que estudiaban la asociación de los polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y *MTRR* 66 A>G, entre otros, con la tHcy en una población brasileña en el momento del parto encontraron una tHcy, aunque no significativa, en las portadoras del alelo mutante para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G respecto a las salvajes para este mismo polimorfismo⁽¹⁷⁷⁾. Estos resultados podrían hacer pensar que el efecto del estrés del propio embarazo afecta más al estado en folato y tHcy que el polimorfismo.

Se observó una tendencia a presentar un mejor estado en folato, tanto plasmático como eritrocitario y un mejor estado en cobalamina plasmática en las homocigóticas y heterocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T que las salvajes para este mismo polimorfismo a lo largo de todo el embarazo.

En la población se pudo observar que los homocigóticos presentaban una tendencia no significativa a una menor concentración de tHcy que los heterocigóticos y salvajes para este mismo polimorfismo. No se observa diferencias entre los diferentes genotipos durante el embarazo, esto implica que el propio embarazo podría influenciar más sobre el estado en las vitaminas que el polimorfismo.

El 65,0% de las embarazadas eran portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el 17,3% eran homocigóticas para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio

poblacional donde el 64,1% de la población era portadora del alelo mutante T y el 17,8% era homocigótica para este polimorfismo.

El 70,7% de la población de gestantes era portadora del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y el 25,7% era homocigótica para este polimorfismo. Estos resultados son similares a los encontrados en el estudio poblacional, donde el 74,1% de la población era portadora del alelo mutante G y el 24,1% homocigótica para este polimorfismo.

El 57,8% de la población de embarazadas eran portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y el 11,8% era homocigótica para este polimorfismo. Este resultado es similar al obtenido en el estudio poblacional donde la frecuencia del alelo mutante T es del 59,8% y el 13,5% de la población era homocigótica.

6.2.1. Evolución del estado en riboflavina durante el embarazo

El estado en riboflavina empeoraba a medida que avanzaba el embarazo y se constató un considerable aumento de mujeres que presentaban deficiencia de riboflavina en el tercer trimestre del embarazo en comparación con el primer trimestre.

En 1974 se publicó un estudio de Heller y colaboradores en el que miraban el estado en riboflavina eritrocitaria en 651 mujeres alemanas en diferentes etapas del embarazo. Para realizar este estudio se definieron como deficiente en riboflavina los valores de EGRAC > 1,2. En este estudio se observó que cuanto más avanzado era el estado del embarazo en el que se realizaba la extracción sanguínea mayor era el porcentaje de deficientes en riboflavina, pasando del 27,3% de deficientes en la extracción de las 7–12 SG al 41,7% en la extracción de las 37–42 SG⁽²¹⁴⁾. Años más tarde en 1981 se publicó un estudio de Bates y colaboradores en el que participaron 156 y 59 embarazadas de Gambia y Cambridge respectivamente. En este estudio se observó que el 20% de las mujeres de Cambridge eran deficientes en riboflavina cuando se utilizaba el criterio de EGRAC > 1,3. También se observó que sólo el 2,5% de las mujeres de Gambia no eran deficientes en riboflavina y que el estado en riboflavina empeoraba a medida que avanzaba el embarazo⁽²¹⁵⁾.

A diferencia de estos estudios mencionados anteriormente el estudio NutCIR es el primero que hace un seguimiento del estado nutricional en riboflavina mediante la

determinación del EGRAC a lo largo de todo el embarazo en una población de un país del “primer mundo” que no está sometido a una política de fortificación.

La disminución de la concentración de riboflavina durante el embarazo se puede explicar por el aumento de la demanda debido al desarrollo fetal, de la placenta y de los tejidos maternos.

Al estudiar la evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo en función del estado en folato plasmático al principio de éste se pudo observar que empeoraba en ambos grupos. Durante todo el embarazo las que se encontraban en un mejor estado en folato presentaban valores más bajos de EGRAC, o lo que es lo mismo, un mejor estado en riboflavina. Esta diferencia entre los valores de EGRAC era significativa solamente en el tercer trimestre del embarazo.

En un estudio Moat y colaboradores de 2003 encontraron que la concentración de riboflavina disminuía después de una intervención con ácido fólico⁽¹⁷⁹⁾. Estos resultados podrían explicarse en parte por el diseño del estudio que implicaba una reducción de la ingesta de riboflavina durante 8 de los 12 meses de estudio debido a la ausencia de periodos de lavado entre intervenciones dietéticas⁽²¹⁶⁾. En cambio, en un estudio reciente llevado a cabo en Noruega cuando comparaban la concentración de riboflavina plasmática en función de si se habían suplementado o no con ácido fólico hasta la semana 17 de embarazo observaron que las que habían tomado suplementos con regularidad presentaban una mayor concentración de riboflavina plasmática que las que lo habían hecho esporádicamente o las que no lo habían hecho nunca⁽¹⁸⁰⁾.

La composición de los preparados farmacológicos utilizados para la suplementación podría explicar en parte que un mejor estado en folato se asocie con un mejor estado en riboflavina si los suplementos de ácido fólico habitualmente consumidos formaran parte de preparados polivitamínicos con otras vitaminas entre ellas la riboflavina. En el caso de nuestra población ninguno de los suplementos de ácido fólico prescritos a las gestantes por protocolo en los hospitales que forman parte del estudio contenían también riboflavina. Así pues, esta explicación no es aplicable a nuestra población. Otra posible explicación sería que la mayor parte de los folatos de la dieta se absorben en forma de CH₃THF que es el producto final de la reacción

de MTHFR, que tiene FAD como cofactor. Esta mayor concentración de CH₃THF reduciría la actividad MTHFR, de esta forma cuando la concentración de folato es alta no sería necesario consumir tantas reservas de FAD en forma de cofactor. Así pues, una mayor concentración de folato podría favorecer un menor gasto de riboflavina con lo que ayudaría a mantener sus reservas. Esta diferencia del estado en riboflavina en función del estado en folato se vería más claramente al final del embarazo donde todas las reservas maternas están más estresadas, de ahí que la diferencia de concentración de riboflavina entre estados de folato fuese significativa sólo al final del embarazo.

6.2.2. Evolución de la tHcy durante el embarazo en función del estado en riboflavina

Se observó que la tHcy era mayor en las participantes que presentan un peor estado en riboflavina y esta diferencia se iba haciendo más evidente a medida que avanza la gestación.

En el segundo trimestre del embarazo los valores de tHcy eran inferiores a los del inicio y final del embarazo. Este comportamiento es el normal de la tHcy durante la gestación ya que la tHcy de las embarazadas es inferior a la de las mujeres no embarazadas y llega a su mínimo en el segundo trimestre del embarazo debido a factores fisiológicos del propio embarazo⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾.

Como ya se ha explicado previamente una menor concentración de riboflavina podría afectar a la actividad de MTHFR y MTRR disminuyéndola, con lo que si la metilación a metionina está reducida se vería aumentada la tHcy. Al final del embarazo es cuando las reservas de riboflavina están más bajas, así que un peor estado en riboflavina magnificaría aún más esta menor actividad de las enzimas, provocando una mayor diferencia de tHcy entre el tercil alto y el bajo de riboflavina a las 34 SG.

Al estudiar la evolución de tHcy según el estado en riboflavina a lo largo del embarazo en función del estado en folato al inicio se observó que las participantes que comenzaron el embarazo con un peor estado en folato presentaban durante todo el embarazo una tendencia a una mayor tHcy respecto a las que presentaban

un mejor estado en folato al inicio del embarazo. Independientemente del estado en folato con el que se comenzara el embarazo se pudo observar que un peor estado en riboflavina estaba asociado a una mayor tHcy siendo significativamente más alta en las mujeres con un estado bajo o medio en riboflavina combinado con un estado bajo en folato al inicio del embarazo.

Varios estudios han observado que las embarazadas con un peor estado en folato presentaban valores superiores de tHcy a los de las que tenían un mejor estado^(180, 217, 218). Anteriormente, ya hemos comentado que un peor estado en riboflavina se asocia con una mayor tHcy durante todo el embarazo. La combinación de un peor estado en folato y riboflavina se asocia con mayor tHcy durante todo el embarazo y este aumento es más claro al final cuando las reservas de ambas vitaminas están más bajas.

Un peor estado en folato comporta una menor concentración de CH₃THF que es el substrato de MS, la enzima que cataliza la remetilación de homocisteína a metionina. La menor actividad de esta enzima comporta una mayor tHcy. La riboflavina es cofactor de MTHFR, que se encarga de catalizar el paso de CH₂THF a CH₃THF. Un peor estado en riboflavina provocaría una disminución de la actividad enzimática de MTHFR y se vería reducida la producción de CH₃THF. Un peor estado en folato y riboflavina de forma conjunta significaría una disminución drástica en la concentración de CH₃THF lo que provocaría una disminución de la actividad de MS produciéndose así un aumento en la tHcy.

6.2.3. THcy según genotipo y estado en riboflavina

Un estado bajo en riboflavina eritrocitaria (tercil alto de EGRAC) al inicio del embarazo en homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T se asocia con una mayor tHcy durante todo el embarazo.

Anteriormente ya se había observado que un estado bajo en riboflavina se asocia con una mayor tHcy en homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T, en un estudio de 2004 llevado a cabo por Kim y colaboradores en Corea con un total de 177 embarazadas de entre 24 y 28 semanas de gestación⁽⁷⁶⁾. A diferencia del estudio de Kim y colaboradores en nuestro estudio se hace el seguimiento de las mujeres a lo largo

de todo el embarazo y se utiliza el EGRAC, un indicador del estado nutricional en riboflavina eritrocitaria, en lugar de la riboflavina sérica.

Este polimorfismo provoca una disminución de la afinidad de la proteína por FAD y un aumento de la termolabilidad de la enzima lo que conlleva una disminución de la actividad enzimática de ésta⁽¹²³⁾ y por consiguiente un aumento de tHcy⁽¹⁵⁰⁾. Una mayor concentración de riboflavina podría compensar la pérdida de afinidad del enzima por su cofactor FAD y reducir así el efecto de la mutación. Esto explicaría por qué las gestantes homocigóticas que empezaron el embarazo en un estado alto en riboflavina no presentaban una mayor tHcy que la del grupo de referencia.

Se observó que existía una interacción entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y el estado en riboflavina sobre tHcy en el primer y segundo trimestre del embarazo.

En el estudio anteriormente mencionado de Kim y colaboradores también describieron una interacción entre el estado en riboflavina y *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy, aunque solamente en el segundo trimestre del embarazo que es de la única información de la que disponían en el estudio⁽⁷⁶⁾.

Varios estudios han investigado el efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre tHcy con resultados dispares. Estas incongruencias entre los resultados obtenidos en los estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y la tHcy podrían explicarse por el diferente estado nutricional en riboflavina y en cobalamina.

Cuando se estudió el estado en vitaminas del grupo B en función del genotipo en el estudio NutCIR se pudo observar que la presencia del alelo mutante G, en especial cuando su presencia es por duplicado, provoca una mayor tHcy que es significativa únicamente al inicio del embarazo. El hecho que las gestantes homocigóticas y heterocigóticas para *MTRR* 66 A>G que se encontraban en un estado alto en riboflavina al inicio del embarazo presentaban durante todo el embarazo una mayor tHcy que las salvajes para el mismo polimorfismo nos muestran que la mayor tHcy en las portadoras del alelo mutante está limitada a las que presentan un estado en riboflavina eritrocitaria alto al inicio de la gestación.

Como se ha comentado anteriormente la *MTRR* transfiere los electrones derivados de la oxidación de NADPH a través de sus centros activos (FAD y FMN) a su pareja

redox la MS⁽⁶⁸⁾ que es la enzima que se encarga de catalizar el paso de homocisteína a metionina⁽³⁹⁾. En este mecanismo se forma un complejo entre la MS y MTRR y los electrones derivados de la oxidación de NADPH catalizada por MTRR se transfieren a la forma inactiva de MS^(53, 68). Esta transferencia de electrones en el complejo MS-MTRR facilita la transferencia de un grupo metilo de AdoMet a MS regenerando la metilcob(III)alamina⁽¹⁵⁶⁾. Otra función menos conocida y más novedosa de MTRR es actuar como chaperona de MS ya que ayuda a estabilizar la forma apoMS favoreciendo la formación de holoMS⁽¹⁵⁷⁾.

Una mayor concentración de riboflavina podría de alguna manera interferir entre estas interacciones MTRR y MS provocando así un mal funcionamiento de ambas enzimas que se reflejaría en una mayor tHcy.

A medida que avanza el embarazo el efecto del polimorfismo se va diluyendo probablemente debido a que toma más relevancia el efecto del estrés del propio embarazo.

Se observó que el estado en riboflavina solamente modificaba la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y tHcy al final del embarazo.

El efecto del estado en riboflavina sobre las portadoras del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T era prácticamente inapreciable durante todo el embarazo. A pesar de eso se observó que cuando se encontraban en un estado alto en riboflavina presentaban una mayor tHcy que la de las salvajes para este mismo polimorfismo.

El hecho que una mayor concentración de riboflavina se relacione con una mayor tHcy en las portadoras del alelo mutante T respecto a las salvajes para este mismo polimorfismo podría ser debido a la misma causa que en el polimorfismo *MTRR* 66 A>G, interferir entre la interacción MTRR y MS provocando así un mal funcionamiento de ambas enzimas que se reflejaría en una mayor tHcy.

Se observó que el estado en riboflavina modificaba la relación entre el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y la tHcy en el primer y segundo trimestre del embarazo.

6.2.4. tHcy según genotipo y estado en folato o cobalamina plasmáticos

Al principio del embarazo cuando las participantes presentaban un mejor estado en folato en conjunto el estar por debajo de la mediana de folato se asociaba con una mayor tHcy en las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T.

En el segundo y tercer trimestre del embarazo se observó que las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T presentaban una mayor tHcy independientemente del estado en folato plasmático.

Esta diferencia del comportamiento de tHcy entre el primer trimestre y la parte final del embarazo podría explicarse por la concentración de folato. Al inicio del embarazo debido a la suplementación con ácido fólico el estado en folato era bueno y el valor de la mediana de folato era de 27,9 nmol/L. En cambio en la segunda mitad del embarazo ya no tenía lugar la suplementación y el estado en folato decayó, siendo la mediana de 11,3 nmol/L, o lo que es lo mismo, menos de la mitad que al inicio. Una concentración de folato lo suficientemente elevada, como la que se encuentra al inicio del embarazo, podría disminuir el efecto de la mutación. Esto explicaría por qué al inicio del embarazo las gestantes homocigóticas que se encuentran por encima de la mediana presentan una menor diferencia de tHcy que las que están por debajo de ésta. Al avanzar el embarazo disminuye la concentración de folato y esta menor concentración podría no ser suficiente para compensar el efecto de la mutación en *MTHFR*. Por eso no se observarían diferencias en el comportamiento de tHcy en función del estado en folato en la parte final del embarazo.

Un peor estado en cobalamina al inicio del embarazo se asociaba con una mayor tHcy en las portadoras del alelo mutante para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G. En la segunda parte del embarazo esta diferencia no existe.

Como ya se ha explicado anteriormente la principal función de *MTRR* es la de catalizar la metilación reductiva de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina⁽³⁹⁾ y el polimorfismo *MTRR* 66 A>G disminuye la actividad de la enzima⁽¹⁷⁴⁾. Esta menor actividad de la enzima unida a una menor concentración de cobalamina podría

provocar un aumento del ratio cob(II)alamina/metilcob(III)alamina. Esto podría explicar el aumento de tHcy en las portadoras del alelo mutante G que se encuentran por debajo de la mediana de cobalamina al inicio del embarazo. Esta diferencia no se reproduciría en la segunda mitad del embarazo porque el propio estrés que comporta el embarazo podría ser más importante que el efecto de este polimorfismo.

Independientemente del estado en cobalamina o del punto del embarazo el efecto del estado en cobalamina sobre la tHcy en las portadoras del alelo mutante T del polimorfismo *MTRR* 524 C>T era prácticamente nulo. En la población se constató que un peor estado en cobalamina se asociaba con una mayor tHcy en los portadores del alelo mutante para este polimorfismo. El hecho que no se observe ningún efecto entre las gestantes se podría deber a que los efectos fisiológicos del embarazo y la demanda de cobalamina por el feto tengan un efecto más importante que el efecto de este polimorfismo.

6.2.5. Efecto del genotipo sobre tHcy según el estado en riboflavina eritrocitaria y del estado en folato o cobalamina plasmáticos

Durante todo el embarazo se observó que un peor estado en folato asociado a un peor estado en riboflavina significaba un aumento de tHcy en las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T respecto al grupo de referencia.

Anteriormente, ya se había observado en las homocigóticas para el polimorfismo *MTRR* 677 C>T que un peor estado en riboflavina se asociaba con una mayor tHcy al inicio del embarazo. Igualmente también se ha observado que un peor estado en folato al inicio del embarazo se asociaba con una mayor tHcy para las TT. Así pues, es lógico que un peor estado en folato combinado con un peor estado en riboflavina se asocie a una mayor tHcy en las homocigóticas para *MTHFR* 677 C>T.

Como ya hemos mencionado anteriormente un mejor estado en folato podría compensar el efecto de ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy por dos mecanismos: mantener las reservas de FAD y estabilizar la unión del enzima con FAD. Así se explicaría porque no hay un aumento de tHcy en las homocigóticas cuando el estado en folato es bueno. En cambio cuando el estado en folato es bajo,

este papel compensador del folato no sería suficiente y por eso las TT presentan mayor tHcy a excepción de cuando el estado en riboflavina es alto, donde la mayor concentración de FAD compensaría el efecto del polimorfismo.

Al final del embarazo un mejor estado en folato junto con un mejor estado en riboflavina se asocia con una mayor tHcy en las homocigóticas en comparación con las heterocigóticas y salvajes para este mismo polimorfismo. Estos resultados son sorprendentes ya que en mejor estado de folato y de riboflavina era de esperar una disminución del efecto del polimorfismo. Como ya se ha comentado anteriormente durante el embarazo la tHcy se ve reducida observándose su mínimo en el segundo trimestre del embarazo aumentando a partir de este momento⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾. También es sabido que ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T se asocia con una mayor concentración de tHcy. Estos dos factores podrían explicar en parte el porqué de estos resultados sorprendentes.

La relación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T y la tHcy se veía modificada en función del estado en riboflavina en las participantes con estado bajo en folato en la parte final del embarazo. Al final del embarazo es donde el estado en folato de media es inferior ya que se ha suprimido la prescripción generalizada de suplementación y se ha sufrido durante más tiempo el requerimiento extra del embarazo. Kim y colaboradores también describieron una interacción entre el estado en riboflavina y *MTHFR* 677 C>T sobre tHcy aunque solamente en el segundo trimestre del embarazo que es de la única información de la que disponían en el estudio y teniendo en cuenta la riboflavina sérica no la eritrocitaria⁽⁷⁶⁾.

Previamente se ha podido observar que ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G se asocia con un mayor tHcy cuando se presenta un estado alto en riboflavina o un estado bajo en cobalamina al inicio del embarazo. No es de extrañar que las participantes portadoras del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G que se encontraban en un estado alto en riboflavina eritrocitaria al inicio del embarazo presentaran una mayor tHcy que las participantes no portadoras

y que esta diferencia entre las tHcy fueran mayores cuando el estado en cobalamina era peor.

Como ya se ha visto previamente la MTRR cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽³⁹⁾. Si la concentración de cobalamina el ratio de cob(II)alamina/metilcob(III)alamina podría ser superior. Esto implicaría una menor disponibilidad de metilcob(III)alamina para el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en un aumento de tHcy.

Otra posible explicación podría basarse en la función chaperona de MTRR. Una desproporción en el ratio cobalamina/riboflavina por exceso de esta última podría interferir de alguna manera en la interacción MTRR-MS impidiendo así el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en forma de aumento de tHcy.

Estos dos hechos juntos podrían explicar porque el aumento de tHcy de las portadoras del alelo mutante G que se encontraban en un estado alto de riboflavina era mayor cuando se encontraban por debajo de la mediana de cobalamina. El hecho que esta diferencia sea menor a medida que avanzaba la gestación podría ser debido al efecto del embarazo. Las demandas en las reservas de los nutrientes para mantener el embarazo y asegurar un aporte suficiente al feto para su desarrollo y crecimiento podrían ser más importante que el efecto del polimorfismo y por eso sólo se observaría esta diferencia claramente al inicio del embarazo donde el estrés de éste es menor.

Se observó que el estado en riboflavina modificaba la relación entre el polimorfismo *MTRR* 66 A>G y la tHcy en la segunda mitad del embarazo. Esta modificación se veía limitada a las participantes con un estado en cobalamina bajo. Esto implica que el estado en riboflavina sólo afecta a la relación entre el polimorfismo y la tHcy cuando el estado en cobalamina es bajo o lo que es lo mismo que la interacción entre el estado en riboflavina y el polimorfismo sobre la tHcy se ve modificada por el estado en cobalamina.

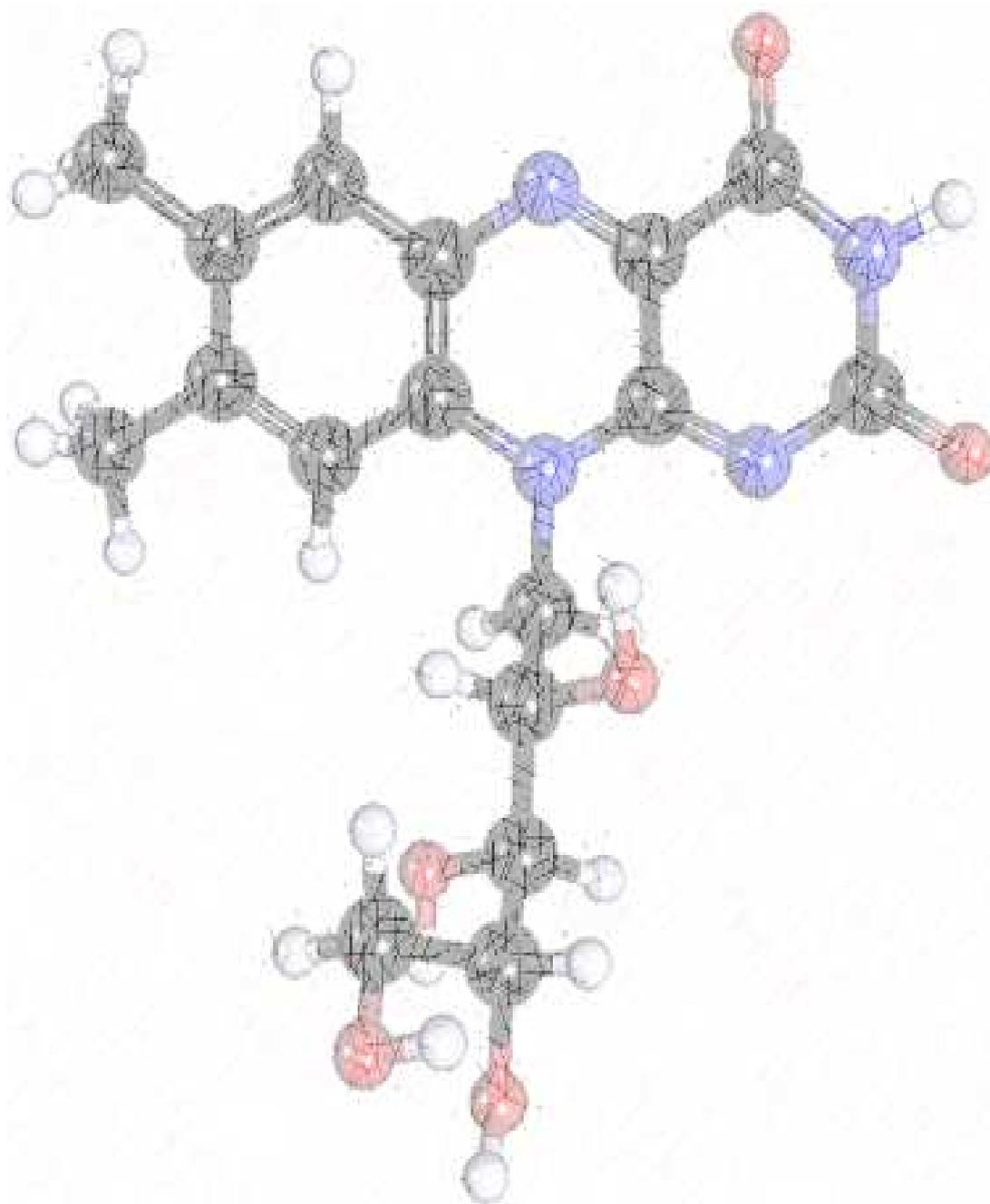
Al inicio del embarazo el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T era prácticamente nulo independientemente del estado en cobalamina o riboflavina. Al final del embarazo cuando el estado en cobalamina era bajo se observaba un

comportamiento opuesto de la tHcy en función del estado en riboflavina; las homocigóticas y heterocigóticas que se encontraban en un estado en riboflavina alto presentaban valores superiores de tHcy que las salvajes para este mismo polimorfismo, por lo contrario las que estaban se encontraban en un estado bajo en riboflavina presentaban valores inferiores de tHcy.

Estos resultados sugieren que el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T es altamente dependiente del estado en riboflavina cuando el estado en cobalamina es bajo. Este comportamiento se podría explicar por la función chaperona de *MTRR*. La mutación podría proporcionar una mayor afinidad por la riboflavina con lo que cuando el estado en ésta es bajo ayudaría a mantener una ratio cob(II)alamina/metilcob(III)alamina adecuado, reflejándose esto en una menor tHcy. En cambio, esta mayor afinidad por la riboflavina podría interferir de alguna manera en la interacción *MTRR*-MS impidiendo así el correcto funcionamiento de MS que comportaría un aumento de tHcy. Este efecto sólo se haría patente al final del embarazo cuando el estrés que comporta el embarazo es máximo y las reservas de la madre están en un nivel más bajo.

Se observó que el estado en riboflavina modificaba la relación entre el polimorfismo *MTRR* 524 C>T y la tHcy al final del embarazo. Esta modificación se veía limitada a las participantes con un estado en cobalamina bajo. Esto implica que la interacción entre el estado en riboflavina y el polimorfismo sobre la tHcy se ve modificada por el estado en cobalamina al final del embarazo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



DISCUSIÓN GLOBAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

Para interpretar las comparaciones entre los tres grupos de estudio (el grupo poblacional, el grupo de mujeres en edad fértil no embarazadas y el grupo de mujeres embarazadas) hay que tener en cuenta algunas diferencias relevantes:

- Los participantes del estudio poblacional y las participantes del grupo de mujeres en edad fértil no embarazadas eran unos grupos que no utilizaban suplementos vitamínicos del grupo B, en cambio, las participantes del estudio NutCIR no tenían esta restricción, es más, se les prescribía durante los tres primeros meses del embarazo suplementación con ácido fólico siguiendo las recomendaciones de la SEGO.
- El estado en riboflavina es mucho más alto en la población de gestantes que en el estudio poblacional o que en las participantes en edad fértil no embarazadas.
- El estado tanto en folato plasmático como en folato eritrocitario es mucho mejor en las embarazadas que en los otros dos grupos, a excepción del último trimestre del embarazo donde las concentraciones son comparables. Esto es lógico ya que hay que tener en cuenta que este grupo ha consumido suplementos de ácido fólico al inicio del embarazo, pero después al dejar de consumirlo el mayor gasto de las reservas de éste debido al crecimiento del feto hace que los valores vuelvan a los de la población no embarazada.
- La tHcy es más elevada en el grupo de la población y en el de las mujeres en edad fértil no embarazadas pero esto era de esperar ya que los valores de tHcy disminuyen al principio del embarazo llegando a alcanzar su mínimo durante el segundo trimestre⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾.
- En el estudio del grupo poblacional para el análisis estadístico cuando se analiza la tHcy en función del genotipo y del estado en folato o cobalamina se utilizan tres grupos de estado en folato plasmático o cobalamina plasmática, en cambio en el estudio del grupo de mujeres en edad fértil no embarazadas y en el estudio NutCIR se utilizaron dos grupos de estado en folato

plasmático o cobalamina debido a que el tamaño del grupo no es suficiente para que los análisis tengan la potencia estadística necesaria si se realizan tres grupos.

7.1. MTHFR 677 C>T

En los tres grupos el ser homocigótico para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T se asocia con una mayor tHcy que en los heterocigóticos o salvajes para este mismo polimorfismo. Por lo que respecta al folato eritrocitario, la situación era la inversa, los TT presentaban concentraciones inferiores a las de los CT o CC.

Estos resultados son especialmente relevantes en el caso del estudio NutCIR al inicio del embarazo. A las participantes de este estudio se les prescribía durante los tres primeros meses del embarazo suplementación con ácido fólico siguiendo las recomendaciones de la SEGO. Esta suplementación con ácido fólico debería prevenir el efecto del polimorfismo sobre la tHcy, pero se observa que esta suplementación no es efectiva en las homocigóticas para compensar el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T.

Solamente en el estudio poblacional el ser homocigótico para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T se asocia con una menor concentración de folato plasmático que el grupo de referencia.

Una vez ajustado por otros factores que afectan a la tHcy, se observó en los tres grupos que los participantes homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T presentaban una tHcy más elevadas que los heterocigóticos o salvajes para el mismo polimorfismo cuando se encontraban en el estado medio o bajo de riboflavina. En cambio, en los participantes que presentaban en el estado alto en riboflavina el efecto de ser homocigótico sobre la tHcy era prácticamente nulo.

Esto es debido a que la mutación provoca una disminución de la afinidad de la proteína por FAD y un aumento de la termolabilidad de la enzima lo que conlleva una disminución de su actividad enzimática⁽¹²³⁾. Un peor estado en riboflavina podría agravar el efecto del polimorfismo y por el contrario un estado alto en riboflavina compensaría en parte el efecto del polimorfismo.

La idea de que ser homocigótico para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T ya no provoca una mayor tHcy cuando el estado en folato es bueno está bastante generalizada ya que el folato ayuda a estabilizar la unión entre MTHFR y su cofactor FAD⁽⁴²⁾. Pero nuestros resultados muestran que un estado bajo en riboflavina eritrocitaria se asocia con una mayor tHcy, a pesar de no ser una población deficiente en folato.

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático se observó que los homocigóticos que se encontraban en un estado bajo en folato presentaban una mayor tHcy que el grupo de referencia a excepción de las participantes del grupo de mujeres en edad fértil no embarazadas en el que un mejor estado en folato se asocia con una mayor tHcy en las homocigóticas.

Hasta ahora el problema del aumento de tHcy en los homocigóticos para el polimorfismo *MTHFR* 677 C>T se ha solucionado con suplementación con ácido fólico pero McNulty y colaboradores publicaron un estudio en el que se observaba que la suplementación con riboflavina provocaba una reducción del 22% de la tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T⁽²⁶⁾. Este estudio proponía una mejor estrategia para lidiar con el problema de la mayor tHcy en los homocigóticos para *MTHFR* 677 C>T demostrando que mejorando el estado nutricional en riboflavina se podía solucionar el problema atacando directamente a su punto de origen y no siendo necesario hacer un *bypass* sobre el problema mediante la suplementación con ácido fólico, que a la luz de estos resultados podría provocar los resultados opuestos a los deseados.

Al estudiar el efecto del polimorfismo *MTHFR* 677 C>T sobre la tHcy en función del estado en folato plasmático y la riboflavina eritrocitaria se observó que tanto en el grupo del estudio poblacional como en el grupo del estudio NutCIR un estado medio o bajo en riboflavina junto con un estado bajo en folato se asocia con una mayor tHcy en los homocigóticos respecto al grupo de referencia. En el grupo de las mujeres en edad fértil no embarazada un estado alto en folato junto con un estado medio o bajo en riboflavina se asocia con una mayor tHcy.

Anteriormente ya se ha observado que un mejor estado en folato se asocia con una mayor tHcy en las homocigóticas y que una descompensación entre la concentración de folato y la de cobalamina, por deficiencia de ésta, puede manifestarse como una deficiencia funcional en folato a pesar de presentar un buen estado en éste que se ve reflejada con un aumento en tHcy, esto es lo que se conoce como la trampa de metilos⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. La MTRR es una flavoproteína que cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina, que es la forma activa necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽⁵³⁾. Una deficiencia en riboflavina podría provocar un mal funcionamiento de MTRR con lo que a pesar de presentar una buena concentración en cobalamina, ésta una vez desactivada no podría volver a ser activada. Este mal funcionamiento provocaría un aumento de la tHcy similar al que se produce en la trampa de metilos.

7.2. MTRR 66 A>G

En los tres grupos se observa una tendencia a presentar una mayor tHcy en los portadores del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G, pero esta tendencia es solamente significativa en el primer trimestre del embarazo y cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 66 A>G sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria se observó, en los tres grupos, que los participantes portadores del alelo mutante G presentaban una mayor tHcy respecto a los salvajes cuando se encontraban en un estado alto en riboflavina aunque esta mayor tHcy era significativa únicamente en el primer trimestre del embarazo. En cambio, cuando el estado en riboflavina es bajo el efecto es prácticamente nulo a excepción del grupo de mujeres en edad fértil no embarazadas donde las portadoras presentan una tHcy menor que el grupo de referencia.

El hecho que la mayor tHcy sólo sea significativa en el primer trimestre del embarazo podría explicarse por el hecho que en ese punto es donde las concentraciones de riboflavina y de otras vitaminas del grupo B son más altas. Y el hecho de que al final del embarazo es donde las concentraciones de vitaminas del tipo B son las más bajas serviría para explicar porque es el único punto donde se observa una menor tHcy cuando el estado en riboflavina es bajo.

Se observó en los tres grupos que el efecto de la concentración en cobalamina plasmática sobre la tHcy de los participantes homocigóticos y heterocigóticos para *MTRR* 66 A>G respecto a la de los salvajes para este mismo polimorfismo era prácticamente nulo, a excepción del primer trimestre del embarazo donde un estado bajo en cobalamina se asocia con una mayor tHcy de las portadoras del alelo mutante G respecto a las salvajes.

Se observó en los tres grupos, cuando el estado en cobalamina era bajo, que la tHcy de los participantes homocigóticos y heterocigóticos para *MTRR* 66 A>G era menor que la de los salvajes para este mismo polimorfismo cuando el estado en riboflavina era bajo, en cambio cuando el estado en riboflavina era alto la tHcy era mayor en los portadores del alelo mutante G respecto a los salvajes.

Como ya se ha visto previamente la *MTRR* cataliza el paso de cob(II)alamina a metilcob(III)alamina necesaria para el correcto funcionamiento de MS⁽³⁹⁾. Si la concentración de cobalamina es baja el ratio de cob(II)alamina/metilcob(III)alamina podría ser superior. Esto implicaría una menor disponibilidad de metilcob(III)alamina para el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en un aumento de tHcy. Otra posible explicación podría basarse en la función chaperona de *MTRR*. Una desproporción en el ratio cobalamina/riboflavina por exceso de esta última podría interferir de alguna manera en la interacción *MTRR*-MS impidiendo así el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en forma de aumento de tHcy.

Estos dos hechos juntos podrían explicar porque el aumento de tHcy de los portadores del alelo mutante G que se encontraban en un estado alto de riboflavina era mayor cuando se encontraban en un estado bajo de cobalamina.

7.3. MTRR 524 C>T

En los grupos del estudio poblacional y de las mujeres en edad fértil no embarazadas el ser portador del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se asocia de una forma no significativa con una menor tHcy que las salvajes para este mismo polimorfismo. En cambio, en el grupo del estudio NutCIR no se encuentra ninguna tendencia a excepción del final del embarazo donde se

observa una mayor tHcy en las portadoras del alelo mutante T. Esta diferencia en el comportamiento podría ser debido al efecto ya conocido del embarazo sobre la tHcy en el que un aumento de la tHcy durante el tercer trimestre del embarazo es normal^(115,219) y el efecto de este fenómeno fisiológico sobre la tHcy podría ser más fuerte que el del polimorfismo.

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy en función del estado en riboflavina eritrocitaria, en los grupos del estudio poblacional y de las mujeres en edad fértil no embarazadas los participantes portadores del alelo mutante T presentaban una menor tHcy respecto a los salvajes cuando se encontraban en un estado alto en riboflavina, en cambio en las participantes del estudio NutCIR un estado alto en riboflavina se asocia con una mayor tHcy.

Esta diferencia en el comportamiento podría ser debido a la concentración en riboflavina. En el estudio NutCIR la concentración de riboflavina en el estado alto es mucho mayor que en el estudio poblacional o en la población de edad fértil no embarazada (EGRAC < 1,09; EGRAC < 1,23 y EGRAC < 1,29 respectivamente).

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática se observó que las portadoras del alelo mutante T que se encontraban en un estado bajo en cobalamina presentaban una mayor tHcy que el grupo de referencia. En cambio, un estado alto en cobalamina se asocia con una menor tHcy, a excepción de las participantes del estudio NutCIR donde un estado alto en cobalamina se asociaba a una mayor tHcy a medida que avanza el embarazo.

Esta diferencia en el comportamiento podría ser debido a que el efecto del estrés fisiológico que comporta el embarazo es más fuerte que el del polimorfismo.

Cuando se estudió el efecto del polimorfismo *MTRR* 524 C>T sobre la tHcy en función del estado en cobalamina plasmática y de la riboflavina eritrocitaria se observó que tanto en el grupo del estudio poblacional como en el grupo de las mujeres en edad fértil no embarazadas un estado bajo en riboflavina junto con un

estado bajo en cobalamina se asocia con una mayor tHcy en los portadores del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T respecto al grupo de referencia. En cambio, cuando el estado en cobalamina era alto un estado en riboflavina alto se asocia con una menor tHcy que los salvajes para este mismo polimorfismo. En las participantes del estudio NutCIR los resultados eran los opuestos en especial al final del embarazo.

La concentración de cobalamina era comparable entre los tres grupos pero en el estudio NutCIR a medida que avanza la gestación la concentración de cobalamina disminuye considerablemente. Esta menor concentración de cobalamina junto a este mejor estado en riboflavina (a pesar de que la concentración en riboflavina también disminuye durante el embarazo no llega a los valores de los otros dos grupos) podría provocar una descompensación entre la relación riboflavina-cobalamina que daría como resultado una interferencia de alguna manera en la interacción *MTRR*-MS impidiendo así el correcto funcionamiento de MS que se vería reflejado en forma de aumento de tHcy.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

8.- CONCLUSIONES

Solamente se detallaran en este apartado las conclusiones que responden a asociaciones estadísticamente significativas.

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

Objetivos

Investigar en una muestra representativa de una población adulta no expuesta a suplementos vitamínicos del tipo B ni a la fortificación obligatoria con ácido fólico.

1. La frecuencia de los polimorfismos *MTHFR 677 C>T*, *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T* y el estado nutricional en riboflavina de los diferentes genotipos.

El 17,8% de la población era homocigótica para el polimorfismo *MTHFR 677 C>T*, el 24,1% para el *MTRR 66 A>G* y el 13,5% para el *MTRR 524 C>T*.

El 34% de la población era deficiente en riboflavina ($EGRAC \geq 1,4$) siendo los mayores de 65 años los que presentaban un mejor estado y las mujeres menores de 35 años un peor estado.

2. La relación entre *MTHFR 677 C>T*, *MTRR 66 A>G* y *MTRR 524 C>T* y tHcy en función del estado en riboflavina.

Ser homocigótico para *MTHFR 677 C>T* se asocia con una tHcy más elevada en un estado en riboflavina bajo y ser portador del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR 66 A>G* con una tHcy más elevada cuando el estado en riboflavina es alto respecto a los correspondientes genotipos de referencia.

3. Cómo el estado en los substratos de las enzimas afecta la relación riboflavina-polimorfismos-homocisteína según *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

En un estado en folato bajo ser homocigótico para *MTHFR* 677 C>T se asocia con mayor tHcy respecto al genotipo de referencia a excepción de cuando el estado en riboflavina es alto.

En un estado en riboflavina alto ser portador del alelo mutante G para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G se asocia con tHcy mayor cuando el estado en cobalamina es bajo, en cambio, cuando el estado en cobalamina es alto ser portador del alelo mutante C para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se asocia con menor tHcy respecto a los correspondientes genotipos de referencia.

4. Repetir los análisis del objetivo 1 a 3 en las mujeres de edad fértil no embarazadas.

El 48,3% de las mujeres en edad fértil no embarazadas era deficiente en riboflavina (EGRAC \geq 1,4).

Cuando se está en un estado en folato bajo ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T se asocia con una mayor tHcy respecto al genotipo de referencia, a excepción de cuando el estado en riboflavina es alto.

Cuando el estado en cobalamina es bajo ser homocigótica o heterocigótica para el polimorfismo *MTRR* 66 A>G se asocia con mayor tHcy si el estado en riboflavina es alto, en cambio, si el estado en riboflavina es bajo ser portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se asocia con una menor tHcy respecto a los correspondientes genotipos de referencia.

Investigar en un estudio longitudinal de una población de gestantes:

1. La evolución del estado en riboflavina a lo largo del embarazo y su relación con los polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T.

El estado en riboflavina empeora a medida que avanza el embarazo.

2. La evolución de la tHcy a lo largo del embarazo en función del estado en riboflavina, folato y cobalamina.

Comenzar el embarazo en un estado en folato bajo se asocia con mayor tHcy durante toda la gestación. Independientemente del estado en folato, un estado en riboflavina bajo se asocia con una mayor tHcy.

3. La relación entre *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T y tHcy en función del estado en riboflavina a lo largo del embarazo.

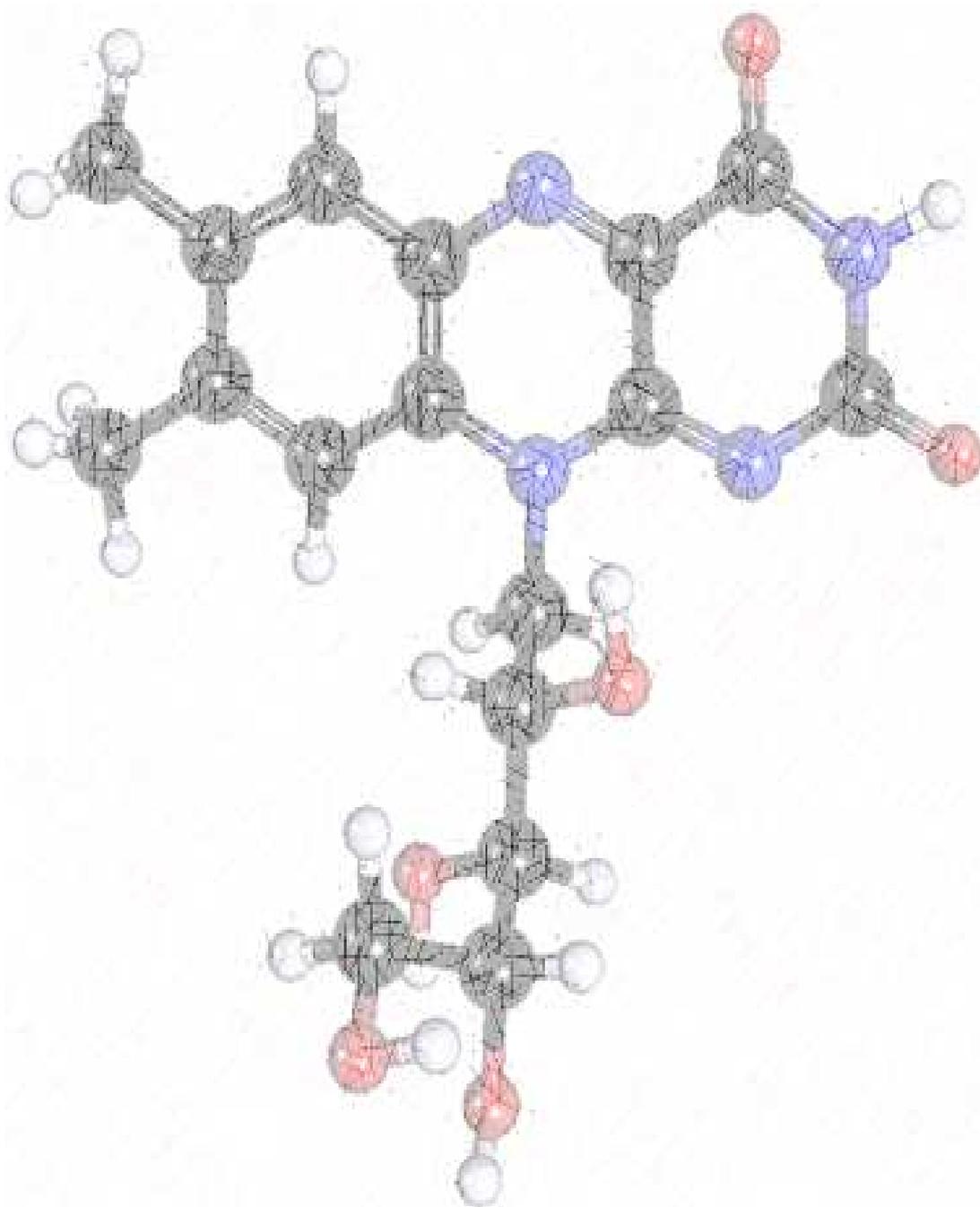
En un estado en riboflavina bajo al inicio del embarazo ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T se asocia con una mayor tHcy y en un estado en riboflavina alto ser homocigótica o heterocigótica para *MTRR* 66 A>G se asocia con una mayor tHcy durante todo el embarazo respecto a los correspondientes genotipos de referencia.

4. Cómo el estado en los sustratos de las enzimas afecta la relación riboflavina-polimorfismos-homocisteína según *MTHFR* 677 C>T, *MTRR* 66 A>G y *MTRR* 524 C>T a lo largo del embarazo.

En un estado en folato bajo al inicio del embarazo ser homocigótica para *MTHFR* 677 C>T se asocia con un mayor tHcy respecto al genotipo de referencia a excepción de cuando el estado en riboflavina es alto.

En un estado en cobalamina bajo y alto en riboflavina al inicio del embarazo ser portadora del alelo mutante T para el polimorfismo *MTRR* 524 C>T se asocia con una mayor tHcy al final de la gestación respecto al genotipo de referencia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warburg O. The Chemical Constitution of Respiration Ferment. *Science* 1928;68:437-43.
2. Lippincott W&W. Riboflavin. In: Maurice E. Shils, James A. Olson, Moshe Shike and A. Catherine Ross, eds. *Modern nutrition in health and disease*. New York: 1999:266-271.
3. Merrill AH,Jr, Lambeth JD, Edmondson DE, McCormick DB. Formation and mode of action of flavoproteins. *Annu Rev Nutr* 1981;1:281-317.
4. Deluca C, Kaplan NO. Flavin adenine dinucleotide synthesis in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* 1958;30:6-11.
5. Lancaster CR. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:1-6.
6. Kim H. Activity of human dihydrolipoamide dehydrogenase is largely reduced by mutation at isoleucine-51 to alanine. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:223-7.
7. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499-503.
8. Hille R. Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:107-16.
9. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-97.
10. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F. Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem* 2004;11:1983-93.
11. di Salvo ML, Safo MK, Contestabile R. Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:897-913.
12. U.S. Department of Agriculture. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2012. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
13. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1352-60.
14. Standing comitee on the scientific evaluation of dietray reference intakes. *Recomended Dietary Allowances*. 9th ed. Washington DC: National Reserach Council. Nacional Academy of Sciences, 1980.
15. McCormick DB GH. In: Anonymous *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 1994:1275-1316.
16. Berg TM, Behagel HA. Semiautomated method for microbiological vitamin assays. *Appl Microbiol* 1972;23:531-42.
17. Kodicek E, Wang YL. The fluorimetric estimation of riboflavin in foodstuffs and other biological material. *Biochem J* 1949;44:340-3.
18. Floridi A, Palmerini CA, Fini C, Pupita M, Fidanza F. High performance liquid chromatographic analysis of flavin adenine dinucleotide in whole blood. *Int J Vitam Nutr Res* 1985;55:187-91.

19. Lopez-Anaya A, Mayersohn M. Quantification of riboflavin, riboflavin 5'-phosphate and flavin adenine dinucleotide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987;423:105-13.
20. Petteys BJ, Frank EL. Rapid determination of vitamin B(2) (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clin Chim Acta* 2011;412:38-43.
21. Hustad S, Ueland PM, Schneede J. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Clin Chem* 1999;45:862-8.
22. Kemp G. Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques. *Biotechnol Appl Biochem* 1998;27 (Pt 1):9-17.
23. Mount JN, Heduan E, Herd C, Jupp R, Kearney E, Marsh A. Adaptation of coenzyme stimulation assays for the nutritional assessment of vitamins B1, B2 and B6 using the Cobas Bio centrifugal analyser. *Ann Clin Biochem* 1987;24 (Pt 1):41-6.
24. Bates CJ, Prentice AM, Watkinson M, et al. Riboflavin requirements of lactating Gambian women: a controlled supplementation trial. *Am J Clin Nutr* 1982;35:701-9.
25. Powers HJ, Bates CJ, Eccles M, Brown H, George E. Bicycling performance in Gambian children: effects of supplements of riboflavin or ascorbic acid. *Hum Nutr Clin Nutr* 1987;41:59-69.
26. McNulty H, Dowe le RC, Strain JJ, et al. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism. *Circulation* 2006;113:74-80.
27. Powers HJ, Bates CJ, Lamb WH. Haematological response to supplements of iron and riboflavin to pregnant and lactating women in rural Gambia. *Hum Nutr Clin Nutr* 1985;39:117-29.
28. Madigan SM, Tracey F, McNulty H, et al. Riboflavin and vitamin B-6 intakes and status and biochemical response to riboflavin supplementation in free-living elderly people. *Am J Clin Nutr* 1998;68:389-95.
29. Hustad S, McKinley MC, McNulty H, et al. Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma and erythrocytes at baseline and after low-dose riboflavin supplementation. *Clin Chem* 2002;48:1571-7.
30. Suboticanec K, Stavljenic A, Schalch W, Buzina R. Effects of pyridoxine and riboflavin supplementation on physical fitness in young adolescents. *Int J Vitam Nutr Res* 1990;60:81-8.
31. Rovira A, Vives Corrons JL, Estrada M, et al. Identification of molecular variants of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase by the polymerase chain reaction technique. *Med Clin (Barc)* 1994;102:281-4.
32. Bates CJ, Powers HJ. A simple fluorimetric assay for pyridoxamine phosphate oxidase in erythrocyte haemolysates: effects of riboflavin supplementation and of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hum Nutr Clin Nutr* 1985;39:107-15.
33. Report of a joint FAO/WHO. Human vitamin and mineral requirements. 2001.
34. Matalla González MC. Riboflavina. In: Deulofeu, P, R., Vilaseca, MA and Pastor, MC, eds. *Vitaminas: vol.1 hidrosolubles*. Barcelona: Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2005:29-43.

35. Preziosi P, Galan P, Deheeger M, Yacoub N, Drewnowski A, Hercberg S. Breakfast type, daily nutrient intakes and vitamin and mineral status of French children, adolescents, and adults. *J Am Coll Nutr* 1999;18:171-8.
36. Ruston D, Hoare J, Henderson L, Gregory J. The National Diet and Nutrition Survey: adults aged 19-64. Nutritional status. 2004.
37. Gariballa S, Ullegaddi R. Riboflavin status in acute ischaemic stroke. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1237-40.
38. Rosenblatt DS. Rosenblatt DS (1995) Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. (7th edition) McGraw-Hill Book Co, New York, pp 3111-3128.
39. Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997;66:269-313.
40. Soliman HA, Olesen H. Folic acid binding by human plasma albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36:299-304.
41. Schirch L. Serine hydroxymethyltransferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1982;53:83-112.
42. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359-65.
43. Watkins D, Rosenblatt DS. Update and new concepts in vitamin responsive disorders of folate transport and metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:665-70.
44. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
45. Murphy MM. Homocysteine: biomarker or cause of adverse pregnancy outcome? *Biomark Med* 2007;1:145-57.
46. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991;338:131-7.
47. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
48. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90.
49. Backstrand JR. The history and future of food fortification in the United States: a public health perspective. *Nutr Rev* 2002;60:15-26.
50. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-54.
51. Ray JG. Folic acid food fortification in Canada. *Nutr Rev* 2004;62:S35-9.
52. Pfeiffer CM, Osterloh JD, Kennedy-Stephenson J, et al. Trends in circulating concentrations of total homocysteine among US adolescents and adults: findings from the 1991-1994 and 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Clin Chem* 2008;54:801-13.

53. 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 U S A* 1998;95:3059-64.
54. Siva A, De Lange M, Clayton D, Monteith S, Spector T, Brown MJ. The heritability of plasma homocysteine, and the influence of genetic variation in the homocysteine methylation pathway. *QJM* 2007;100:495-9.
55. Berg JM. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. Versión catalana de la 6a ed. inglesa. Barcelona: Reverté; 2007.
56. Downing M, Schweigert BS. Role of vitamin B12 in nucleic acid metabolism. IV. Metabolism of C14-labeled thymidine by *Lactobacillus leichmannii*. *J Biol Chem* 1956;220:521-6.
57. Banerjee RV, Frasca V, Ballou DP, Matthews RG. Participation of cob(I) alamin in the reaction catalyzed by methionine synthase from *Escherichia coli*: a steady-state and rapid reaction kinetic analysis. *Biochemistry* 1990;29:11101-9.
58. Drummond JT, Huang S, Blumenthal RM, Matthews RG. Assignment of enzymatic function to specific protein regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1993;32:9290-5.
59. Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962;41:1263-76.
60. Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981;2:337-40.
61. Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985;5:115-41.
62. Fowler B. Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur J Pediatr* 1998;157 Suppl 2:S60-6.
63. Shane B, Watson JE, Stokstad EL. Uptake and metabolism of [3H]folate by normal and by vitamin B-12- and methionine-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 1977;497:241-52.
64. Smulders YM, Smith DE, Kok RM, et al. Cellular folate vitamers distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *Br J Haematol* 2006;132:623-9.
65. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
66. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006;136:1636S-40S.
67. 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.
68. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 2001;276:35558-63.
69. An F, Tarver H. Effects of diet and other factors on methionine adenosyltransferase levels in rat liver. *J Nutr* 1967;92:274-80.

70. Deguchi T, Barchas J. Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 1971;246:3175-81.
71. Sumner J, Jencks DA, Khani S, Matthews RG. Photoaffinity labeling of methylenetetrahydrofolate reductase with 8-azido-S-adenosylmethionine. *J Biol Chem* 1986;261:7697-700.
72. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984;259:9508-13.
73. Wagner C, Decha-Umphai W, Corbin J. Phosphorylation modulates the activity of glycine N-methyltransferase, a folate binding protein. In vitro phosphorylation is inhibited by the natural folate ligand. *J Biol Chem* 1989;264:9638-42.
74. Balaghi M, Horne DW, Wagner C. Hepatic one-carbon metabolism in early folate deficiency in rats. *Biochem J* 1993;291 (Pt 1):145-9.
75. Barbosa PR, Stabler SP, Trentin R, et al. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. *Clin Chim Acta* 2008;388:139-47.
76. Kim KN, Kim YJ, Chang N. Effects of the interaction between the C677T 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and serum B vitamins on homocysteine levels in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:10-6.
77. Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 1998;136:347-54.
78. 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.
79. Varela-Moreiras G, Escudero JM, Alonso-Apperte E. Homocysteine related vitamins and lifestyles in the elderly people: The SENECA study. *Nutr Hosp* 2007;22:363-70.
80. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000;46:1065-71.
81. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999;69:482-9.
82. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992;22:79-87.
83. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
84. Bostom AG, Culleton BF. Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:891-900.
85. Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999;55:1028-35.

86. Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:377-9.
87. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:660-4.
88. 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.
89. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Cook HY. Total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. *Metabolism* 1986;35:889-91.
90. Murphy MM, Scott JM, Molloy AM, Arija V, Fernandez-Ballart JD. Estradiol. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:Suppl. 1.
91. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD. Pregnancy-related decrease in total plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2003;77:993-5.
92. Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid. *QJM* 1997;90:519-24.
93. Daly S, Mills JL, Molloy AM, et al. Low-dose folic acid lowers plasma homocysteine levels in women of child-bearing age. *QJM* 2002;95:733-40.
94. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998;67:263-70.
95. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.
96. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001;73:613-21.
97. Koehler KM, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. *Am J Clin Nutr* 2001;73:628-37.
98. Pinto X, Vilaseca MA, Balcells S, et al. A folate-rich diet is as effective as folic acid from supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations. *Int J Med Sci* 2005;2:58-63.
99. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:687-9.
100. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987;162:185-96.
101. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:549-54.
102. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem* 1992;38:1311-5.

103. 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.
104. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37 (Pt 5):627-48.
105. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
106. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
107. Pinto X, Vilaseca MA, Garcia-Giralt N, et al. Homocysteine and the MTHFR 677C-->T allele in premature coronary artery disease. Case control and family studies. *Eur J Clin Invest* 2001;31:24-30.
108. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD. Homocysteine in pregnancy. *Adv Clin Chem* 2011;53:105-37.
109. van der Put NM, Thomas CM, Eskes TK, et al. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM* 1997;90:505-10.
110. Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, et al. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genet* 2000;90:6-11.
111. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
112. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;66:23-9.
113. van der Molen EF, Verbruggen B, Novakova I, Eskes TK, Monnens LA, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy. *BJOG* 2000;107:785-91.
114. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta* 1999;20:519-29.
115. Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 2004;50:1406-12.
116. Scholl TO, Hediger ML, Bendich A, Schall JI, Smith WK, Krueger PM. Use of multivitamin/mineral prenatal supplements: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Epidemiol* 1997;146:134-41.
117. Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, et al. Randomised trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcomes and T cell counts in HIV-1-infected women in Tanzania. *Lancet* 1998;351:1477-82.
118. Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:781-5.
119. Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997;90:168-71.

120. Powers RW, Evans RW, Majors AK, et al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1605-11.

121. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992;55:131-8.

122. 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.

123. 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.

124. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.

125. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.

126. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996;94:2410-6.

127. 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.

128. Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, et al. The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. *Atherosclerosis* 2004;174:315-22.

129. Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* 2011;378:584-94.

130. Holm PI, Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. 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.

131. Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, et al. The relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2002;132:283-8.

132. Caudill MA, Dellschaft N, Solis C, et al. Choline intake, plasma riboflavin, and the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase G5465A genotype predict plasma homocysteine in folate-deplete Mexican-American men with the methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype. *J Nutr* 2009;139:727-33.

133. Merchant AT, Msamanga G, Villamor E, et al. Multivitamin supplementation of HIV-positive women during pregnancy reduces hypertension. *J Nutr* 2005;135:1776-81.

134. Horigan G, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Purvis J, Scott JM. Riboflavin lowers blood pressure in cardiovascular disease patients homozygous for the 677C-->T polymorphism in MTHFR. *J Hypertens* 2010;28:478-86.
135. Wilson CP, Ward M, McNulty H, et al. Riboflavin offers a targeted strategy for managing hypertension in patients with the MTHFR 677TT genotype: a 4-y follow-up. *Am J Clin Nutr* 2012;95:766-72.
136. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45.
137. Spiroski I, Kedev S, Antov S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genetic polymorphisms with occlusive artery disease and deep venous thrombosis in Macedonians. *Croat Med J* 2008;49:39-49.
138. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202.
139. 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.
140. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005;331:1053.
141. Heux S, Morin F, Lea RA, Ovcarić M, Tajouri L, Griffiths LR. The methylentetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) as a risk factor for essential hypertension in Caucasians. *Hypertens Res* 2004;27:663-7.
142. Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M. MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem* 2007;302:125-31.
143. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke* 2003;34:1628-33.
144. 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.
145. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006;131:395-401.
146. Rodríguez-Guillen MR, Torres-Sánchez L, Chen J, et al. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Publica Mex* 2009;51:19-25.
147. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
148. Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 2006;51:278-83.

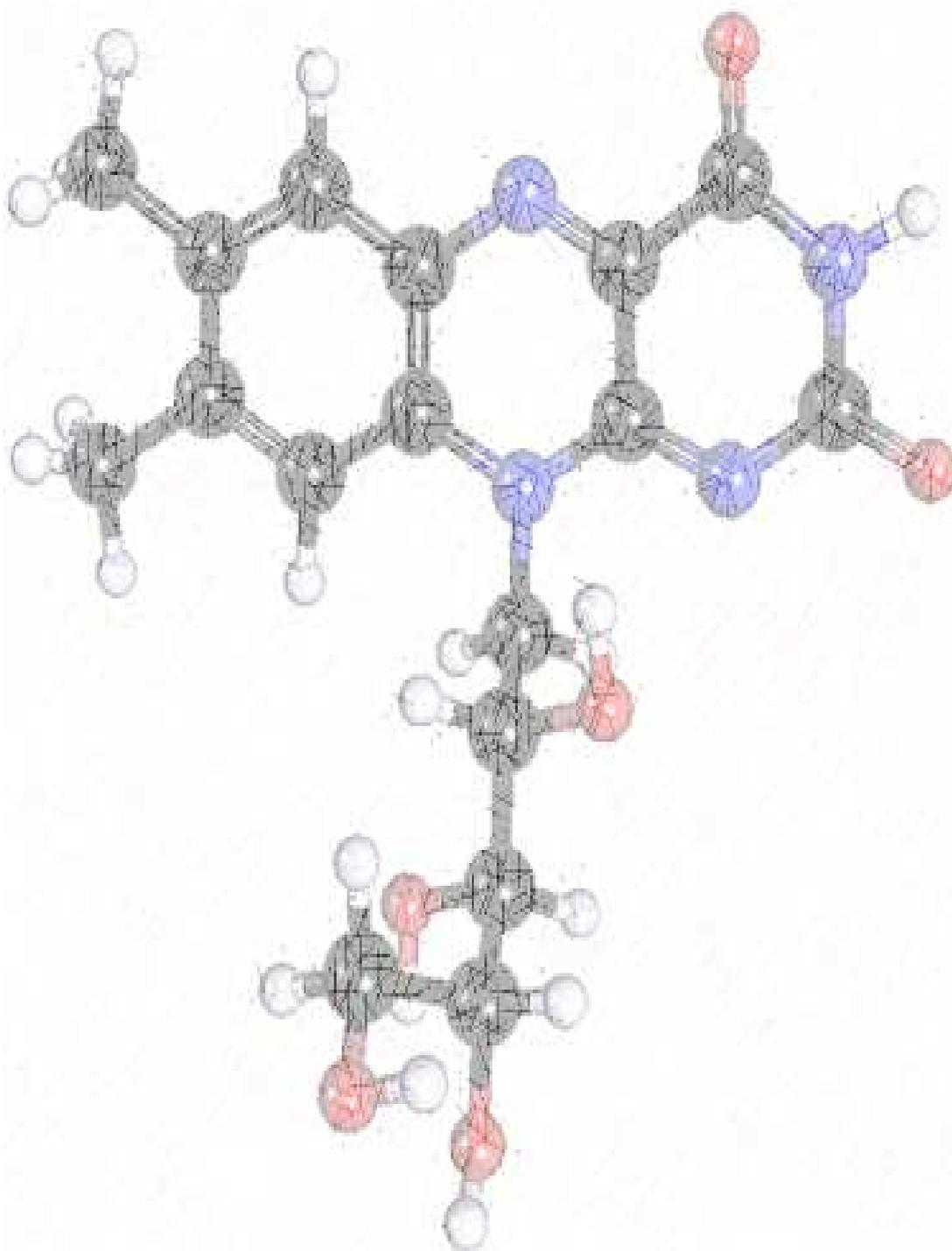
149. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001;156:409-15.
150. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
151. 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.
152. Castro R, Rivera I, Ravasco P, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C>T and 1298 A>C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM* 2003;96:297-303.
153. Freitas AI, Mendonca I, Guerra G, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: the A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal). *Thromb Res* 2008;122:648-56.
154. Ghazouani L, Abboud N, Mtraoui N, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in Tunisian patients with severe coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2009;27:191-7.
155. Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, et al. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects(NTD). *Am J Med Genet* 1999;87:23-9.
156. Jarrett JT, Hoover DM, Ludwig ML, Matthews RG. The mechanism of adenosylmethionine-dependent activation of methionine synthase: a rapid kinetic analysis of intermediates in reductive methylation of Cob(II)alamin enzyme. *Biochemistry* 1998;37:12649-58.
157. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9476-81.
158. 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.
159. Rady PL, Szucs S, Grady J, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 2002;107:162-8.
160. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barboux S, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-6.
161. Vaughn JD, Bailey LB, Shelnut KP, et al. Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. *J Nutr* 2004;134:2985-90.
162. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRR2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005;94:510-5.
163. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003;166:49-55.

164. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003;101:2483-8.
165. 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.
166. Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, Gravel RA, Rozen R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:197-200.
167. Zeng W, Liu L, Tong Y, Liu HM, Dai L, Mao M. A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. *Genet Mol Res* 2011;10:2597-605.
168. Naushad SM, Jain Jamal MN, Prasad CK, Rama Devi AR. Relationship between methionine synthase, methionine synthase reductase genetic polymorphisms and deep vein thrombosis among South Indians. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:73-9.
169. Urreiziti R, Asteggiano C, Vilaseca MA, et al. A CBS haplotype and a polymorphism at the MSR gene are associated with cardiovascular disease in a Spanish case-control study. *Clin Biochem* 2007;40:864-8.
170. Gueant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett* 2003;344:189-92.
171. Ouyang S, Li Y, Liu Z, Chang H, Wu J. Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. *Gene* 2013;515:308-12.
172. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A>G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;121A:219-24.
173. 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.
174. Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 2002;41:13378-85.
175. Zavadakova P, Fowler B, Zeman J, et al. CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in two families. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:461-76.
176. Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, et al. Analysis of the MTHFR 1298A-->C and 677C-->T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003;48:190-3.
177. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:1010-21.
178. Olteanu H, Wolthers KR, Munro AW, Scrutton NS, Banerjee R. Kinetic and thermodynamic characterization of the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 2004;43:1988-97.

179. Moat SJ, Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF. Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clin Chem* 2003;49:295-302.
180. Bjorke-Monsen AL, Roth C, Magnus P, et al. Maternal B vitamin status in pregnancy week 18 according to reported use of folic acid supplements. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:645-52.
181. Yazdanpanah N, Uitterlinden AG, Zillikens MC, et al. Low dietary riboflavin but not folate predicts increased fracture risk in postmenopausal women homozygous for the MTHFR 677 T allele. *J Bone Miner Res* 2008;23:86-94.
182. Hustad S, Midttun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet* 2007;80:846-55.
183. Parle-McDermott A, Mills JL, Molloy AM, et al. The MTHFR 1298CC and 677TT genotypes have opposite associations with red cell folate levels. *Mol Genet Metab* 2006;88:290-4.
184. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res* 1997;35:2-3.
185. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
186. Rodriguez IT, Ballart JF, Pastor GC, Jorda EB, Val VA. Validation of a short questionnaire on frequency of dietary intake: reproducibility and validity. *Nutr Hosp* 2008;23:242-52.
187. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. Protocol de seguiment de l'embaràs a catalunya. 2a edició revisada. 2006. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. Protocol de seguiment de l'embaràs a catalunya. 2a edició revisada. 2006.
188. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43-53.
189. Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. *J Clin Pathol* 1991;44:592-5.
190. Departament de Salut. Direcció General de Salut Pública. Hàbit de fumar. Prevalença per sexe i grups d'edat. Internet: <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=820&t=2012&x=4&y=9> (accessed Julio 2013)
191. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
192. Powers HJ, Hill MH, Welfare M, et al. Responses of biomarkers of folate and riboflavin status to folate and riboflavin supplementation in healthy and colorectal polyp patients (the FAB2 Study). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2128-35.
193. Wang SS, Feng L, Qiao FY, Lv JJ. Functional variant in methionine synthase reductase decreases the risk of Down syndrome in China. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:511-5.
194. Pishva SR, Vasudevan R, Etemad A, et al. Analysis of MTHFR and MTRR Gene Polymorphisms in Iranian Ventricular Septal Defect Subjects. *Int J Mol Sci* 2013;14:2739-52.
195. Refsum H, Nurk E, Smith AD, et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006;136:1731S-40S.

196. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid--an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1988;48:215-21.
197. Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta* 2004;340:99-105.
198. D'Angelo DV, Gilbert BC, Rochat RW, Santelli JS, Herold JM. Differences between mistimed and unwanted pregnancies among women who have live births. *Perspect Sex Reprod Health* 2004;36:192-7.
199. Kost K, Landry DJ, Darroch JE. The effects of pregnancy planning status on birth outcomes and infant care. *Fam Plann Perspect* 1998;30:223-30.
200. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993;269:1257-61.
201. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999;341:1509-19.
202. Shibuya K, Murray CJL. Congenital anomalies . In: Murray, CJL and Lopez, AD, eds. *Health dimensions of sex and reproduction*. Boston: Harvard University Press, 1998:455-512.
203. De Santis M, Quattrocchi T, Mappa I, et al. Folic acid use in planned pregnancy: an Italian survey. *Matern Child Health J* 2013;17:661-6.
204. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1998;148:30-7.
205. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, et al. Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: low folate status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet* 1998;78:155-9.
206. de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, et al. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1998;35:1009-13.
207. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999;68:461-7.
208. Allen L, de Benoist B, Dray O, Hurrell R. *Guidelines on food fortification with micronutrients*. WHO/FAO. 2006.
209. Chanarin I. Folate deficiency. In: Anonymous 75-146.
210. Laillou A, Pham TV, Tran NT, et al. Micronutrient deficits are still public health issues among women and young children in Vietnam. *PLoS One* 2012;7:e34906.
211. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements, Bangkok, Thailand, 21-30 September 1998*. 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2004.
212. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004;62:S29,33; discussion S34.

213. Institut d'estadística de Catalunya. Internet: <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=288> (accessed 7 2013).
214. Heller S, Salkeld RM, Korner WF. Riboflavin status in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1225-30.
215. Bates CJ, Prentice AM, Paul AA, Sutcliffe BA, Watkinson M, Whitehead RG. Riboflavin status in Gambian pregnant and lactating women and its implications for Recommended Dietary Allowances. *Am J Clin Nutr* 1981;34:928-35.
216. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD. Folic acid supplementation and riboflavin status. *Clin Chem* 2003;49:1416; author reply 1416-7.
217. McNulty B, McNulty H, Marshall B, et al. Impact of continuing folic acid after the first trimester of pregnancy: findings of a randomized trial of Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters. *Am J Clin Nutr* 2013;
218. 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.
219. 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.



APORTACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

10.- APORTACIONES CIENTÍFICAS

10.1. CONGRESOS

10.1.1. Pósters

Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, Fernandez-Ballart JD, Salat-Batlle J, **García-Minguillán CJ**, Fernàndez-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.

García-Minguillán CJ, Murphy MM, Berrocal-Zaragoza MI, Ceruelo S, Rios L, Ueland PM, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD. The effects of 2 common polymorphisms of key genes in folate and cobalamin metabolism depend on riboflavin status. World Forum for Nutrition Research Conference. Reus (España) 2013.

Bueno O, Cavallé-Busquets P, Fernandez-Ballart JD, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, Salat-Batlle J, Fernàndez-Roig S, **García-Minguillán CJ**, Solé Navais P, Murphy MM. Long term pregnancy plasma and red cell folate response to first trimester folic acid supplementation. World Forum for Nutrition Research Conference. Reus (España) 2013.

García-Minguillán CJ, Fernandez-Ballart JD, Cavallé-Busquets P, Ballesteros M, Bueno O, Berrocal-Zaragoza MI, Solé Navais P, Meyer K, Ueland PM, Murphy MM. The effects of the *MTRR* 66 A>G and *MTRR* 524 C>T polymorphisms on homocysteine during pregnancy vary depending on riboflavin and cobalamin status. 9th International Conference on homocysteine metabolism. Dublin (Irlanda) 2013.

Fernàndez-Roig S, Cavallé-Busquets P, Fernàdez-Ballart JD, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, **García-Minguillán CJ**, Ueland PM, Meyer K, Murphy MM. Late pregnancy dimethylglycine is lower in the presence of the BHMT 742 G>A polymorphism. 9th International Conference on homocysteine metabolism. Dublin (Irlanda) 2013.

10.1.2. Presentaciones orales

Murphy M, **García-Minguillán CJ**, Cavallé-Busquets P, Fernàndez-Roig S, Bueno O, Ueland PM, Meyer K, Ballesteros M, Salat-Batlle J, Berrocal-Zaragoza MI, Fernandez-Ballart JD. Low riboflavin (B2) status is associated with higher homocysteine during pregnancy and is a risk factor for gestational hypertension in a longitudinal study. FASEB-SRC – Folic acid, cobalamin and one carbon metabolism. Creta (Grecia) 2012.

García-Minguillán CJ, Fernandez-Ballart JD, Berrocal-Zaragoza MI, Ceruelo S, Rios L, Ueland PM, Meyer K, Molloy AM, Scott JM, Murphy MM. Riboflavin status modifies the effects of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) polymorphisms on the remethylation of homocysteine to methionine. FASEB-SRC – Folic acid, cobalamin and one carbon metabolism. Creta (Grecia) 2012.

Bueno O, Cavallé-Busquets P, Fernandez-Ballart JD, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, Salat-Batlle J, Fernàndez-Roig S, **García-Minguillán CJ**, Solé Navais P, Murphy MM. First trimester folic acid supplementation enhances folate status throughout pregnancy and reduces the effect of the *MTHFR* 677C>T polymorphism. UNS 20th International Congress of Nutrition. Granada (España) 2013.

García-Minguillán CJ, Cavallé-Busquets P, Fernandez-Ballart JD, Ballesteros M, Berrocal-Zaragoza MI, Bueno O, Solé Navais P, Murphy MM. Riboflavin status is inversely associated with homocysteine and determines the effect of the MTHFR 677

C>T polymorphism on homocysteine during pregnancy. UNS 20th International Congress of Nutrition. Granada (España) 2013.

10.2. PARTICIPACIONES EN PROYECTOS

- **Miembro del grupo** CIBERobn – Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03).

Centro de 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.

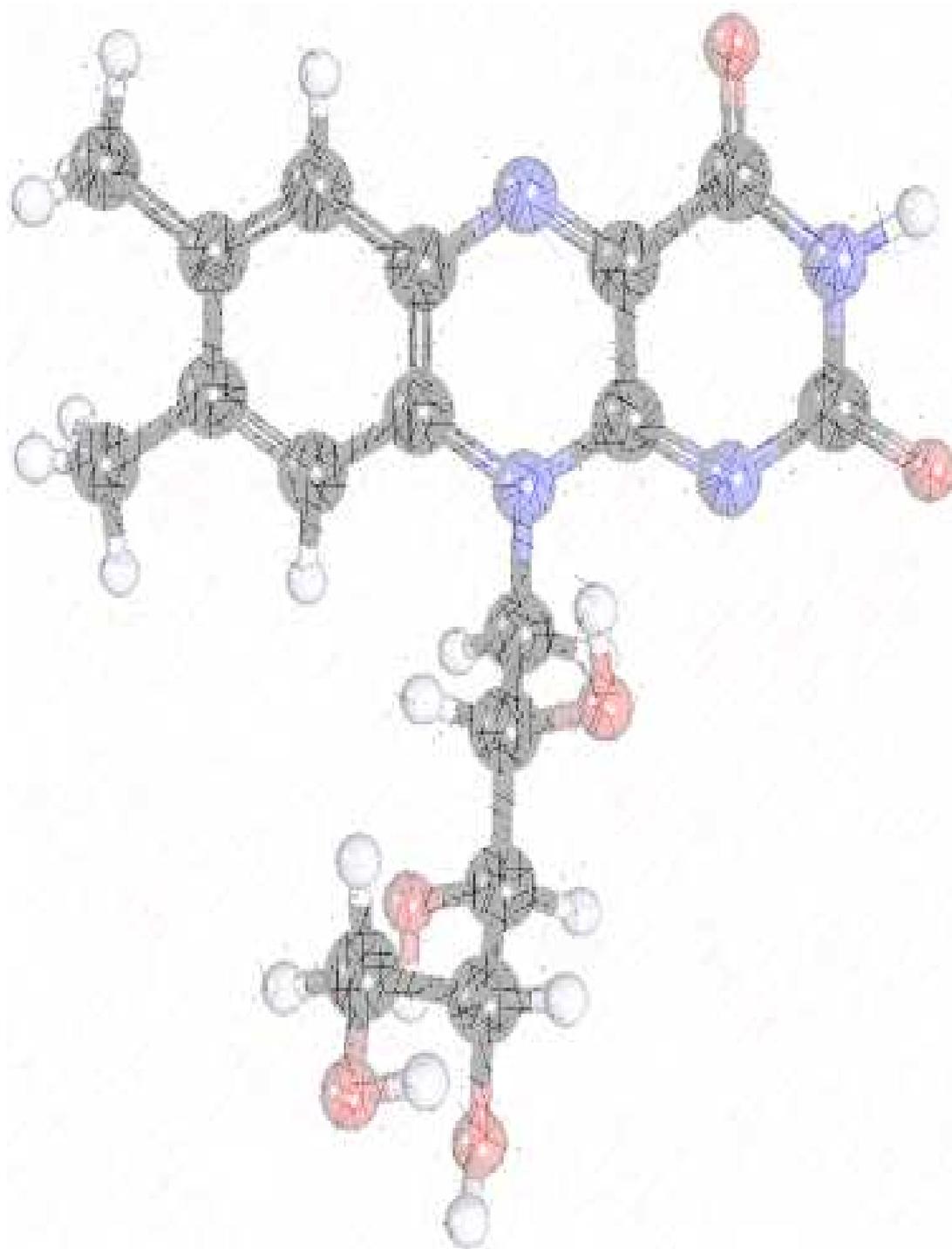
Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) FIS.

Referencia de la concesión: 10/00335.

Duración: desde 2011 hasta a 2014.

Investigador/a principal: Michelle Murphy.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014



ANEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014

ANEXO 1: ENCUESTAS DEL ESTUDIO NUTCIR

A1.1. ENCUESTA DE HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA DE LAS 20 SG

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
ÁCIDO FÓLICO	<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?: FOLIDOCE		<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
ÁCIDO FÓLICO	<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"/>				
¿Cuál?: _____		<input type="checkbox"/>				
HIERRO	<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"/>				
¿Cuál?: _____		<input type="checkbox"/>				
MULTI-VITAMINAS	<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"/>				
¿Cuál?: _____		<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"/>

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

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

	Mare		Pare
Trabajo actual	<input type="text"/>		<input type="text"/>
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"/>	<input type="checkbox"/>	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"/>				

Anote cualquier duda relacionada con esta encuesta:

A1.2. ENCUESTA DE HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA DE LAS 32 SG

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
HIERRO	<input type="checkbox"/> Cada día	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Cuál?: FERPLEX	<input checked="" type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Anote cualquier duda relacionada con esta encuesta:

A1.3. ENCUESTA DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO 1

12 semanas

Estudio NUTCIR 1

Nombre..... Fecha

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR

Procure contestar tranquilamente este cuestionario. Tómese el tiempo que considere necesario.

Este cuestionario le pregunta la frecuencia con que usted consume de forma **habitual** determinados alimentos.

La frecuencia de consumo se tiene que especificar en los recuadros de la derecha del listado de alimentos de este cuestionario. Para cada alimento del listado debe apuntar el **número de veces** que lo consume.

- Si lo consume **todos los días de la semana**, escriba un 7 en la columna **A LA SEMANA**.
- Si el consume **alguna vez a la semana**, escriba las veces: 1-2-3-4-5 o 6 en la columna **A LA SEMANA**.

Piense siempre en sumar el consumo de todas las comidas del día (desayuno, almuerzo, merienda, cena, otros,...). Por ejemplo, si toma todos los días leche para desayunar y alguna vez a la semana para cenar: $7 + 4 = 11$ veces a la semana.

- Si consume el alimento **alguna vez al mes**, escriba las veces: 1-2-3 etc... en la columna: **AL MES**
- Si no lo consume **nunca** o casi nunca, deje la casilla en blanco, sin escribir nada.

Ejemplo: Una mujer desayuna habitualmente un vaso de leche (7 veces) con magdalenas (7 veces), y para cenar a veces toma leche (4 veces) y a veces toma yogur (3 veces) de postres. Además, toma pescado algunas veces a la semana para almorzar (2 veces) y otras veces para cenar (4 veces). De legumbres consume alguna vez al mes (aproximadamente 4 veces). Si no consume nunca un alimento deje la casilla en blanco, sin contestar nada.

Este consumo lo apuntaría de la siguiente manera:

LISTADO DE ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche	11	
Yogur	3	
Bizcocho, magdalenas, ...	7	
...		
Pescado	6	
...		
Legumbres		4
...		
Queso de régimen		

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

LISTADO DE ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche		
Yogur		
Chocolate: tableta, bombones, “Kit-Kat”, “Mars”...		
Cereales de desayuno (“Corn-Flakes” “Kellog’s”)		
Galletas tipo “maría”		
Galletas con chocolate, crema...		
Magdalenas, bizcocho ...		
Ensamada, Donut, croissant...		
	A LA SEMANA	AL MES
Ensalada: lechuga, tomate, escarola...		
Judías verdes, acelgas, o espinacas		
Verduras de guarnición: berenjena, calabacín, champiñones...		
Patatas al horno, fritas o hervidas		
Legumbres: lentejas, garbanzos, judías blancas...		
Arroz blanco, paella		
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis ...		
Sopas y cremas		
	A LA SEMANA	AL MES
Huevos		
Pollo o pavo		
Ternera, cerdo, cordero (bistec, empanada...)		
Carne picada: longaniza, hamburguesa ...		
Pescado blanco: merluza, mero...		
Pescado azul: sardinas, atún, salmón ...		
Marisco: mejillones, gambas, langostinos, pulpo, calamares ...		
Croquetas, empanadillas, pizza		
Pan (en bocadillos, en las comidas)		
	QUANTES VEGADES MENJA...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Jamón, jamón dulce, embutidos		
Queso fresco (Burgos...) o bajo en calorías		
Quesos curados o semicurados, cremosos		

CUESTIONARIO DE PREFERENCIAS Y HÁBITOS ALIMENTARIOS

	A LA SEMANA	AL MES
Frutas cítricas: naranja, mandarina		
Otras frutas: manzana, pera, melocotón, albaricoque, plátano		
Frutas en conserva (en almíbar...)		
Zumos de fruta natural		
Zumos de fruta comercial		
Frutos secos: cacahuètes, avellanas, almendras		
Postres lácteos: natillas, flan, requesón		
Pasteles de crema o chocolate		
Bolsas de aperitivo (“chips”, “cheetos”, “fritos”)		
Golosinas: gominolas, caramelos,...		
Helados		

	A LA SEMANA	AL MES
Bebidas azucaradas (“coca-cola”, “Fanta”)		
Bebidas bajas en calorías (coca-cola light...)		
Vino, sangría		
Cerveza		
Cerveza sin alcohol		
Bebidas destiladas (Whisky, ginebra, coñac...)		

Indique con una X la respuesta que usted desee señalar:

1.- ¿En la mesa, se añade sal a las comidas?

Nunca __ / Alguna vez __ / Frecuentemente __ / Casi siempre __

2.- ¿Cómo definiría su apetito? Mucho __ Bastante __ Normal __ Poco __ Ninguno __

3.- ¿Qué tipo de leche toma habitualmente?: Entera __ Semidesnatada __ Desnatada __

4.- ¿Qué tipo de yogur toma habitualmente?

a) Natural __

b) Natural desnatado __

c) De sabores __

d) De sabores desnatado __

e) Con trozos de fruta __

f) Con trozos de frutas desnatado __

5.- ¿Qué tipo de pan toma habitualmente?: Blanco __ Integral __

6.- ¿Unta el pan con tomate y aceite en los bocadillos?:

Siempre __ / Habitualmente __ / Alguna vez __ / Casi nunca __

A1.4. ENCUESTA DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO 2

Estudio NUTCIR 2

Nombre..... Fecha

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR

Procure contestar tranquilamente este cuestionario. Tómese el tiempo que considere necesario.

Este cuestionario le pregunta la frecuencia con que usted consume de forma **habitual** determinados alimentos.

La frecuencia de consumo se tiene que especificar en los recuadros de la derecha del listado de alimentos de este cuestionario. Para cada alimento del listado debe apuntar el **número de veces** que lo consume.

- Si lo consume **todos los días de la semana**, escriba un 7 en la columna **A LA SEMANA**.
- Si el consume **alguna vez a la semana**, escriba las veces: 1-2-3-4-5 o 6 en la columna **A LA SEMANA**.

Piense siempre en sumar el consumo de todas las comidas del día (desayuno, almuerzo, merienda, cena, otros,...). Por ejemplo, si toma todos los días leche para desayunar y alguna vez a la semana para cenar: $7 + 4 = 11$ veces a la semana.

- Si consume el alimento **alguna vez al mes**, escriba las veces: 1-2-3 etc... en la columna: **AL MES**
- Si no lo consume **nunca** o casi nunca, deje la casilla en blanco, sin escribir nada.

Ejemplo: Una mujer desayuna habitualmente un vaso de leche (7 veces) con magdalenas (7 veces), y para cenar a veces toma leche (4 veces) y a veces toma yogur (3 veces) de postres. Además, toma pescado algunas veces a la semana para almorzar (2 veces) y otras veces para cenar (4 veces). De legumbres consume alguna vez al mes (aproximadamente 4 veces). Si no consume nunca un alimento deje la casilla en blanco, sin contestar nada.

Este consumo lo apuntaría de la siguiente manera:

LISTADO DE ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche	11	
Yogur	3	
Bizcocho, madalenas, ...	7	
...		
Pescado	6	
...		
Legumbre		4
...		
Queso de régimen		

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

LISTADO DE ALIMENTOS	¿CUANTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche		
Yogur		
Chocolate: tableta, bombones, “Kit-Kat”, “Mars”,...		
Cereales de desayuno (“Corn-Flakes”, “Kellog’s”)		
Galletas tipo “maría”		
Galletas con chocolate, crema...		
Magdalenas, bizcocho ...		
Ensaimada, Donut, croissant...		

	A LA SEMANA	AL MES
Ensalada: lechuga, tomate, escarola...		
Judías verdes, acelgas, o espinacas		
Verduras de guarnición: berenjena, calabacín, champiñones...		
Patatas al horno, fritas o hervidas		
Legumbres: lentejas, garbanzos, judías blancas...		
Arroz blanco, paella		
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis ...		
Sopas y cremas		

	A LA SEMANA	AL MES
Huevos		
Pollo o pavo		
Ternera, cerdo, cordero (bistec, empanada...)		
Carne picada: longaniza, hamburguesa ...		
Pescado blanco: merluza, mero...		
Pescado azul: sardinas, atún, salmón ...		
Marisco: mejillones, gambas, langostinos, pulpo, calamares ...		
Croquetas, empanadillas, pizza		
Pan (en bocadillos, en las comidas)		

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

	¿CUÁNTAS VECES COME...?	
	A LA SEMANA	AL MES
Jamón, jamón dulce, embutidos		
Queso fresco (Burgos...) o bajo en calorías		
Quesos curados o semicurados, cremosos		

	A LA SEMANA	AL MES
Frutas cítricas: naranja, mandarina		
Otras frutas: manzana, pera, melocotón, albaricoque, plátano		
Frutas en conserva (en almíbar...)		
Zumos de fruta natural		
Zumos de fruta comercial		
Frutos secos: cacahuetes, avellanas, almendras		
Postres lácteos: natillas, flan, requesón		
Pasteles de crema o chocolate		
Bolsas de aperitivo (“chips”, “cheetos”, “fritos”)		
Golosinas: gominolas, caramelos,...		
Helados		

	A LA SEMANA	AL MES
Bebidas azucaradas (“coca-cola”, “Fanta”)		
Bebidas bajas en calorías (coca-cola light...)		
Vino, sangría		
Cerveza		
Cerveza sin alcohol		
Bebidas destiladas (Whisky, ginebra, coñac...)		

Indique con una X la respuesta que usted desee señalar:

1.- ¿En la mesa, se añade sal a las comidas?

Nunca__ / alguna vez__ / Frecuentemente__ / Casi siempre__

2.- ¿Cómo definiría su apetito? Mucho__ Bastante__ Normal__ Poco__ Ninguno__

3.- ¿Qué tipo de leche toma habitualmente?: Entera__ Semidesnatada__ Desnatada__

4.-¿Qué tipo de yogur toma habitualmente?

- | | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| a) Natural__ | b) Natural desnatado__ |
| c) De sabores__ | d) De sabores desnatado__ |
| e) Con trozos de fruta__ | f) Con trozos de frutas desnatado__ |

5.- ¿Qué tipo de pan toma habitualmente?: Blanco__ Integral__

6.- ¿Unta el pan con tomate y aceite en los bocadillos?:

Siempre__ Habitualmente__ Alguna vez__ Casi nunca__

7.- ¿Cómo acostumbra a tomar el suplemento de hierro durante este embarazo? (marque con una x)

- No lo he tomado nunca
- Con agua
- Con zumo de naranja
- Con leche
- Otros (especificar)_____

8.- ¿Durante el embarazo ha tenido náuseas? Si No Y vómitos? Si No

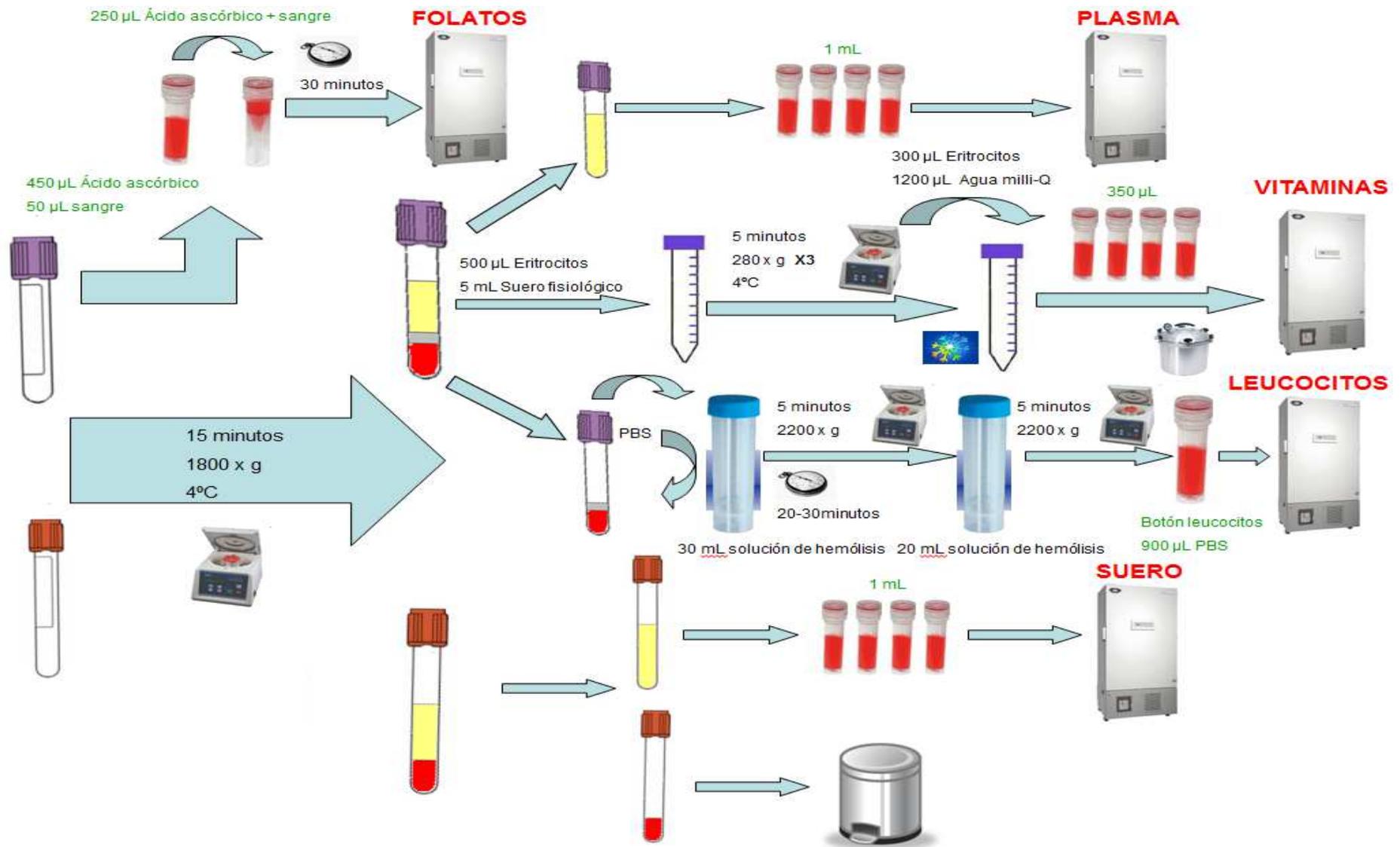
En caso que sí haya sufrido vómitos durante el embarazo, especifique en qué meses:

1-3 4 5 6 7 8

¿Con qué frecuencia ha tenido estos vómitos?

- Regularmente
- De vez en cuando
- Muy pocas veces

ANEXO 2: REPRESENTACIÓN ESQUEMATICA DEL PROCESADO DE LAS MUESTRAS



ANEXO 3: SOLUCIONES PARA EL PROCESADO DE MUESTRAS

A3.1. ÁCIDO ASCÓRBICO

La solución de ácido ascórbico es necesaria para la obtención del folato eritrocitario.

Para preparar la solución son necesarios 25 ml de agua Milli-Q y 0,25 g de ácido ascórbico.

Esta solución se tiene que preparar fresca cada día ya que es fotosensible.

A3.2. SUERO FISIOLÓGICO

La solución de suero fisiológico es necesaria para el lavado de los eritrocitos.

Para preparar la solución son necesarios 200 ml de agua Milli-Q y 1,8 g de NaCl.

Esta solución se puede conservar durante tres días en la nevera.

A3.3. SOLUCIÓN DE HEMÓLISIS

La solución de hemólisis es necesaria para la obtención de leucocitos.

Para preparar la solución son necesarios 7,007 g de ClNH_4 , 0,071 g de CH_5NO_3 y 1000 mL de agua Milli-Q.

Esta solución se conserva en nevera.

A3.4. SOLUCIÓN DE PBS

La solución de PBS es necesaria para la obtención y la conservación de leucocitos.

Para preparar la solución son necesarios 8 g de NaCl, 0,2 g de ClK, 0,24 g de KH_2PO_4 , 1,44 g de Na_2HPO_4 y 1000 mL de agua Milli-Q.

Esta solución tiene que estar a $\text{pH}=7,4$ y se tiene que autoclavar. Se puede conservar refrigerada.

ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CONTROL

El objetivo de este protocolo es preparar alícuotas de muestra que sirva como control para la determinación de EGRAC.

Se partió de tubos de EDTA-K₃ extraídos a varios voluntarios sanos.

Primero de todo se centrifugaron los tubos de EDTA-K₃ a 1800 x g durante 15 minutos a 4°C.

Una vez separada la fracción del plasma sanguíneo del restante del tubo de EDTA-K₃ se depositaron 500 µL de eritrocitos en 5 mL de suero fisiológico (ver anexo 3). Para proceder al lavado de los eritrocitos se centrifugó a 280 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y se añadió nuevamente 5 mL de suero fisiológico. Este proceso de lavado se realizó por triplicado.

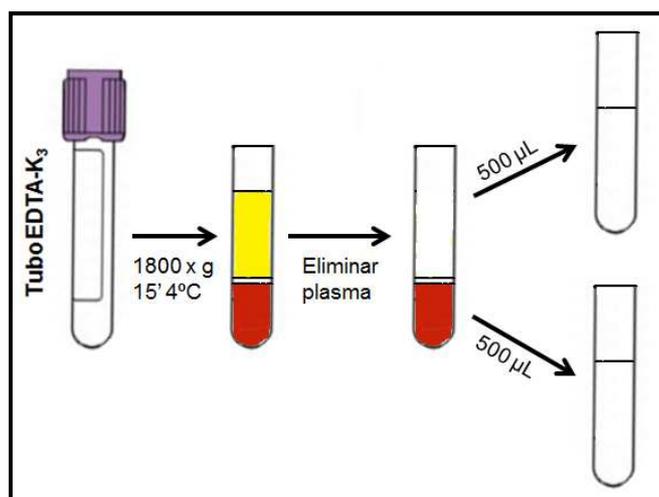


Figura anexo 1. Esquema del procesado de las muestras sanguíneas para la obtención de los controles para la determinación del EGRAC.

Una vez terminado el proceso de lavado los eritrocitos de todas las muestras se juntaron y se diluyeron, relación 1/5 en agua Mili-Q y se conservaron en alícuotas de 100 µL a -80°C. Todo este proceso se realiza sobre hielo.

Estas alícuotas de 100 µL son las que se utilizan como muestra control en la determinación del EGRAC.

ANEXO 5: SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE EGRAC

A5.1. SOLUCIÓN TAMPÓN FOSFATO 0,25 M

La solución TP es necesaria para la preparación del agente reactivo, de la solución de NADPH y de la solución de GSSG.

Tampón A

8,71 g de K_2HPO_4 + 0,116 g de EDTA + 200 mL de agua milli-Q

Tampón B

6,8 g de KH_2PO_4 + 0,116 g de EDTA + 200 mL de agua milli-Q

La solución TP es una solución tampón a pH 7,4 y se obtiene mezclando solución tampón A y solución tampón B en una proporción de 4:1.

El pH se comprueba en el pHmetro y se ajusta con tampón A o tampón B nunca con HCl o NaOH.

A5.2. FAD

La solución de FAD es necesaria, ya que como se ha explicado anteriormente, el EGRAC es un método para determinar el estado funcional en riboflavina consistente en medir la actividad de la GR activada con FAD y dividirla por la actividad generada sin FAD exógeno.

Para preparar la solución a una concentración de 100 μ M son necesarios 0,0017 g de FAD en 20 mL de TP. El FAD es fotosensible así que este proceso se realiza protegiéndolo de la luz.

De la solución obtenida se realizan alícuotas de 50 μ L protegidas de la luz y se almacenan a -80°C .

A5.3. NADPH

La solución de NADPH es necesaria ya que el NADPH se oxida a NADP^+ permitiendo la reducción de GSSG a su forma reducida GSH. El paso de NADPH a NADP^+ es el que se monitoriza a 340 nm.

Para preparar la solución a una concentración de 2 mM son necesarios 0,006 g de NADPH en 3,6 mL de TP. El NADPH es fotosensible así que este proceso se realiza protegiéndolo de la luz. Se guarda en nevera protegido de la luz y se prepara fresco cada día.

A5.4. GSSG

La solución de GSSG es necesaria ya que el EGRAC consiste en medir la actividad de la GR activada con FAD y dividirla por la actividad generada sin FAD exógeno.

Para preparar la solución a una concentración de 2 mM son necesarios 0,0459 g de NADPH en 3,75 mL de TP. Se guarda en nevera y se prepara fresco cada día.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓN GENÉTICO-AMBIENTAL DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA VITAMINA B2 E INFLUENCIA SOBRE EL CICLO DE LA METIONINA
EN UNA POBLACIÓN ADULTA Y EN GESTANTES
Carlos Jesús García-Minguillán Del Campo
Dipòsit Legal: T.187-2014